



**SOĞUĞA ADAPTE OLMUŞ MAYALARIN
SERBEST ve İMMOBİLİZE HÜCRELERİYLE
LİPAZ ÜRETİMİ**

Muhammed Hanifi UÇAR

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Mesut TAŞKIN
2016
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SOĞUĞA ADAPTE OLMUŞ MAYALARIN SERBEST ve
İMMOBİLİZE HÜCRELERİYLE LİPAZ ÜRETİMİ**

Muhammed Hanifi UÇAR

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Bilim Dalı**

ERZURUM

2016

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

SOĞUĞA ADAPTE OLMUŞ MAYALARIN SERBEST ve İMMOBİLİZE
HÜCRELERİYLE LİPAZ ÜRETİMİ

Doç. Dr. Mesut TAŞKIN danışmanlığında, **Muhammed Hanifi UÇAR** tarafından hazırlanan bu çalışma **11.../02./2016** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **21.../04./2016** tarih ve **17.../.../23**..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan alıntılar, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SOĞUĞA ADAPTE OLMUŞ MAYALARIN SERBEST ve İMMOBİLİZE HÜCRELERİYLE LİPAZ ÜRETİMİ

Muhammed Hanifi UÇAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

Mevcut çalışma soğuga adapte olmuş *Rhodotorula glutinis* HL25 mayasını kullanarak çalkalamalı flask kültürde lipaz üretmek için gerçekleştirilmiştir. 20 °C' lik sıcaklık ve 6.0' lık pH değerleri hem serbest hemde immobilize hücrelerle lipaz üretimi için optimal olarak bulunmuştur. Serbest hücreler için 40 mL/L' lik inokulum hacmi, immobilize hücreler için ise 150 g/L yatak sayısı lipaz üretimi için daha uygundu. Lipaz üretimi için optimal atık yağ konsantrasyonu ve inkübasyon süresi sırasıyla serbest hücreler için 30 mL/L ve 84 saat, immobilize hücreler içinse 40 mL/L ve 72 saat olarak belirlenmiştir. Sürfaktant (Triton X-100 ve Tween-80) ilavesinin hem serbest hemde immobilize hücrelerde lipaz üretimini artırdığı tespit edilmiştir. Serbest ve immobilize hücrelerin lipaz aktiviteleri için maksimum artışlar sırasıyla 5 ve 7.5 mL/L' lik Triton X-100 konsantrasyonlarında başarılmıştır. Bu optimal kültür koşulları altında, serbest ve immobilize hücreler için maksimum lipaz aktiviteleri sırasıyla 54.4 ve 75.2 U/L olarak belirlenmiştir. Yatakların maksimum lipaz aktivitesi dört ve beşinci döngülerin sonunda sabit kalmıştır. Yatakların 10. döngünün sonunda maksimum aktivitenin yaklaşık olarak %70'ni koruduğu belirlenmiştir. Bu, *R. glutinis* mayasının soğuga adapte straini ile lipaz üretimi üzerine ilk çalışmadır. Dahası, soğuga adapte olan mayaların immobilize hücreleriyle lipaz üretimi ilk kez olarak bu çalışmada test edildi.

2016, 48 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Rhodotorula glutinis*, soğuga adapte olmuş, lipaz, immobilize hücreler

ABSTRACT

Master Thesis

LIPASE PRODUCTION WITH FREE AND IMMOBILIZED CELLS OF COLD-ADAPTED YEASTS

Muhammed Hanifi UÇAR

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Microbiology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mesut TASKIN

This study was carried out to produce lipase in shaking flask culture using cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. The temperature 20°C and initial pH 6.0 were optimal values for lipase production by both free and immobilized cells. An inoculum size of 40 mL/L for free cells and beads number of 150 g/L for immobilized cells were more favorable for the lipase production. Optimal waste oil concentration and incubation time were determined as 30 mL/L and 84 h for free cells but 40 mL/L and 72 h for immobilized cells, respectively. Addition of surfactants (Triton X-100 and Tween-80) augmented the lipase production in free and immobilized cells. The maximum increases for lipase activity of free and immobilized cells were achieved at the Triton X-100 concentrations of 5 and 7.5 mL/L, respectively. Under these optimal culture conditions, the maximum lipase activities were found as 54.4 and 75.2 U/L for free and immobilized cells, respectively. The maximum lipase activity of beads remained stable at the end of 4 and 5th cycles. Beads could retained about 70% of their maximum activity by the end of the cycle 10. This is the first research on lipase production potential of a cold-adapted strain of the yeast *R. glutinis*. Furthermore, lipase production using immobilized cells of cold-adapted yeasts was tested for the first time in this study.

2016, 48 pages

Keywords: *Rhodotorula glutinis*, Cold-adapted, lipase, immobilized cells

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca beni her konuda destekleyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mesut TAŞKIN'na gösterdiği özveri ve hoşgörüden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında, deneysel aşamalarda yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ, Sayın Arş. Gör. Yağmur ÜNVER'e ve Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım tüm yüksek lisans ve doktora öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda oldukları için annem Bircan UÇAR ve babam Çetin UÇAR teşekkür ederim. Bana olan inancını hiçbir zaman yitirmeyen ve her daim yanımda olan sevgili eşim Asuman UÇAR teşekkür ederim.

Muhammed Hanifi UÇAR

Őubat, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Mayaların İzolasyonu	18
3.2. Mayaların Lipaz Üretme Yetenekleri Açısından Taranması.....	18
3.3. Serbest Hücrelerle Lipaz Üretimi.....	19
3.4. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle lipaz Üretimi	20
3.5. Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	21
3.6. İstatistiksel Analiz	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	22
4.1. Lipaz Üreten Mayaların İzolasyonu ve Taranması	22
4.2. <i>R. Glutinis</i> HL25'in Serbest ve Immobilize Edilmiş Hücreleriyle Lipaz Üretimi	23
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	33
5.1. Lipaz Üreten Mayaların İzolasyonu ve Taranması	33
5.2. Rhodotorula <i>Glutinis</i> HL25'in Serbest ve Immobilize Hücreleriyle lipaz Üretimi	35
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ.....	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
h	: Saat
lt	: Litre
ml	: Mililitre
pH	: Power of Hydrogen
rpm	: Dakika/devir
SmgB	: Sıvı ortam
sp.	: Cins
SSB	: Katı kültür
TSA	: Trypticase soy agar
TSB	: Trypticase soy broth
U/lt	: Aktivite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi	24
Şekil 4.2. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine pH'nın etkisi	25
Şekil 4.3. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine hücre yoğunluğunun etkisi	27
Şekil 4.4. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine atık yağ konsantrasyonunun etkisi	28
Şekil 4.5. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine Tween 80 konsantrasyonlarının etkisi	30
Şekil 4.6. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine Triton X-100 konsantrasyonlarının etkisi	30
Şekil 4.7. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	31
Şekil 4.8. Yatakların tekrar kullanım sayısının lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Farklı toprak örneklerinden izole edilen mayaların lipaz aktiviteleri.....	22
Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi ...	23
Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine pH'nın etkisi	25
Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine hücre yoğunluğunun etkisi.....	26
Çizelge 4.5. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine atık yağ konsantrasyonunun etkisi.....	28
Çizelge 4.6. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine Tween 80 ve Triton X-100'ün etkisi	29

1. GİRİŞ

Enzimler peptid bağlarıyla uzun zincirli aminoasitlerden oluşan globüler protein yapısındaki moleküllerdir (Ribeiro *et al.* 2010). Bir kimyasal reaksiyondaki kimyasal katalistlerde olduğu gibi enzimler biyolojik veya biyokimyasal reaksiyonlara hücre içi veya dışında hızlandırmaya yardım eder. Bu yüzden enzimler ‘‘biyokatalist’’ olarak da bilinirler (Gurung *et al.* 2013).

Enzim ilişkili proseslerin kullanımı eski medeniyetlere dayanmaktadır. Bilinen 4000 enzimin yaklaşık 200’ü ticari olarak önemli enzimlerdendir. 1960’lara kadar enzimlerin toplam satışı yıllık olarak yalnızca birkaç milyon dolardı ancak sektördeki göz alıcı büyümeyle pazar payı artmıştır (Goldfrey and West 1996; Wilke 1999). Örneğin endüstriyel enzimlerin dünya üzerindeki pazarının 2018 yılında 7 milyar dolara ulaşacağı düşünülmektedir (Sharma *et al.* 2001; Sharma *et al.* 2002; Dewan 2014).

Enzimler bitkilerde, hayvanlarda, insanlarda ve mikroorganizmalarda pek çok rol üstlenmektedir. Endüstriyel enzimler birçok kaynaktan üretilse de onların çoğunluğunu mikrobiyal kökenliler (fungal ve bakteriyal) oluşturmaktadır (Hiteshi and Gupta 2014).

Enzim üretimi için mikroorganizmaları kullanmanın büyük avantajları vardır. Mikrobiyal enzimler yüksek konsantrasyonlarda üretilebilir. İyi enzim üretici mikroorganizmaların taranması kolay ve hızlıdır. Mikroorganizmalar kısa fermantasyon döngülerine sahiptirler. Düşük maliyetli besiyerinde geliştirilebilirler ve arzulanan karakteristikte enzimlerin üretimi için kolaylıkla manipüle edilebilirler. Dahası mikrobiyal enzimler yüksek stabiliteye sahiptir (Ribeiro *et al.* 2010; Hiteshi and Gupta 2014).

Bilinen enzimlerin birçoğu mikroorganizmaları kullanarak fermantasyon teknolojisiyle üretilmektedir (Lovwrier 1998). Bakteri,maya ve filamentli fungilerden elde edilen proteaz, amilaz, pektinaz, ksilanaz, selülaz, ligninaz, kitinaz, invertaz ve lipaz gibi

enzimler çeşitli alanlarda kullanımı mevcuttur (Loperena *et al.* 2012; Joshi and Satyanarayana 2013; Taskin 2013; Taskin *et al.* 2013). Örneğin, bu enzimler sağlık, gıda, tekstil, deterjan endüstrisi, kiral farmasötiklerin sentezi, sülfaktantların üretimi, kozmetik vb biyoteknolojik proseslerde kullanılmaktadır (Sharma *et al.* 2001).

Lipazlar (EC 3.1.1.3) hidrolazların bir sınıfıdır. Lipazlar yağların, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen hidrolazlar olarak bilinmektedir. Yağların hidrolizi (yağ-su ara yüzeyinde uzun zincirli açilgliserollerin ester bağlarının kırılması) lipazların en önemli reaksiyonudur. Lipazlar esterifikasyon, interesterifikasyon, asidoliz, alkoliz, aminoliz gibi reaksiyonları katalizleyebilme özellikleri sayesinde biyodönüşüm işlemlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden lipazlar dünya biyokütlesinin büyük bir kısmını oluşturan lipitlerin biyodöngüsünde önemli rol oynamaktadır (Ghosh *et al.* 1996; Saxena *et al.* 2003; Vakhlu and Kour 2006; Liu *et al.* 2006; Colla *et al.* 2010; Treichel *et al.* 2010; Sumanjelin *et al.* 2013).

Diğer enzimlerde olduğu gibi endüstriyel lipazların üretiminde de yaygın olarak mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Mikrobiyal lipazlar organik çözücülerde yüksek kararlılık gösterdiğinden, reaksiyonlarda kofaktöre ihtiyaç duymadığından ve geniş bir substrat grubu üzerinde aktivite gösterebilmesinden dolayı biyoteknolojik açıdan daha fazla önem taşımaktadır. Dahası mikrobiyal lipazlar çoğunlukla ekstrasellüler (hücre dışı) formda olduğundan dolayı daha yüksek miktarlarda üretilmektedir (Saxena *et al.* 2003; Joseph *et al.* 2008; Bussamara *et al.* 2010).

Lipazlar günümüzde deterjan formülasyonu, tekstil, gıda, deri, kağıt yapımı, süt, ilaç prosesi, organik kimya, kozmetik ve kuru temizleme endüstrisi, yağ üretimi gibi geniş kullanım alanına sahiptir (Verger 1997; Sharma *et al.* 2001; Kirk *et al.* 2002; Burkert *et al.* 2004; Hasan *et al.* 2006; Ertuğrul *et al.* 2007; Heravi *et al.* 2008; Treichel *et al.* 2010; Liu *et al.* 2012; Veerapagu *et al.* 2013). Özellikle organik sentez reaksiyonlarında bölge seçimli, stereo seçimli, kimyasal seçimli, enantio seçimli reaksiyonlarda dönüşümleri katalizlemekte kullanılmaktadır. Bu özellikler lipazı, çok yönlü

biyokatalizör yapmaktadır (Saxena *et al.* 2003; Joseph *et al.* 2008; Bussamara *et al.* 2010).

Lipazların üretiminde filamentli mikrofunguslar (küfler), mayalar ve bakteriler yaygın olarak kullanılmaktadır. *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* ve *Rhizomucor* cinsleri önemli lipaz üretici küfler olarak kabul edilmektedir. Bakteri olarakta *Acinetobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alcalophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cepacia* ve *Staphylococcus caseolyticus*'un iyi lipaz üreticileri olduğu belirtilmektedir (Chen *et al.* 1995; Sharon *et al.* 1998; Kok *et al.* 1995; Beer *et al.* 1998; Dharmstithi and Kuhasuntisu 1998; Treichel *et al.* 2010). Maya olarakta *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida utilis*, *Trichosporon asahii*, *Candida cylindracea*, *Aureobasidium pullulans*, *Williopsis californica* ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin lipaz üretme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Chen *et al.* 1992; Arroyo *et al.* 1999; Kim and Hou 2006; Ciafardini *et al.* 2006; Grbavcic *et al.* 2007; He and Tan 2006; Potumarthi *et al.* 2008; Rajendran *et al.* 2008; Liu *et al.* 2008; Lopes *et al.* 2009).

Lipazlar dahil mikrobiyal enzimlerin üretiminde sıvı (submerged) ve katı kültür (solid state) (Mahadik *et al.* 2002; Rodriguez *et al.* 2006) teknikleri uygulanmaktadır (Lin *et al.* 2006; Colla *et al.* 2010). Bununla birlikte daha hızlı mikrobiyal gelişme sağlanması, sürenin kısa olması ve daha az iş gücü gerektirmesi gibi sebeplerden dolayı sıvı kültürler daha avantajlı kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar sıvı kültürlerde lipaz üretiminin pek çok fiziksel ve kimyasal faktörlerden etkilendiği bildirilmektedir. Sıvı kültür çalışmalarında ortam pH'sın, sıcaklığın, çalkalama hızının, oksijen konsantrasyonunun, inokulum hacminin, inkübasyon süresinin, teşvik edicilerin, azot ve karbon kaynaklarının, mineral kaynaklarının lipaz üretimini etkilediği belirtilmektedir (Lin *et al.* 2006; Rodriguez *et al.* 2006; Heravi *et al.* 2008; Dhillon *et al.* 2011; Ifukhar *et al.* 2011; Mobarak *et al.* 2011; Sumanjelin *et al.* 2013; Veerapagu *et al.* 2013). Bu faktörlerin optimize edilmesiyle lipaz verimliliği artırılmaktadır. Örneğin, pepton ve maya ekstratı gibi organik azot kaynaklarının yanı sıra bazı inorganik azot

kaynaklarında lipaz üretimini artırdığı belirtilmektedir (Mobarak *et al.* 2011; Veerapagu *et al.* 2013).

Besiyeri ortamında katılan karbon kaynağının lipaz üretimini etkileyen en önemli faktör olduğu belirtilmektedir (Lotti *et al.* 1998). Kullanılan mikroorganizmaya göre farklılık görülse de genellikle en iyi karbon kaynağının zeytin, soya, fındık, ayçiçeği ve mısır gibi bitkisel yağlar özellikle de zeytin yağının olduğu bildirilmektedir (Lee *et al.* 2001; Kumar *et al.* 2005; Kaushik *et al.* 2006; Veerapagu *et al.* 2013). Yağların yanı sıra triaçilgliserol, yağ asitleri ve gliserolün de lipaz üretiminde substrat olarak kullanılabilmesi belirtilmektedir (Veerapagu *et al.* 2013; Komesli 2015). Diğer taraftan, literatürde besiyeri ortamına uygun konsantrasyonlarda eklenen Tween-80 ve Triton X-100 gibi sürfaktantlarında lipaz üretimini önemli ölçüde artırdığı rapor edilmektedir (Treichel *et al.* 2010).

Mikrobiyal üretim çalışmalarında besiyerlerinin maliyetinin azaltılması büyük önem arz etmektedir (Rigo *et al.* 2010). Bu yüzden araştırmacılar zengin besinsel içeriğe sahip olan organik maddelerin özellikle de atık özelliğinde olanları bulduran endüstriyel ya da evsel atıkların, besiyerlerinde substrat olarak kullanılabilmesini ileri sürmektedir (Lotrakul and Dharmsthiti 1997; Griebeler *et al.* 2009; Veerapagu *et al.* 2013). Bu doğrultuda da melasın, peynir altı suyunun, mısır maserasyon sıvısının, tavuk tüylerinin, bitkisel atıkların vb. besiyerlerinde azot ve/veya karbon kaynağı olarak kullanılabilmesini belirtmektedir (Ertuğrul *et al.* 2007; Taskin *et al.* 2012; Arslan 2014). Benzer şekilde, araştırmacılar ev ya da restaurant gibi işletmelerine ait bitkisel kaynaklı atık kızırtma yağlarında biyodizel ya da lipaz üretiminde substrat olarak değerlendirilebileceğini belirtmektedirler. Özellikle, bitkisel kızırtma yağlarının lipaz üretimde etkili bir substrat olarak kullanılabilmesine bir çok literatürde değinilmektedir (Kaieda *et al.* 1996; Haba *et al.* 2000; Zaher 2003; Felizardo *et al.* 2005; Mangesh *et al.* 2006; Canakci *et al.* 2009; Mobarak *et al.* 2011; Sumanjelin *et al.* 2013; Charpe and Rathod 2013). Avrupa birliğinde üretilen atık yağ miktarı yaklaşık olarak 700 bin⁻¹ milyon ton, ABD de yaklaşık olarak 1,2 milyon tondur. Ülkemizde yılda 1,5 milyon ton bitkisel yağın gıda amaçlı kullanıldığı ve bu yağdan yaklaşık 350 bin ton atık yağ

oluştugu belirtilmektedir (Gupta *et al.* 2004; Liu *et al.* 2008; Bourlieu *et al.* 2009; Komesli 2015). Atık kızırtma yağlarının yukarıda belirtilen yüksek miktarları göz önüne alındığında, onların lipaz ya da biyodizel üretiminde substrat olarak kullanımı sayesinde hem çevre kirliliğinin hem de besiyerlerinin maliyetinin azaltılması açısından katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Lipazların üretimi genellikle termofilik ve mezofilik mikroorganizmalarla gerçekleştirilmektedir. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar özellikle deterjan endüstrisinde yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi gereken yıkama işlemleri için tercih edilmektedir (Treichel *et al.* 2010). Ancak, son zamanlarda araştırmacılar lipaz ve proteaz gibi enzimlerin soğukta yaşayan mikroorganizmalardan elde edilmesini önermektedirler. Soğukta aktif olan lipazlar genellikle düşük sıcaklıklarda gelişme potansiyeline sahip olan mikroorganizmalardan izole edilmektedir (Joseph *et al.* 2008; Loperena *et al.* 2012). Daha da açıkcası, cold aktif **lipolitik** mikroorganizmalar (soğuğa adapte lipaz üreten mikroorganizmalar), düşük sıcaklıklarda çok az ya da hiç etki göstermeyen mezofilik ve termofilik mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında, düşük sıcaklıklarda yüksek oranda katalitik etki gösteren lipaz üretmektedir. Cold aktif lipazlar yaklaşık 5°C gibi düşük sıcaklıklarda hayatta kalan mikroorganizmalarda geniş ölçüde yayılım göstermektedir. Soğuya adapte olmuş mikroorganizmalar düşük sıcaklıklarda iyi gelişme eğilimindedir (Joseph *et al.* 2008). Antartika bölgesinden izole edilen *Moraxella* sp. 25°C sıcaklıkta iyi gelişmekte ve cold aktif lipolitik enzim üretmektedir (Feller *et al.* 1990).

Soğukta yaşayan mikroorganizmalarda kendi arasında psikrofilikler ve psikrotolerantlar diye ayrılmaktadır. Psikrofiller soğuk çevrelerde örneğin derin denizler, buzullar, dağlık bölge, toprak, temiz veya tuzlu sularda bulunurken, psikrotolerantlar ise daha çok Arktik ve Antartik derin denizlerinin ağır koşullarında soğuk uyumlu organizmalarda bulunduğu belirtilmektedir (Antranikian *et al.* 2005). Psikrofiliklerin gelişme sıcaklığı 0-20°C, fakültatif mezofilik olarak tanımlanan psikrotolerantların ki ise 20°C'den fazla ve 0°C olarak kabul edilmektedir (Shivaji and Prasad 2009; Rossi *et al.* 2009).

Şimdiye kadar psikrofilik veya psikrotolerant özelliğe sahip soğukta gelişen *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Staphylococcus* ve *Vibrio* cinslerine ait bakterilerin yanısıra *Aspergillus nidulans* ve *Pencillium roqueforti* küflerinin de soğukta aktif lipaz enzimlerini üretebileceği gösterilmiştir (Joseph *et al.* 2008; Loperena *et al.* 2012). Benzer şekilde, *Candida antarctica*, *Cryptococcus victoriae*, *Mrakia psychrophila*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula glacialis* ve *R. laryngis* gibi psikrofilik yada psikrotolerant mayaların da soğukta aktif lipaz üretebileceği rapor edilmiştir (Xin and Zhou 2007; Vaz *et al.* 2010; Loperena *et al.* 2012; Carrasco *et al.* 2012). Bununla, birlikte *Rhodotorula glutinis* mayasının soğukta gelişen suşlarının lipaz üretme potansiyeli literatürde gösterilmemiştir.

Soğukta yaşayan mikroorganizmalardan elde edilecek enzimlerin çok düşük sıcaklıklarda aktivite gösterdiğinden dolayı, bu enzimlerin normal evlerde kullanılan yıkama sularında bile aktivite gösterdiğini belirtmektedirler. Bu sayede de çamaşır ve bulaşık makinelerinde suyun ısıtılmasına gerek kalmayacağından dolayı enerji tasarrufu sağlanabileceğini belirtmektedirler. Ayrıca, yüksek sıcaklıklarda yıkandığında giysilerde gözlenen bozulmaların önüne geçilebileceğini açıklamaktadırlar (Joseph *et al.* 2008; Joshi and Satyanarayana 2013). Son zamanlarda soğukta aktif olan lipazlar ilaçların ve pestisitlerin hazırlanmasında ara bileşik olarak kullanılan optikal aktif aminlerin üretiminde de biyokatalist olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler, organik sentez reaksiyonlarında esterlerin, besin endüstrisinde ise lipofilik antioksidantların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Diğer taraftan, soğukta aktif lipazlar dahil lipazlar transesterifikasyon reaksiyonu ile bitkisel ya da hayvansal yağlardan biyodizel üretiminde de kullanılmaktadır (Joseph *et al.* 2008).

Mikroorganizmaların sıvı kültürlerinde üretimi bu canlıların serbest ya da immobilize (tutuklanmış) hücreleriyle gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalarda serbest hücrelere oranla immobilize edilmiş hücrelerin pek çok avantaja sahip olduğu rapor edilmiştir. Örneğin, immobilize edilmiş matriksler içerisinde hücre yoğunluğu daha fazla olmakta ve bu durum da reaksiyonların daha hızlı ve daha kısa sürede gerçekleşmesini

sağlamaktadır. Bu yüzden de immobilize hücreler hem daha yüksek verimler sağlamakta hem de zaman ve enerji tüketimini azaltmaktadır. İmmobilize hücrelerin kültür ortamına adaptasyonu için gerekli olan süre daha kısa olmakta ve reaksiyon daha kısa süre içerisinde başlamaktadır. İmmobilize hücreler besin kıtlığına, inhibitör bileşiklere, sıcaklık ve pH gibi çevresel streslere karşı daha dayanıklı olmaktadır. Ayrıca, immobilize hücreler yüksek hücre yoğunluğu sayesinde kültür ortamındaki istenmeyen kontaminasyonları da engelleyebilmektedir. Dahası immobilize hücreler kültür ortamından daha kolay uzaklaştırılabilmekte ve tekrar tekrar kullanılabilir (Duarte *et al.* 2013; Aydoğan *et al.* 2014).

Sodyum alginatın ucuz olması, yöntemin uygulanmasının kolay olması ve bu matrisin toksisiteye neden olmaması gibi özellikleri nedeniyle sodyum alginat matrisi içerisinde mikrobiyal hücrelerin ya da enzimlerin tutuklanması en yaygın immobilizasyon yöntemi olarak kabul edilmektedir (Unver *et al.* 2015).

Bu özelliklerinden dolayı da, mikroorganizmaların immobilize edilme yöntemi; etil alkol, alkollü içkiler, aminoasitler, polisakkaritler, biyohidrojen, antibiyotikler, fruktoz şurubu ve sitrik asit üretiminde kullanılmaktadır (Arslan, 2014). Yapılan çalışmalarda, bu yöntemin tannaz, invertaz, pektinaz ve proteaz gibi bir çok enzimin üretiminde de kullanılabileceği rapor edilmiştir (Taskin 2013; Aydoğan *et al.* 2014; Unver *et al.* 2015). Benzer şekilde, hücre immobilizasyon yöntemi termofilik yada mezofilik mikroorganizmalarla lipaz üretiminde de kullanılmıştır (Ellaiah *et al.* 2004; Bhushan *et al.* 2008; Bisht *et al.* 2013; Ferrarezi *et al.* 2014). Dahası bazı çalışmalarda soğukta yaşayan bakteri veya küflerin immobilize hücreleriyle lipaz üretimi de çalışılmıştır (Joseph *et al.* 2006; Ali *et al.* 2011). Bununla birlikte, soğukta yaşayan mayaların immobilize hücreleriyle lipaz üretimi üzerine literatürde herhangi bir çalışma yer almamaktadır.

Bu yüzden mevcut tez çalışmasında;

1. Soğukta yaşayan lipaz üretici yeni mayaların izolasyonu
2. En iyi lipaz üretici test mayasının belirlenmesi ve bu test mayasının serbest ve immobilize edilmiş hücreleriyle sıvı kültürde lipaz üretiminin gerçekleştirilmesi
3. Maksimum lipaz üretimi için bazı kültür şartlarının optimize edilmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde, soğukta yaşayan maya (psikrofilik veya psikrotolerant) *Rhodotorula glutinis* mayasının serbest veya immobilize edilmiş hücreleriyle lipaz üretiminin gerçekleştirildiğini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, mevcut literatürlerde, mezofilik ya da termofilik özelliğe sahip mayalar, bakteriler veya küflerin serbest veya immobilize hücreleriyle lipazlar dahil çeşitli enzimlerin üretimine yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yine literatürde immobilize hücrelerin veya soğukta yaşayan mikroorganizmaların diğer birçok endüstriyel ürünün üretiminde kullanılabildiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bahsi geçen bu çalışmaların bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada Tepki Yüzey Metodu kullanılarak *Halobacillus trueperi* RSK CAS9 bakterisi ile alkali lipaz üretiminin optimizasyonu istatistiksel olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada deniz atıkları substrat olarak kullanılmış ve maksimum enzim üretimi 1355,81 U/ml olarak tespit edilmiştir. Çalışmalardaki maksimum lipaz üretimi için merkezi kompozit dizaynı kullanılmıştır. Optimum parametreler 14,58 g/l ton balığı tozu, 5,05 ml/l, zeytinyağı, 72,42 g/l NaCl, 45°C sıcaklık ve pH 9 olarak belirlenmiştir. Alkali lipazın moleküler ağırlığı 44 kDa olarak belirlenmiştir. Bu enzimin aktivitesinin EDTA ve PMSF ile inhibe edildiği belirlenmiştir (Sathishkumar *et al.* 2015).

Liu *et al.* (2012) çalışmalarında *Burkholderia* sp. C20 ile lipaz üretiminde optimizasyon için Tepki Yüzey Yöntemi (RSM)'ni kullanmıştır. Lipaz üretiminde maya ekstratı ve zeytinyağı konsantrasyonunun önemli bir parametre olduğunu belirlemiştir. Optimizasyon sonunda lipaz aktivitesinin 22,6 U/ml'ya kadar yükseldiğini belirlenmiştir. Zimogram analizine göre lipazın moleküler ağırlığı 23 kDa olarak bulunmuştur.

Neethu *et al.* (2015), lokal olarak izole ettikleri *Stenotrophomonas maltophilia* bakterisiyle agro-endüstriyel atıklar kullanılarak lipaz üretimini gerçekleştirmiştir. Çalışmalarında 74,117 U/ml'lik aktivite ile en fazla enzim üretimi yerfıstığı kekinde gözlemlenmiştir. Bunu sırasıyla, hindistan cevizi (61,911 U/ml), buğday kepeği (49,614 U/ml) ve pirinç kepeği (28.165 U/ml) izlemiştir. Yerfıstığı keki ve Hindistan cevizi içeren kültür ortamında lipaz üretimi için en uygun pH 6, buğday kepeği ve pirinç kepeği ortamında ise pH 7 olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan tüm substratlar için maksimum lipaz üretiminin %60'lık nem oranında başarıldığı tespit edilmiştir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 49,1 KDa olarak belirlenmiştir.

Pratuangdejkul and Dharnstithi (2000) çalışmalarında işlenmemiş süttten izole ettikleri *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 bakterisiyle lipaz üretimini ve üretilen lipazın saflaştırmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Lipaz üretimi için optimum şartların 15°C sıcaklık, 200 rpm' lik çalkalama hızı ve %1'lik Tween-80 konsantrasyonu olduğunu belirlemişlerdir. Saflaştırılan lipazın moleküler ağırlığı 23 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu enzim için maksimum aktivite pH 7,0'de ve 50°C'de tespit edilmiştir. Kararlı kaldığı pH 4.0 - 8.0 aralığı olarak belirlenmiştir.

Lin *et al.* (2006), çalışmalarında sıvı kültür ortamında *Antrodia cinnamomea* ile lipaz üretimi üzerine çevresel (sıcaklık ve pH gibi) ve besinsel (karbon, azot, ve mineral kaynaklar gibi) kültür şartlarının etkisini test etmiştir. Lipaz üretimi için optimum pH'yı 5,5 sıcaklığı ise 25°C olarak belirlemişlerdir. Besinsel faktör olarak da %5 gliserol, %0,5 sodyum nitrat ve %0,1 tiamin'in en iyi sonuçları sağladığını tespit etmişlerdir.

Joseph (2006) çalışmasında iki farklı bakteriden cold-active lipaz üretimi üzerine besinsel ve çevresel faktörlerin etkisini araştırmıştır. *Bacillus sphaericus* MTCC 7526 ve *Microbacterium phyllosphaerae* MTCC 7530 bakterileriyle cold aktif lipaz üretimi için optimum pH 8.0, optimum sıcaklık ise 15°C olarak belirlenmiştir. İlk bakteri için optimum inkübasyon süresi 48 ikinci bakteri içinse 36 saat olarak belirlenmiştir.

Iftikhar *et al.* (2011) çalışmasında *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor mucedo*, *Alternaria alternata*, *Trichophyton sp.*, *Fusarium semitectum*, *Curvularia sp.*, gibi bazı küflerin ekstrasellüler lipaz aktivitelerini araştırmıştır. *Trichophyton sp.* suşunun maksimum lipaz üretimi sağladığı belirtilmiştir. Üretim için optimal değerlerin pH 7 ve 30°C olduğunu göstermişlerdir.

Bacillus sp. RKY3 suşu ile alkalın proteaz üretimi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada maya ekstratı, mısır maserasyon sıvısı, mısır nişastası ve inokülüm hacminin enzim verimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Enzimin miktarı optimize edilmiş fermentasyon koşulları altında 939 u/ml, optimize edilmemiş fermentasyon koşulları altında ise 417 u/ml bulunmuştur (Reddy *et al.* 2008).

Ramesh *et al.* (2009) aktinomisetlerin alkalın proteaz üretme kapasitelerini araştırmış ve bunlar arasında da *Streptomyces fungicidicus* MML1614 maksimum enzim üretimi sağladığını belirtmişlerdir. Bu mikroorganizmanın teşhisini 16S rRNA sekans analizine göre gerçekleştirmiştir. Mikroorganizmanın pH 9 ve 40°C'de maksimum aktivite gösterdiğini bununla birlikte pH 11 ve 60°C'ye kadar aktivitesinin stabil kaldığını ortaya çıkarmıştır.

Haddar *et al.* (2009) *Bacillus mojavensis* A21 bakterisinden elde ettiği proteazın detarjan endüstrisi ve tavuk tüyünün hidrolizinde kullanılabilirliğini araştırmıştır. Optimum pH'nın 8-11 ve optimum sıcaklığın da 60°C olduğunu belirtmiştir. Saf proteazın iyonik olmayan (%5 Tween 80 ve %5 Triton X-100) ve iyonik olan (%1 SDS) sürfanktantlara ve okside edici ajanlara karşı stabilite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Çeşitli katı (7 mg/ml) ve sıvı (%1; v/v) deterjanlarda 30-50°C arasında etkili bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Prakasham *et al.* (2006) bitkisel atıklar üzerinde katı hal fermentasyonunda *Bacillus sp* bakterisiyle alkalın proteaz üretimini gerçekleştirmiştir. %1,5 maltoz ve %2 Maya ekstratı ilavesinin kontrole oranla %371'lik enzim artışı sağladığını, inorganik azot kaynaklarının da az da olsa enzim üretimini azalttığını belirtmiştir. Diğer en uygun

fermantasyon parametrelerinin ise pH 9.0, %140'lık nem ve 60 saatlik inkübasyon süresi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Diğer taraftan enzim üretiminin bakteri büyümesiyle alakalı olduğunu da rapor etmiştir.

Adinayara *et al.* (2003) *Bacillus subtilis* PE-11 bakterisinden sıcaklığa karşı dayanıklı olan alkalın proteazı amonyum sülfat muamelesi ve Sephadex G-200 jel kromatografisi ile saflaştırmıştır. Enzimin sodyum dodecyl sulfat poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) de düşük moleküler ağırlığa sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aynı enzimin substrat olarak kazein varlığında 60°C ve pH 10'da en aktif olduğunu belirtmiştir. Enzimin 350 dakikalık inkübasyondan sonra bile 60°C yaklaşık olarak %100 stabil kaldığını rapor etmiştir. Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının enzimin aktivitesini artırdığını göstermiştir. Diğer taraftan phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF) ve diisopropyl fluorophosphates (DFP)'in enzimi inhibe ettiği fakat ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)'nın enzim üretimi üzerine hiçbir inhibisyon etkisi oluşturmadığını belirtmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu farklı cold aktif lipaz üreten mikroorganizmalar için çeşitli üretim parametleri belirtilmiştir. Bunlara örnek olarak; *Bacillus sphaericus* MTCC 7526 bakterisinde cold aktif lipaz üretim aktivite parametreleri, karbon kaynağı olarak laktoz/tributyryn, azot kaynağı olarak pepton kullanılarak pH 8, sıcaklık 15°C, inkübasyon süresi 48 saat olarak belirtilmiştir. *Microbacterium phyllosphaerae* MTCC 7530 bakterisinde cold aktif lipaz üretim aktivite parametreleri ise, karbon kaynağı olarak tributyryn/laktoz, azot kaynağı olarak pepton kullanılarak pH 8, sıcaklık 15°C, inkübasyon süresi 36 saat olarak belirtilmiştir (Joseph 2006)

Araştırmacılar, mevcut çalışmalarında Antartika'da deniz sedimentlerinden izole ettikleri psikrotolerant özelliğe sahip *Guehomyces pullulans* mayası ile β -galaktosidaz enzimini üretmeyi amaçlamıştır. Besiyeri ve kültür koşullarının optimizasyonundan sonra, maya suşunun flask (erlenmayer) ortamında 120 saatlik optimum inkübasyon periyodunda 17.2 U/mL, 2 L'lik fermentör ortamında ise 144 saatlik inkübasyon periyodunda 25.3 U/mL β -galaktosidaz ürettiğini belirlenmiştir. Üretilen enzimin

aktivitesi için en iyi pH değerinin 4, en iyi sıcaklığın ise 50°C olduğunu rapor etmişlerdir (Song *et al.* 2010).

Taskin *et al.* (2015) çalışmasında psikrotolerant mayalarla proteini giderilmiş peynir altı suyundan lipit üretimini gerçekleştirmeyi amaçlamıştır. İzole edilen toplam 11 maya suşu arasında en iyi lipit üretici izolatı B9 olarak belirlemiş ve bu izolatı da *Yarrowia lipolytica* olarak teşhis etmiştir. *Y. lipolytica* B9 ile maksimum lipit üretimi için optimum kültür koşullarını 3 ml'lik inokulum hacmi, pH 5.5, 15°C'lik sıcaklık, 15 g/L'lik ilave laktoz konsantrasyonu ve 120 saatlik inkübasyon periyodu olarak tespit etmiştir. Diğer taraftan, ilave azot ve fosfor kaynaklarının lipit üretimini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. 15°C'de üretilen lipitlerin doymuş ve doymamış yağ asidi içerikleri sırasıyla %19.46 ve %80.54 olarak tespit edilmiştir. Mayanın yağ asitlerini oleik asit (%54.76), palmitik asit (%19.46), palmitoleik asit (%17.76) ve cis-10-heptadekanoik asit (%8.02) olarak rapor edilmiştir.

Amaretti *et al.* (2010) psikrofilik özelliğe sahip oleaginous *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 mayasının sıcaklığa ve glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak yağ asidi profilinin değişimini araştırmıştır. Mayanın -3°C ve +20°C aralığındaki sıcaklıklarda geliştiğini belirtmişlerdir. Artan glikoz konsantrasyonunun diğer bir değişle yüksek karbon/azot oranının lipogenezi artırdığını göstermişlerdir. 120 g/L glikoz konsantrasyonunda 19 g/L lipit üretilbildiğini ve kuru ağırlık bakımından bu lipit miktarının biyokütlenin %68'ini meydana getirdiğini ifade etmişlerdir. Yüksek glikoz konsantrasyonu ve sıcaklıklarda doymamış yağ asitlerinin üretiminin azaldığını belirtmişlerdir.

Taskin (2013), persimmom meyvesinden tannaz ve pektinaz aktivitesi yüksek olan olan yeni bir *Rhodotorula glutinis* suşunu lokal olarak izole etmiştir. Bu mayanın pektinaz aktivitesini esas olarak polygalakturonaz enziminin oluşturduğu belirtilmiştir. Bu suşunda pektin metil esterase enzim aktivitesinin mevcut olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bir başka pektinaz grubu enzim olan pektin liyaz enziminin aktivitesinin ise çok az olduğu belirlenmiştir. Mayanın immobilize ve serbest hücreleriyle poligalaktronaz ve

tannaz enzimleri üretilmiştir. Serbest hücreler kullanıldığında poligalaktronaz ve tannaz aktiviteleri 26.9 ve 15.2 U/mL olarak bulunmuştur. İmmobilize hücreler kullanıldığında ise poligalaktronaz ve tannaz aktiviteleri 28.6 ve 19.8 U/mL olarak ölçülmüştür. İmmobilize hücrelerin 13 kez tekrarlı olarak enzim aktivitesinde kayıp olmadan kullanılabilmiştir. Bununla birlikte, 14-18 kez kullanım sırasında aktivitede biraz azalmanın olduğu belirlenmiştir. 18. tekrarın sonunda toplam 503.1 U/mL poligalaktronaz, 349.6 U/mL tannaz üretildiği belirtilmiştir.

Araştırmacı, bu çalışmasında protein içeriği bakımından zengin böceğin (*Locusta migratoria*) *Geotrichum candidum* OC-7 mayasıyla invertaz enzimi üretiminde substrat olarak kullanılabilirliğini test etmiştir. Üretiminde verimi artırmak için sonuçları Taguchi istatistik metoduna göre de optimize etmiştir. Bu metotta dört faktörü (böcek biyokütle konsantrasyonu, sükröz konsantrasyonu, pH ve fermentasyon zamanı) analiz etmiştir. İvertaz üretimi için optimum parametreleri 30 g/L böcek biyokütle, 20 g/L sükröz, pH 6.0 ve 48 saatlik inkübasyon periyodu olarak belirlemiştir. Kültürdeki enzim aktivitesi (30.12 U/ml), Taguchi yöntemi ile tahmin edilen enzim aktivitesine (30.56 U/mL) son derece yakın bulunmuştur. Enzim üretimi üzerine en pozitif etki (%71.96) böcek biyokütlesi ve bunun ardından da sükröz (%13.96) için gözlenmiştir (Canli *et al.* 2013).

Aydoğan *et al.* (2014) çalışmasında ekstrasellüler invertaz aktivitesine sahip olan yeni maya suşlarını izole etmeyi denemiştir. İzole ettiği en iyi maya izolatını da sodyum alginat içerisinde immobilize etmiştir. Daha sonra da immobilize edilen hücrelerle tampon sistemlerinde invertaz üretimini gerçekleştirmiştir. Sodyum asetat ve potasyum fosfat tampon sistemlerine oranla tris tampon sisteminde daha yüksek invertaz aktivitesi elde edildiğini belirtmişlerdir. Tris tampon sistemini ise 30 g sükröz şekerini 1 L tris tamponu içerisinde çözerek hazırlamıştır. İmmobilize hücrelerle tris-sükröz tampon sisteminde invertaz üretimi için optimal sıcaklık, pH ve inkübasyon sürelerini sırasıyla 35°C, pH 8.0 ve 36 saat olarak belirlemiştir. Bu koşullar altında maksimum invertaz aktivitesi 28.4 U/mL olarak belirlenmiştir. İmmobilize hücreler hiçbir aktivite kaybı olmadan steril tamponda art arda 14, steril olmayan tamponda ise 12 kez

kullanılabilmektedir. Bu sayede de üretimin steril olmayan tampon sisteminde de yapılabileceğini göstermişlerdir.

Mukhopadhyay *et al.* (2005) *Aspergillus niger* küfünün serbest ve immobilize edilmiş hücreleriyle glukonik asit üretmeyi denemiştir. Immobilizasyon için poliüretan köpük kullanmıştır. Immobilize edilmiş hücrelerle %9.5 laktoz ve %0.5 glikoz içeren peynir altı suyu ortamında 92, serbest hücreler ile 69 g/L glukonik asit üretilebileceği gösterilmiştir.

Shivakumar (2012), çalışmasında *Bacillus* sp. Y bakterisinin serbest ve immobilize hücrelerini kullanarak amilaz ve alkalın proteaz enzimlerinin birlikte üretimini (co-production) test etmiştir. Her iki enzimin üretiminin sodyum alginat ile immobilize edilmiş hücreler kullanıldığında arttığını belirlemiştir. Maksimum amilaz üretimi %4'lük, maksimum proteaz üretimi ise %2'lik sodyum alginatla başarılmıştır. Immobilize hücrelerin serbest hücrelere oranla amilaz üretiminde 1.21, proteaz üretiminde ise 2 katlık bir artış sağladığı gösterilmiştir. Immobilizasyon yönteminin amilaz ve proteaz üretimi için gerekli olan inkübasyon süresini de azalttığı tespit edilmiştir. Serbest hücreler kullanıldığında 1232 U/mL amilaz aktivitesinin 24 saatte, immobilize hücreler kullanıldığında ise 1196 U/mL aktivitenin 24 saatte, serbest hücrelerle 23 U/mL'lik proteaz aktivitesine 72 saat, immobilize hücrelerle 47 U/mL'lik proteaz aktivitesine ise 16 saat içerisinde ulaşılabileceği belirtilmiştir. Maksimum enzim aktiviteleri için 100 adet yatak sayısının en elverişli olduğu belirtilmiştir.

Kamzolova *et al.* (2005) çalışmasında farklı *Yarrowia (Candida) lipolytica* suşlarını kullanarak hayvansal ve bitkisel orijinli (kolza) yağlar üzerinde lipaz ve sitrik asit üretimini test etmiştir. Test edilen 30 maya arasında maksimum lipaz üretimi (2760 U/mL) *Y. lipolytica* 704, fakat maksimum sitrik asit üretimi ise *Y. lipolytica* 187/1 ile elde edilmiştir. Lipaz ve sitrik asit üretimi için kolza yağının ve bu yağında 5 gr/lt üzerindeki konsantrasyonlarının daha uygun olduğu gösterilmiştir.

Loperena *et al.* (2012) Antartika'da izole edilen mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstrasellüler enzimler araştırılmıştır. Antartik ortamlarda psikrofil veya psikrotrof olarak da bilinen mikroorganizmaların iyi bir şekilde hayatlarını sürdürülebildiği görülmüştür. Instituto Antartico Uruguayo tarafından Antarktika da yapılan çalışmalarda 518 çeşit Antarktika mikroorganizması izole edilmiştir. Çalışmalar sırasında hava, buz, deniz ve tatlı su, toprak, sediment, kuş ve deniz hayvan dışkısı, ölü hayvanlar, yosun, bitki, kaya ve mikrobiyal paspaslar içinde asılı partiküllerden örnekler alınmıştır. Yapılan çalışmada Antartika'da izole edilen 161 tane mikroorganizmaların (120 bakteri, 31 maya ve 10 ipliksi mantarlar) enzimatik aktiviteleri rapor edilmiştir. Enzimatik performansları 4 ile 20°C'de değerlendirilmiştir. Maya ve bakterilerin çoğu 4°C'ye göre 20°C'de daha iyi büyüdüğü gözlemlenmesine rağmen mantarlarda ise tam tersi görülmüştür. Çalışmalar sırasında bakterilerde çoğunlukla amilaz, lipaz ve proteaz aktiviteleri bulunmuştur. İzole edilen mayalar ve mantarlarda ise lipaz, selüloz ve jelatinaz aktiviteleri gözlemlenmiştir. Çalışmalarda *Pseudomonas* spp., *Psychrobacter* sp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* sp. ve *Carnobacterium* sp gibi izole edilen bakterilerin enzimatik aktiviteleri 16S rRNA ile tanımlanmıştır. Birden fazla enzimatik aktivite gösteren maya ve mantar türleri ise *Cryptococcus victoriae*, *Trichosporon pullulans* ve *Geomyces pannorum* türlerine ait olduğu yapılan çalışma sırasında belirlenmiştir.

Ertugrul *et al.* (2007) zeytinyağı atık sularından lipaz üretme kapasitesine sahip *Bacillus* sp. izole etmiş ve bu bakteri ile lipaz üretimi için kültür şartlarının optimizasyonunu gerçekleştirmiştir. Deneysel sonucunda maksimum lipaz aktivitesinin pH 6'da gerçekleştiğini belirlemiştir. Triolein, trimiristin, trilorin, tricaprın, trikaprilin, tributyrin, triasetin, Tween-80, OMW, glukoz, ve peynir altı suyu gibi farklı bileşimler kullanıldığı ortamlar arasında en fazla lipaz aktivitesi %20 peynir altı suyu + %1 Trioleinde bulunmuştur.

Haba *et al.* (2000) yılında yapılan başka bir çalışmada ise seçici substrat olarak kızartma yağı kullanılarak lipaz salgılayan bakterilerin izolasyonu araştırılmıştır. Çalışma sırasında 47 çeşit bakteri ve maya incelenmiş olup bunlardan *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus*, and *Staphylococcus* atık yağda üreyerek lipolitik aktivite

göstermiştir. *Pseudomonas* sp. 3AT ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 111 ise sırasıyla 2748 U/L ve 1703,8 U/L ile en fazla üremeyi gösterdiği bulunmuştur.

Veerapagu *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada ise toprağa dökülen yağlar üzerinden bakteriyel lipaz izlemesi, üretimini, seçilmesi, tanımlanması, üretimi ve optimizasyonu araştırılmıştır. Çalışma sırasında yağ işleme fabrikalarından yağ dökülen topraktan bakteriyel lipaz üreticileri izole edilmiştir. Çalışmalar sırasında izole edilen 20 tane türün bir tanesi morfolojisine, fizikokimyasal özelliklerine göre ve 16s rRNA dizisi göz önüne alınarak diğerlerine göre daha fazla lipaz aktivitesi göstermiştir. Çalışmada kuluçka süresi, ortam pH'ı, sıcaklık, çalkalama, inokulum, konsantrasyon, karbon ve azot kaynağının lipaz üretimine etkileri incelenmiştir. Bir lipaz üreten bakteri olan BLP2 *Pseudomonas gessardii*'nin 37°C, pH 7 ve 48 saat sonunda maksimum lipaz ürettiği çalışmalar sırasında gözlemlenmiştir. Aynı bakteri ortama %1 proteaz pepton eklendiği zaman enzimatik üretimin 168,7 Uml-1 olarak arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Pseudomonas gessardii*'nin endüstriyel düzeyde ekstraselüler lipaz üretiminde çok uygun olduğu görülmüştür.

Mobarak *et al.* (2011) tarafından yapılan çalışma sırasında lipaz üretiminde yeni olarak tanımlanan *Pseudomonas aeruginosa* KM110 bakterisinin izolasyonu ve tanımlanması yapılmıştır. En fazla lipaz aktivitesine sahip olan bakterinin biyokimyasal ve 16S rRNA gen dizisi ile belirlenmiştir. Çalışmalarda genel olarak 3 kat artırılmış lipaz üretimi (0,76 U mL⁻¹) üretim ortamının koşullarının iyileştirilmesinden sonra elde edilmiştir. Maksimum enzim üretimi için substratın zeytin yağı ve pepton olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalarda maksimum lipolitik aktivite 45°C'de gözlemlenmiştir. pH 8 ise en yüksek stabilite olmasına rağmen aktivite gözlemlenmemiştir. Çalışmalarda pH 7,0-10,0 aralığında aktivite gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar sırasında ortamda bulunan 1 mM %32 lik Zn⁺² ve %27'lik Cu⁺² lipaz aktivitesini inhibe etmektedir. Ortamda bulunan %1'lik SDS (Sodyum dodesil sülfat, bir çeşit biyolojik deterjan) %29 oranında enzim kaybına yol açtığı gözlemlenmiştir. Fakat Triton X-100, Tween-80 ve DMSO'nun inhibisyona herhangi önemli bir etkisi yapılan çalışmalarda gözlemlenmemiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Mayaların İzolasyonu

Mevcut çalışmada, maya izolasyonu 2014 ve 2015 yılları kış sezonunda Erzurum ilinde buz altından toplanan toprak örneklerinden gerçekleştirilmiştir. İzolasyon besiyeri 20 ml/ L tributyrin, 3 g/L amonyum sülfat, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L MgSO_4 , 0.01 g/L CaCl_2 , 0.01 g/L NaCl, 0.003 g/L FeSO_4 , 20 g/L agar-agar ve 1ml/L iz element solüsyonu (8 mg/L ZnSO_4 , 6 mg/L MnSO_4 and 0.3 mg/L CuSO_4) içerecek şekilde dizayn edilmiştir. Besiyerinin pH'sı mayaların gelişmesine imkan verebilecek olan 6.0'lık değere ayarlanmıştır. Mayaların izolasyonu için her toprak örneğinin 1 gr'mı 10 ml steril fizyolojik su içerisinde çözülmüş ve elde edilen süspansiyon vorteks edildikten sonra yine steril fizyolojik su ile seyreltilmiştir. Daha sonra, hazırlanan 10^{-3} lük dilüsyon örneğinin 0.1 ml'si steril bir eküvyon yardımıyla petriyer içerisindeki izolasyon besiyeri (15 ml) üzerine yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan çok sayıda besiyeri aşılandıktan sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon periyodu içerisinde besiyeri üzerinde gelişen mayalar yine izolasyon besiyeri üzerinde alt kültüre alınarak saflaştırılmıştır. En son olarak saflaştırılan izolatlar kullanılıncaya kadar malt ekstrat agar (MEA) besiyeri içeren yatık agar kültüründe $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2. Mayaların Lipaz Üretme Yetenekleri Açısından Taranması

Bu aşamada saflaştırılan 42 izolat lipaz üretme yetenekleri açısından ön tarama (screening) işlemine tabi tutulmuştur. Tarama işlemlerinde bazal besiyerinin 100 ml'sini içeren 250 ml'lik flasklar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bazal besiyerine izolasyon besiyerinden farklı olarak tributyrin yerine atık kızartma yağı lipaz substratı olarak konulmuştur. Yine izolasyon besiyerinden farklı olarak bazal besiyerine agar ilavesi yapılmamıştır. Bu besiyerinde pH'sı yine 6.0'a ayarlanmıştır.

Tarama işleminden önce her maya izolatu için malt ekstrat broth (MEB) besiyerinin 100 ml'sini içeren flasklar içerisinde ön kültür (seed culture) hazırlanmıştır. Ön kültür hazırlanması sırasında inkübasyon süresi 48 saat, çalkalama hızı 150 rpm ve inkübasyon sıcaklığı 15°C olarak seçilmiştir. İnkübasyon periyodunun sonunda eşit inokulasyonun sağlanması açısından her izolat için kültür ortamının yoğunluğu 600 nm'de 2.0 absorbans'a ayarlanmıştır. Daha sonra bu yoğunluğa sahip kültürlerin 1 ml'si tarama besiyerinin aşılama amacıyla kullanılmıştır. Tarama çalışmaları sırasında besiyerleri ilk önce otoklavda steril edilmiş ve 15°C'de soğumaya bırakılmıştır. Soğuma işleminin ardından yukarıda belirtilen miktarda ön kültürler aşılanmıştır. Aşılanan besiyerleri de çalkalamalı inkübatörde yine 48 saat süreyle, 150 rpm ve 15°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda kültürden alınan örnekler lipaz aktivitesi bakımından analiz edilmiştir. Tarama deneyleri sonucunda en iyi lipaz üretici izolatu HL25 kodlu maya olduğu tespit edilmiştir. Bu maya izolatu VITEK 2 sistemi kullanılarak *Rhodotorula glutinis* olarak teşhis edilmiştir. Çalışmanın takip eden aşamaları bu maya ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. Serbest Hücrelerle Lipaz Üretimi

Çalışmanın bu aşamasında lipaz üretici en iyi izolat olan *R. glutinis* HL25'in serbest hücreleri kullanılmıştır. Serbest hücrelerle üretim çalışmaları yine tarama besiyeri (bazal besiyeri)'nin 100 ml'sini içeren 250 ml'lik flasklar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tarama deneylerinde olduğu gibi bu aşamada da test mayası için MEB besiyeri içerisinde ön kültür hazırlanmış ve steril bazal besiyeri bu ön kültürle aşılanmıştır. Serbest hücrelerle lipaz üretimi boyunca sırasıyla en uygun sıcaklık (10, 15, 20, 25, 30 and 35°C), pH (pH 3-9), inokulum hacmi (1-5 ml/100 ml ya da 10-50 mL/L), atık yağ konsantrasyonu (10-60 mL/L), sürfaktant konsantrasyonu (Twee- 80 ve Triton X-100 için 1-12.5 mL/L arası) ve inkübasyon süreleri (12 saat aralıkla 108 saate kadar) test edilmiştir. Bu aşamadaki deneyler çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'lik çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir.

3.4. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle lipaz Üretimi

İmmobilize hücrelerin hazırlanması için ilk önce toplam 2 litre MEB besiyeri hazırlanmıştır. 2 L besiyeri her flaskta 250 mL besiyeri olacak şekilde 500 ml'lik flasklara (toplam 8 flask) eşit olarak dağıtılmıştır. Bu besiyerleri maya ön kültürü ile aşılıdıktan sonra çalkalamalı inkübatörde yine 48 saat süreyle, 150 rpm ve 15°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda kültürün tamamı (2 L) santrifüj edilmiş (5000 rpm de 10 dk süreyle) ve elde edilen ıslak hücreler steril fizyolojik su ile yıkandıktan sonra immobilize hücre yataklarının hazırlanması için kullanılmıştır. İmmobilizasyon için üç farklı beher kullanılmıştır. 1. beher içerisinde 100 ml steril fizyolojik suda %3'lük konsantrasyonda sodyum alginat (sodyum alginik acid, kod: aldrich 180947) çözülmüştür. Çözme işlemi sırasında sodyum alginat matriksinin daha iyi karışmasını sağlamak için su banyosu içerisinde sıcaklık uygulaması yapılmıştır. 2. beherde 100 ml steril fizyolojik su içerisine 20 gr ıslak maya hücresi aktarılmıştır. Üçüncü beherde ise 1 lt kalsiyum klorid solüsyonu (% 2.5'lik) hazırlanmıştır. Beherler içerisindeki karışımlar hazırlandıktan sonra, 2. beherdeki mikroorganizma süspansiyonu 1. behere aktarılıp maya hücrelerinin matriksle iyice karışması sağlanmıştır. 1. Beherdeki son maya hücresi+matriks karışımı (200 mL) enjektörle çekilip üçüncü beherdeki kalsiyum klorid solusyonuna 5-10 cm yükseklikten damlalar halinde bırakılmıştır. Üçüncü beherde oluşan yatakların iyice sertleşmesi için bu yataklar 20 dk süreyle solüsyon içerisinde bekletilmiştir. Elde edilen yaklaşık 3 mm çaplı immobilize hücre yatakları (yaklaşık 120 g) steril fizyolojik su ile yıkandıktan sonra kullanılıncaya kadar buz dolabında saklanmıştır (Taskin 2013; Aydoğan *et al.* 2014; Arslan 2015).

İmmobilize edilmiş hücrelerle lipaz üretimi, serbest hücrelerle lipaz üretiminde olduğu gibi tarama besiyeri (bazal besiyeri)'nin 100 ml'sini içeren 250 ml'lik flasklar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Üretim çalışmaları sırasında immobilize hücreler için sırasıyla en uygun sıcaklık (10, 15, 20, 25, 30 and 35°C), pH (pH 3-9), yatak miktarı (50-250 g/L), atık yağ konsantrasyonu (10-60 mL/L), sürfaktant konsantrasyonu (Tween 80 ve Triton X-100 için 1-12.5 mL/L arası) ve inkübasyon süreleri (12 saat aralıkla 108 saate kadar)

test edilmiştir. En son olarak da belirlenen optimum koşullarda immobilize edilmiş hücrelerin (yatak=beads) art arda kaç kez kullanılabileceği araştırılmıştır (Garbayo *et al.* 2004; Ahmed 2008; Aydoğan *et al.* 2014; Unver *et al.* 2015)

3.5. Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İnkübasyon süresinin sonunda kültürlerden alınan 10 ml örnek 5000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve ardından hücreler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant lipaz kaynağı olarak kullanılmıştır. 15 ml'lik santrifüj tüpüne 100 µl numune, 1000 µl substrat (0,013 M p-nitrofenil palmitat) ve 1000 µl tampon (0,05 M K₂HPO₄ tamponu pH 8) eklenerek 30°C'de 5 dk inkübe edilecektir. Reaksiyonun durması için 2000 µl 0,5 M Na₂CO₃ çözeltisi eklenecek ve 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir (Hung *et al.* 2003). Süpernatantın 410 nm'de absorbansı ölçülmüş ve enzim aktivitesi 15,000 (µM-1cm-1) absorbtivite katsayısı kullanılmıştır

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma, her bir uygulamadan en az üç örnek (3 paralel) yapıldıktan sonra elde edilen en az 3 değerın ortalaması sonuç olarak kabul edilmiştir. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 13.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış, P<0.05 önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Lipaz Üreten Mayaların İzolasyonu ve Taranması

Farklı toprak örneklerinden gerçekleştirilen izolasyon çalışmaları sonucunda besiyeri üzerinde gelişen maya kolonileri alt kültüre alınarak saflaştırılmış ve bu şekilde toplam 42 maya izole edilmiştir. Bu maya izolatları daha sonra tarama deneyine tabi tutularak en iyi lipaz üretici izolatın belirlenmesine çalışılmıştır. 15°C'lik sıcaklıkta gerçekleştirilen tarama deneyleri sonucunda 34 izolatın 9.0 U/L'nin altında 8 izolatın ise bu değer üzerinde lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden Çizelge 4.1'de sadece 8 izolatın lipaz aktivite değerleri verilmiştir. 8 izolat arasında ise en iyi lipaz üreticisinin (13.6 U/L) HL25 kodlu kırmızı-turuncu renkli izolatın olduğu belirlenmiştir. Bu izolatta *Rhodotorula glutinis* olarak teşhis edilmiş ve çalışmanın takip eden aşamalarında kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı toprak örneklerinden izole edilen mayaların lipaz aktiviteleri

İzolat kodu	Lipaz aktivitesi (U/L)
HL4	9.8 ^{±0.20f}
HL7	12.9 ^{±0.30b}
HL13	11.5 ^{±0.25c}
HL25	13.6 ^{±0.22a}
HL29	12.7 ^{±0.25b}
HL35	11.8 ^{±0.15c}
HL36	10.9 ^{±0.10d}
HL40	10.2 ^{±0.20e}

*Bütün değerler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda aynı küçük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli değildir ($p \leq 0,05$). Tarama şartları: Sıcaklık=15°C, pH=6.0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi = 48 saat, inoculum hacmi=10 mL/L ve atık zeytin yağı=30 mL/L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir

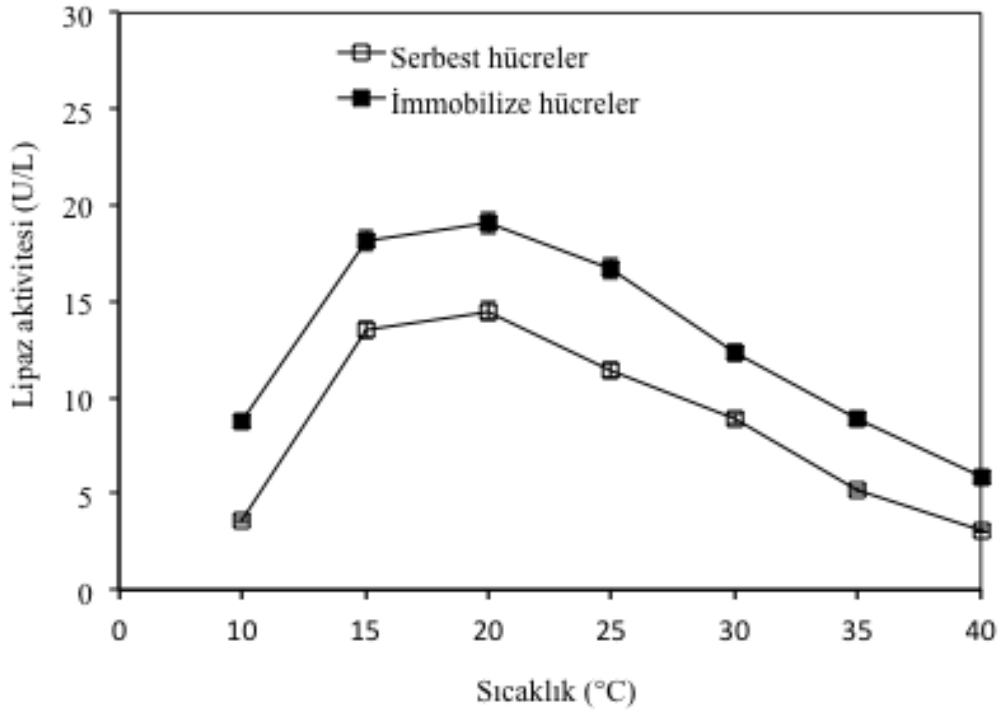
4.2. R. Glutinis HL25'in Serbest ve Immobilize Edilmiş Hücreleriyle Lipaz Üretimi

Çalışmanın bu aşamasında serbest ve immobilize edilmiş hücrelerle lipaz üretimi için ilk olarak en uygun sıcaklık araştırılmıştır. Bunun içinde 10-40°C arasındaki sıcaklıklar test edilmiştir. Çizelge 4.2'den de görülebileceği gibi hem serbest hemde immobilize hücreler için maksimum lipaz aktivitesine (sırasıyla 14.5 ve 19.1 U/L) 20°C'de ulaşılmıştır. Hem serbest hem de immobilize hücreler için ikinci en yüksek lipaz aktivitesi 15°C'de elde edilmiştir. Her iki hücre tipi içinde 10°C'de lipaz aktivitesi tespit edilmiştir. Ayrıca, mayanın hem serbest hem de immobilize hücrelerinin düşük seviyelerde de olsa 35 ve 40°C'de büyüme ve lipaz üretme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, düşük (10°C) ve yüksek sıcaklıkların (40°C) immobilize hücrelerin lipaz aktivitesini daha az etkilediği tespit edilmiştir. Örneğin, sıcaklık 35°C'den 40°C cıkartıldığında serbest hücrelerin lipaz aktivitesinde %40.4, immobilize hücrelerinkinde ise %33.7'lik bir azalma ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Lipaz aktivitesi (U/L)	
	Serbest hücreler	İmmobilize hücreler
10	3.6 ^{±0.07fB}	8.7 ^{±0.22dA}
15	13.5 ^{±0.48bB}	18.2 ^{±1.05aA}
20	14.5 ^{±1.10aB}	19.1 ^{±0.60aA}
25	11.4 ^{±0.40cB}	16.7 ^{±0.20bA}
30	8.9 ^{±0.36dB}	12.3 ^{±0.35cA}
35	5.2 ^{±0.20cB}	8.9 ^{±0.44dA}
40	3.1 ^{±0.15fB}	5.9 ^{±0.40eA}

*Bütün değerler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda aynı küçük harfler, aynı satırda ise aynı büyük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli değildir (p≤0,05). Kültür şartları: pH=6.0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi=48 h, inoculum hacmi=serbest hücreler için 10 mL/L immobilize hücreler içinse 50 g yatak /L ve atık kıvartma yağı=30 mL/L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir.



Şekil 4.1. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

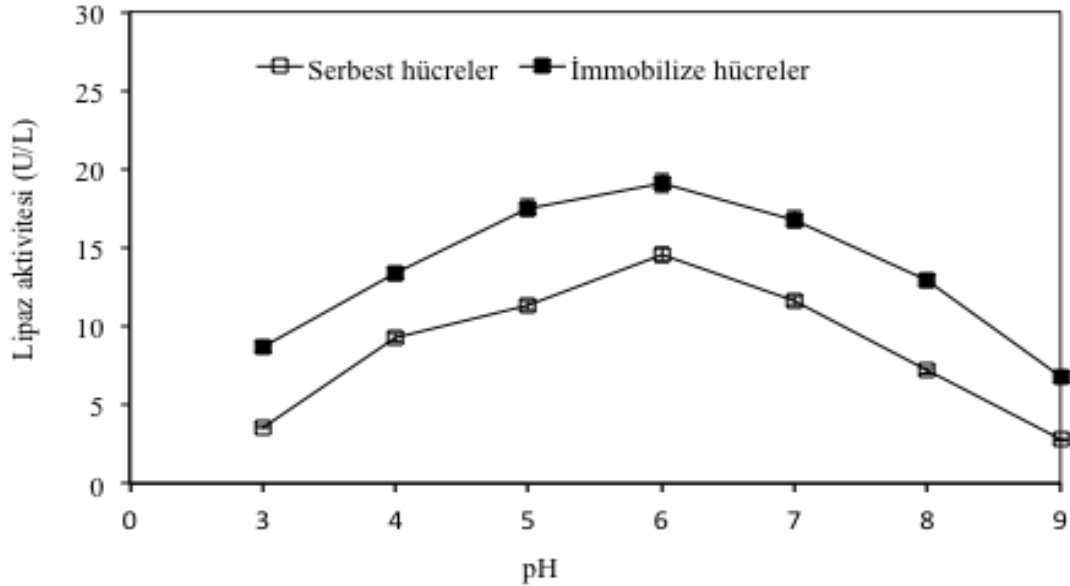
*Kültür şartları: pH= 6.0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi = 48 h, inoculum hacmi= serbest hücreler için 10 mL/L immobilize hücreler içinse 50 g yatak /L ve atık kızartma yağı = 30 mL/L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir

Sıcaklığın ardından test mikroorganizması için en uygun kültür pH'sı araştırılmıştır. Bunun içinde sıcaklık 20°C'de sabit tutularak pH 3-9 aralığı test edilmiştir. Çizelge 4.3'dende görülebileceği gibi test mayası pH 3-9 aralığında lipaz üretme kapasitesine sahip olsa da hem serbest hem de immobilize hücreler için maksimum lipaz aktiviteleri pH 6.0'da elde edilmiştir. Diğer taraftan aşırı asidik ve aşırı alkali pH'ların immobilize hücrelerin lipaz aktiviteleri üzerinde daha az inhibisyon etkisine neden olduğu görülmüştür. Örneğin, besiyerinin pH'sı 8 den 9'a çıkarıldığında serbest hücrelerin lipaz aktivitesinde yaklaşık %61.1'lik bir azalma görülürken bu azalma immobilize hücreler için %47.3 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine pH'nın etkisi

pH	Lipaz aktivitesi (U/L)	
	Serbest hücreler	İmmobilize hücreler
3	3.6 ^{±0.28eB}	8.7 ^{±0.20dA}
4	9.3 ^{±0.30cB}	13.3 ^{±0.55cA}
5	11.3 ^{±0.50bB}	17.5 ^{±0.38bA}
6	14.5 ^{±0.43aB}	19.1 ^{±1.05aA}
7	11.6 ^{±0.45bB}	16.8 ^{±0.35bA}
8	7.2 ^{±0.20dB}	12.9 ^{±0.45cA}
9	2.8 ^{±0.11fB}	6.8 ^{±0.12eA}

*Bütün değerler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda aynı küçük harfler, aynı satırda ise aynı büyük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ($p \leq 0,05$). Kültür şartları: sıcaklık=20°C, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi = 48 h, inoculum hacmi= serbest hücreler için 10 mL/L immobilize hücreler içinse 50 g yatak /L ve atık kızırtma yağı = 30 mL/L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir.

**Şekil 4.2.** Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine pH'nın etkisi

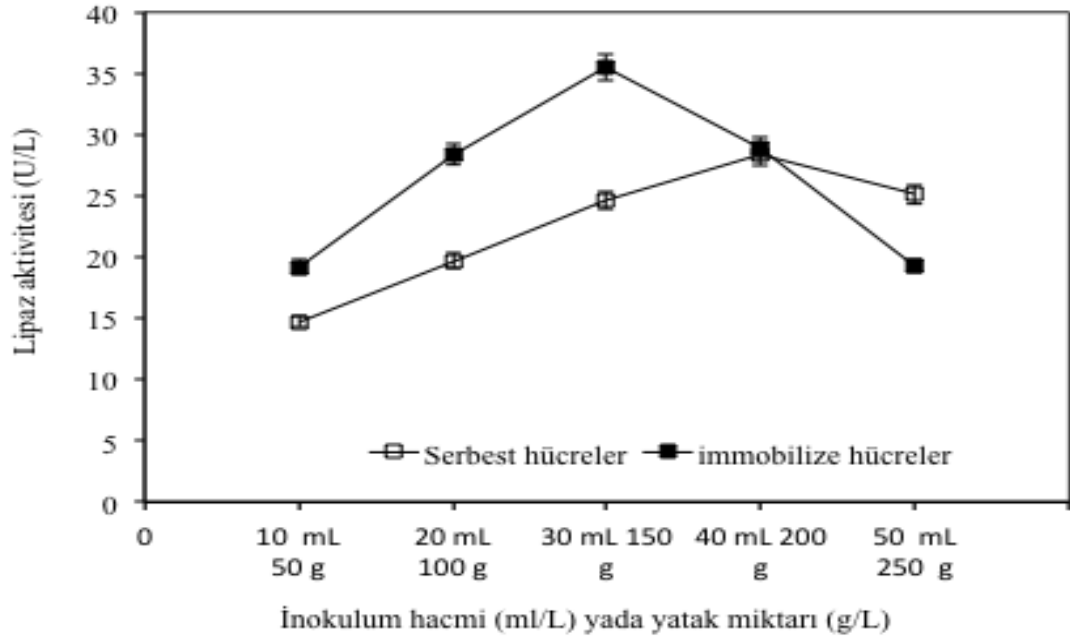
*Kültür şartları: sıcaklık=20°C, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi=48 h, inoculum hacmi=serbest hücreler için 10 mL/L immobilize hücreler içinse 50 g yatak /L ve atık kızırtma yağı=30 mL/L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir.

Çalışmada serbest hücreler için en uygun inokulum hacmi, immobilize hücreler içinde en uygun immobilize hücre konsantrasyonu (yatak miktarı) test edilmiştir. Bu şekilde de serbest ve immobilize hücreler için en uygun hücre yoğunluğu belirlenmeye çalışılmıştır. Çizelge 4.4'den de görülebileceği gibi serbest hücreler maksimum lipaz aktivitesi (28.3 U/L) 40 mL/L inokulum hacminde göstermiştir. Immobilize hücreler içinse maksimum lipaz aktivitesine (35.5 U/L) 150 g sodyum alginat yatağı/1 litre besiyeri eklenen besiyerinde ulaşılmıştır. Daha düşük veya yüksek inokulum hacimlerinin ve yatak sayılarının lipaz aktivitesini azalttığı görülmüştür.

Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine hücre yoğunluğunun etkisi

Serbest hücreler		Immobilize hücreler	
İnokulum miktarı (ml/L)	Lipaz aktivitesi (U/L)	Yatak miktarı (g/L)	Lipaz aktivitesi (U/L)
10	14.7 ^{±0.60d}	50	19.2 ^{±1.03c}
20	19.7 ^{±0.70c}	100	28.4 ^{±0.90b}
30	24.6 ^{±0.90b}	150	35.5 ^{±1.35a}
40	28.3 ^{±1.00a}	200	28.9 ^{±1.00b}
50	25.1 ^{±0.50b}	250	19.3 ^{±0.70c}

*Bütün değerler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda aynı küçük harfler, aynı satırda ise aynı büyük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ($p \leq 0,05$). Kültür şartları: sıcaklık=20°C, pH 6.0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi=48 h ve atık kızırtma yağı=30 mL/L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir.



Şekil 4.3. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine hücre yoğunluğunun etkisi

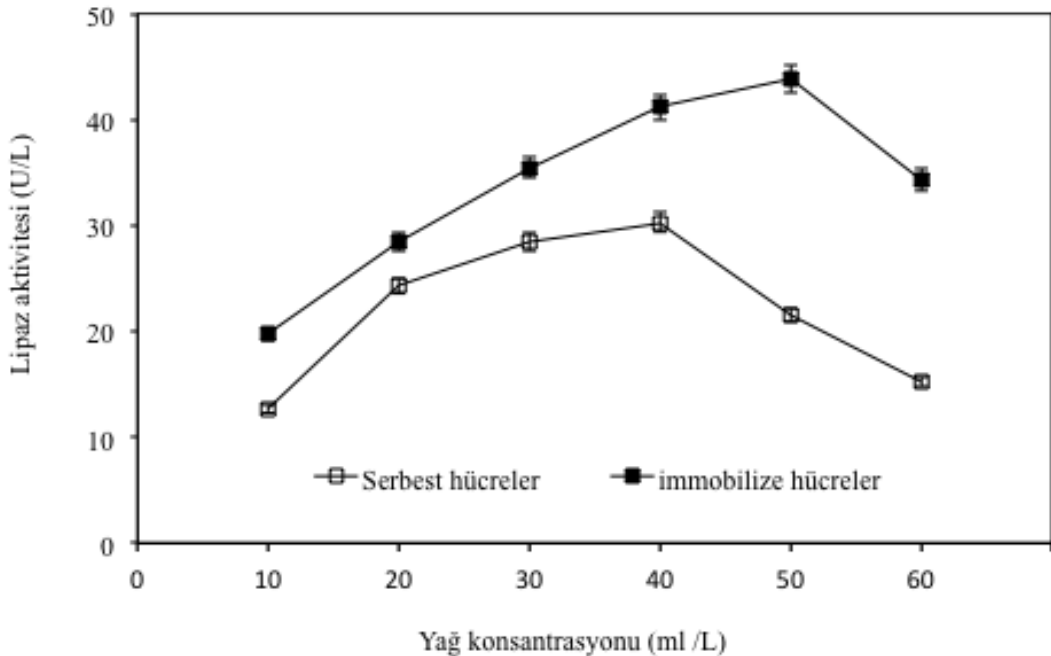
*Kültür şartları: sıcaklık=20°C, pH 6.0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi=48 h ve atık kızartma yağı=30 mL/L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir.

Serbest ve immobilize hücrelerin lipaz aktivitesi üzerine 10-60 ml/L konsantrasyonlarında atık kızartma yağının etkisi de araştırılmıştır. Deneyle sonuçunda, yağ konsantrasyonunun hem serbest hem de immobilize hücrelerin lipaz aktivitesini önemli ölçüde değiştirdiği tespit edilmiştir. Serbest hücreler için maksimum lipaz aktivitesi (30.3 U/L) 40 mL, immobilize hücreler için ise maksimum lipaz aktivitesi (43.8 U/L) 50 ml yağ eklenmiş besiyerinde elde edilmiştir. Daha düşük veya yüksek yağ konsantrasyonlarında ise lipaz aktivitesini kademeli olarak azalttığı görülmüştür.

Çizelge 4.5. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine atık yağ konsantrasyonunun etkisi

Yağ konsantrasyonu (ml/L)	Lipaz aktivitesi (U/L)	
	Serbest hücreler	Serbest hücreler
10	12.7 ^{±0.55fB}	19.7 ^{±0.54eA}
20	24.3 ^{±0.90cB}	28.4 ^{±0.90dA}
30	28.4 ^{±0.40bB}	35.5 ^{±1.50cA}
40	30.3 ^{±0.70aB}	41.2 ^{±1.20bA}
50	21.6 ^{±0.42dB}	43.8 ^{±1.05aA}
60	15.2 ^{±0.20eB}	34.3 ^{±0.40cA}

*Bütün değerler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütünde aynı küçük harfler, aynı satırda ise aynı büyük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ($p \leq 0,05$). Kültür şartları: sıcaklık=20°C, pH 8.0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi=48 saat ve inokulum hacmi= serbest hücreler için 40 mL/L immobilize hücreler içinse 150 g yatak /L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir.



Şekil 4.4. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine atık yağ konsantrasyonunun etkisi

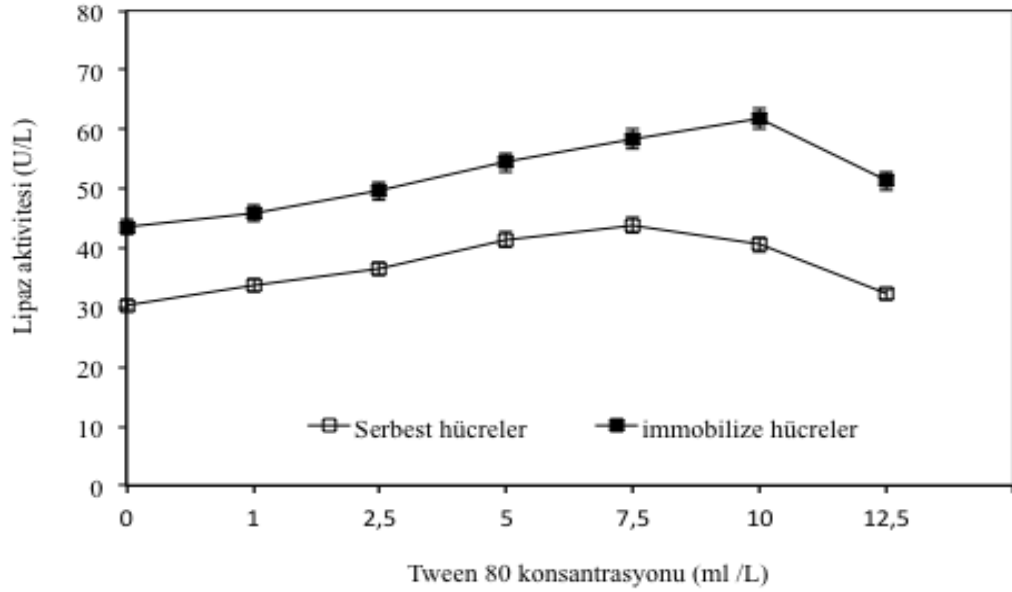
*Kültür şartları: sıcaklık=20°C, pH 8.0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi=48 saat ve inokulum hacmi=serbest hücreler için 40 mL/L immobilize hücreler içinse 150 g yatak /L. Besiyerine surfaktant eklenmemiştir.

Optimal yağ konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, lipaz üretimi üzerine Tween-80 ve Triton X-100 surfaktantlarının etkisi araştırılmıştır. Çizelge 4.5’den de görülebileceği gibi kontrole oranla (surfaktant içermeyen) her iki surfaktantın hem serbest hem de immobilize hücrelerin lipaz aktivitesini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, serbest ve immobilize hücreler için her iki surfaktantın optimal konsantrasyonunun farklı olduğu görülmüştür. Örneğin, serbest hücreler için maksimum lipaz aktivitesine 7.5 mL/L, immobilize hücreler için ise 10 mL/L Tween-80 konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Lipaz üretimi için Triton X-100’ün optimal konsantrasyonu serbest hücreler için 5 mL/L, immobilize hücreler için ise 7.5 mL/L olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, Triton X-100’ün lipaz aktivitesini daha fazla artırdığı görülmüştür. Örneğin serbest ve immobilize hücreler için maksimum lipaz aktiviteleri (sırasıyla 44.5 ve 66.4 U/L) 5 ve 7.5 mL/L Triton X-100 konsantrasyonlarında elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine Tween 80 ve Triton X-100’ün etkisi

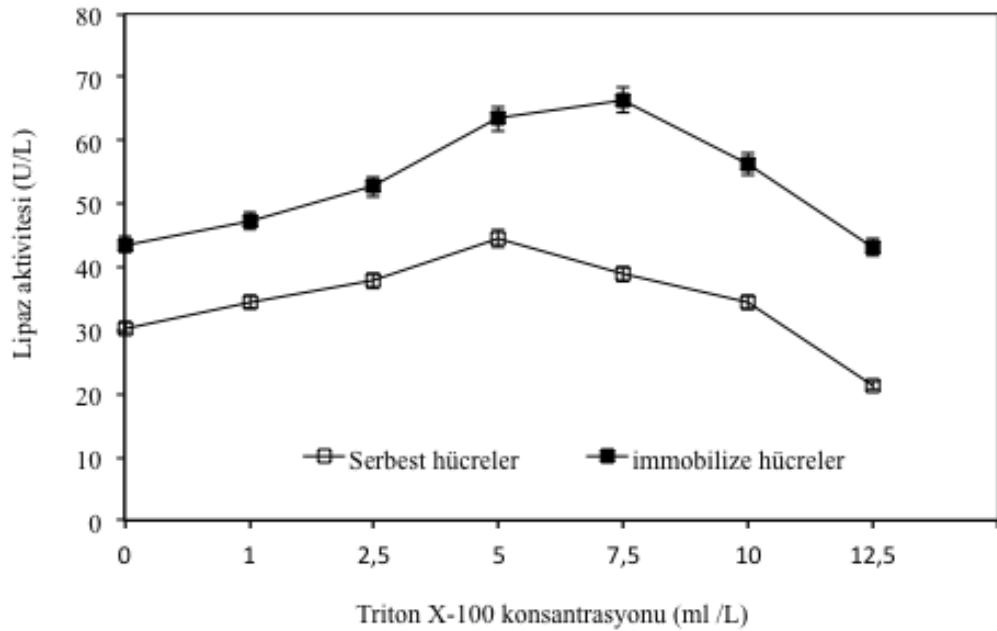
Süfaktant konsantrasyonu (ml/L)	Süfaktant çeşidi	Lipaz aktivitesi (U/L)	
		Serbest hücreler	Serbest hücreler
0	Kontrol (süfaktant içermeyen)	30.4 ^{±0.35jB}	43.6 ^{±0.55IA}
1	Tween 80	33.7 ^{±0.66hB}	45.9 ^{±0.60kA}
2.5		36.5 ^{±0.50fB}	49.6 ^{±0.70IA}
5		41.4 ^{±0.60bB}	54.4 ^{±1.20fA}
7.5		43.9 ^{±0.75aB}	58.5 ^{±1.25dA}
10		40.6 ^{±0.48cB}	61.8 ^{±1.00cA}
12.5		32.2 ^{±0.20iB}	51.3 ^{±0.65hA}
1	Triton X-100	34.6 ^{±0.35gB}	47.4 ^{±0.70jA}
2.5		37.8 ^{±0.45eB}	52.7 ^{±0.52gA}
5		44.5 ^{±0.50aB}	63.4 ^{±0.45bA}
7.5		38.9 ^{±0.60dB}	66.4 ^{±0.40aA}
10		34.3 ^{±0.22ghB}	56.2 ^{±0.75eA}
12.5		21.3 ^{±0.30kB}	43.1 ^{±0.35IA}

*Bütün değerler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda aynı küçük harfler, aynı satırda ise aynı büyük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ($p \leq 0,05$). Kültür şartları: sıcaklık= 20°C, pH=6.0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi = 48 saat, inoculum hacmi= serbest hücreler için 40 mL/L immobilize hücreler içinse 150 g yatak /L ve atık kızartma yağı = 40 mL/L serbest 50 mL/L ise immobilize hücreler için.



Şekil 4.5. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine Tween 80 konsantrasyonlarının etkisi

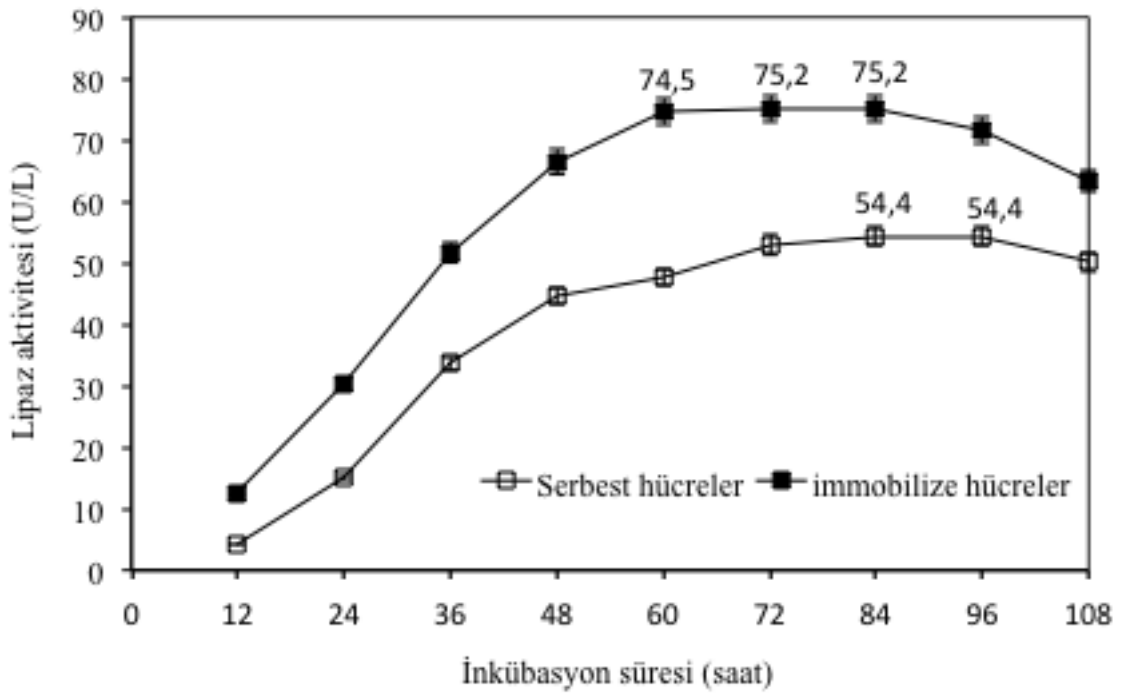
*Kültür şartları: sıcaklık=20°C, pH=6,0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi=48 saat, inoculum hacmi=serbest hücreler için 40 mL/L immobilize hücreler içinse 150 g yatak /L ve atık kızırtma yağı=40 mL/L serbest 50 ml/L ise immobilize hücreler için



Şekil 4.6. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine Triton X-100 konsantrasyonlarının etkisi

*Kültür şartları: sıcaklık=20°C, pH=6,0, çalkalama hızı=150 rpm, inkübasyon süresi=48 saat, inoculum hacmi=serbest hücreler için 40 mL/L immobilize hücreler içinse 150 g yatak /L ve atık kızırtma yağı=40 mL/L serbest 50 ml/L ise immobilize hücreler için

Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi araştırıldığında serbest hücrelerin ilk 12 saat içerisindeki lipaz aktivitesinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Serbest hücrelerin lipaz aktivitesi 12 saatten itibaren kademeli olarak artmaya başlamış ve 84 saat sonra maksimum seviyeye (54.4 U/L) ulaşmıştır. Serbest hücrelerin aksine immobilize hücreler ilk 12 saat içerisinde de yüksek seviyede lipaz aktivitesi (12.6 U/L) göstermiş ve bu hücreler için maksimum lipaz aktivitesine 72 saatin sonunda ulaşmıştır. Serbest hücreler için 84-96, immobilize hücreler içinse 72-84 saatleri arasında lipaz aktivitesinde bir artış yada azalma tespit edilmemiştir. Tam tersine, serbest hücreler için 84 immobilize hücreler içinse 96 saatin üzerindeki inkübasyon sürelerinin lipaz aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

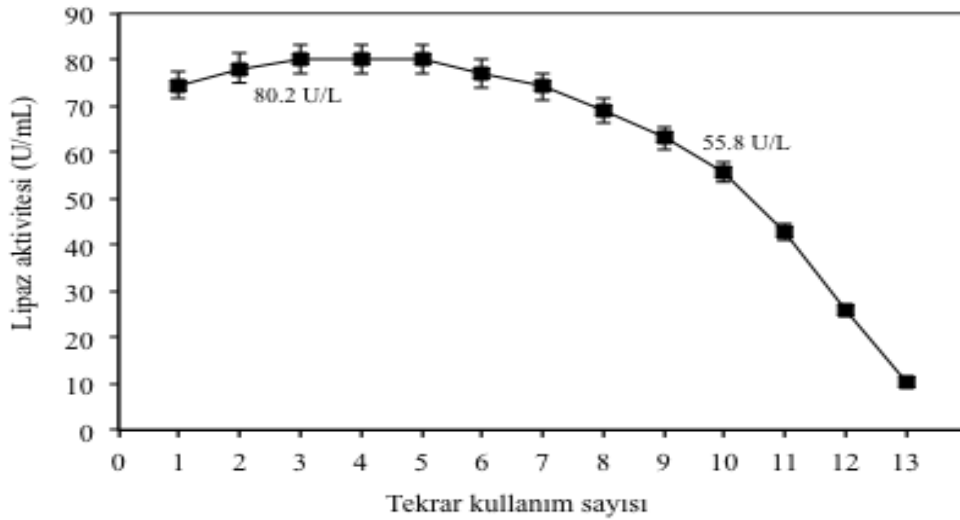


Şekil 4.7. Serbest ve immobilize hücrelerle lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

*Kültür şartları: sıcaklık=20°C, pH=6.0, çalkalama hızı=150 rpm, Triton X-100 konsantrasyonu=serbest ve immobilize hücreler için sırasıyla 5 ml/L ve 7.5 ml/L, inoculum hacmi=serbest hücreler için 40 ml/L immobilize hücreler içinse 150 g yatak /L ve atık kıvartma yağı konsantrasyonu=serbest ve immobilize hücreler için sırasıyla 40 ml/L ve 50 ml/L

Immobilize hücrelerin tekrarlı olarak ard arda kullanılabilme potansiyeli 13 döngü boyunca çalışılmıştır. Her döngü 60 saat sürmüştür. Şekil 4.2'den de görülebileceği gibi

immobilize hücrelerin lipaz aktivitesi ilk döngülerde kademeli olarak artarak 3 döngünün sonuna kadar maksimum değere (80.2 U/L) ulaşmıştır. Ancak, immobilize hücrelerin lipaz aktivitesi 4 ve 5. döngülerde sabit kalmıştır. 6. döngüden itibaren lipaz aktivitesi kademeli olarak azalma göstermiştir. Bununla birlikte 10 döngünün sonunda immobilize hücrelerin maksimum lipaz aktivitesinin (80.2 U/L) yaklaşık olarak %70'ini (55.8 U/L) koruduğu tespit edilmiştir. Tam tersine immobilize hücrelerin lipaz aktivitesinde 11 ile 13. döngüler arasında istatistiksel olarak önemli azalmalar tespit edilmiştir. Örneğin, 13. döngünün sonunda immobilize hücrelerin lipaz aktivitesi sadece 10.4 U/L olarak ölçülmüştür. Sodyum alginat yataklarında ilk üç döngü boyunca bozulma ve yumuşama tespit edilmemiştir. Yataklarda 6 ile 10. döngüler arasında az da olsa bozulma ve yumuşama göze çarpmıştır. Bununla birlikte, 11 ile 13. döngüler arasında yatakların çok fazla yumuşadığı ve parçalandığı tespit edilmiştir. Yine 11 ile 13. döngüler arasında kültür ortamına çok fazla maya hücrelerinin sızdığı mikroskop altında tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. Yatakların tekrar kullanım sayısının lipaz aktivitesi üzerine etkisi

*Kültür şartları: sıcaklık=20°C, pH=6.0, çalkalama hızı=150 rpm, Triton X-100 konsantrasyonu=serbest ve immobilize hücreler için sırasıyla 5 ml/L ve 7.5 ml/L, inoculum hacmi=serbest hücreler için 40 ml/L immobilize hücreler içinse 150 g yatak /L ve atık kızırtma yağı konsantrasyonu=serbest ve immobilize hücreler için sırasıyla 40 ml/L ve 50 ml/L, inkübasyon süresi=60 saat.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Lipaz Üreten Mayaların İzolasyonu ve Taranması

Lipazlar besin, kozmetik, deterjan ve ilaç endüstrilerinin yanı sıra biyodizel üretiminde de katalist olarak kullanılmaktadır. Lipazlar, her ne kadar bitkilerde ve hayvanlarda da mevcut olsa da bu enzimlerin endüstriyel ölçekte üretiminde mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Joseph *et al.* 2008). Lipazların üretiminde de genellikle termofilik ya da mezofilik mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Özellikle termofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar yüksek sıcaklıklarda daha iyi aktivite göstermekte bu yüzden de deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda araştırmacılar soğukta aktif olan lipazlarında bir çok alanda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ileri sürmektedirler. Soğukta aktif olan lipazların 15 ve 20°C gibi düşük sıcaklıklara sahip olan evsel sularda yüksek aktivite göstereceği ve bu yüzden de bulaşık ve çamaşır makinelerinde suyun ısıtılmasına gerek duyulmayacağı belirtilmektedir. Bu sayede de enerji tasarrufu sağlanabileceğini belirtmektedirler. Ayrıca, yüksek sıcaklıklarda yıkandığında giysilerde gözlenen bozulmaların önüne geçilebileceğini açıklamaktadırlar (Joseph *et al.* 2008; Joshi and Satyanarayana 2013; Komesli 2015).

Soğukta aktif lipazların biyosensör hazırlanmasında, organik sentez reaksiyonlarında, biyoremediasyon çalışmalarında, ilaç sanayinde, besin, kozmetik ve besin endüstrilerinde de kullanım alanı bulunduğu açıklanmaktadır (Joseph *et al.* 2008; Joseph *et al.* 2012). Soğukta aktif olan lipazlarında genellikle düşük sıcaklıklarda daha iyi gelişme gösteren mikroorganizmalardan elde edilebileceğini belirtmektedirler. Bu mikroorganizmalarında genellikle kutuplar, buzullar, yüksek dağlar ve derin denizler gibi soğuk bölgelerde yayılım gösterdiği ifade etmektedirler (Joseph *et al.* 2012). Örneğin, *Candida antarctica*, *Cryptococcus victoriae*, *Mrakia psychrophila*, *Leucosporidiella creatinivora*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula glacialis* ve *R. laryngis* gibi mayaların soğuk ortamlarda yaşadığı ve soğukta aktif lipaz ürettiği belirtilmektedir (Xin *et al.* 2007; Vaz *et al.* 2011; Carrasco *et al.* 2012; Khayati *et al.* 2013).

Bu yüzden, mevcut çalışmada da soğukta aktif olan lipazı üreten bir mayayı izole etmek için soğuk habitatlardan izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bunun için de, uzun kış mevsimlerinin hakim olduğu ve ortalama kış sıcaklıklarının çok düşük olduğu (-20 ve 0°C arası) Erzurum şehri seçilmiştir (2014 ve 2015 yılları kış mevsimi). Bu mevsimde Erzurum'un farklı bölgelerinden alınan toprak örnekleri izolasyon kaynağı olarak seçilmiştir. Dahası, steril fizyolojik su içerisinde toprak örneklerinden hazırlanan dilüsyonlar izolasyon besiyeri içeren petripler üzerine yayıldıktan sonra petripler 4°C'lik bir düşük sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Bu sayede de mezofilik ve termofiliklerin gelişmesi engellenerek spesifik olarak soğukta gelişen mayaların izolasyonuna çalışılmıştır. Lipaz substratı olarak tributirin içeren besiyerinde farklı toprak örneklerinden farklı zamanlarda toplam 42 maya izole edilmiştir. Bu mayalar tek karbon kaynağı olarak tributirin içeren besiyerinde gelişme gösterdiğinden dolayı bu izolatların hepsinin lipaz aktivitesine sahip olduğu düşünülmüştür.

Tarama (screening) olarak ifade edilen yöntem bir mikrobiyolojik çalışmada aynı amaç için kullanılacak olan çok sayıda mikroorganizmanın ön elemeye tabi tutularak en uygun olanını belirlemeyi amaçlamaktadır. Tarama işlemi sırasında her mikroorganizma izolatu veya suşu için aynı kültür şartları seçilmekte ve bu şartlar altında reaksiyon gerçekleştirilmektedir. Reaksiyon sonunda en iyi izolat belirlenmekte ve çalışmanın sonraki aşamaları bu izolatla gerçekleştirilmektedir. Tarama deneyleri, düşük performansa sahip izolatları elemeye imkan verdiğinden dolayı iş yükünün ve zaman tüketiminin azaltılması açısından önem arz etmektedir. Örnek bir çalışmada, Anbu *et al.* (2011) lipaz üretme kapasitesine sahip olan 53 bakteri suşu izole etmiş ve ardından bu izolatları tarama işlemine tabi tutarak en yüksek lipaz aktivitesine sahip iki izolatu belirlemiştir. Bu yüzden araştırmacılar çalışmanın ileriki aşamaları için sadece bu iki izolatu kullanmıştır. Veerapagu *et al.* (2013) çalışmalarında 200 bakteri izolatını izole etmiş, bu izolatları lipaz üretme yetenekleri açısından ön tarama işlemine tabi tutmuş, en iyi lipaz üreticisi izolatu belirlemiş (*Pseudomonas gessardii*) ve çalışmanın sonraki aşamalarını sadece bu izolatla gerçekleştirmiştir. Taskin *et al.* (2015) mikrobiyal lipid üretimine yönelik olarak gerçekleştirdiği bir çalışmada farklı toprak örneklerinden 55 maya izole etmiş, tarama deneyleri sonucunda ise en iyi lipit üretici izolatu B9

olduğunu tespit etmiştir. İş ve zaman tüketiminin azaltılması açısından da çalışmanın sonraki aşamalarını sadece B9 izolatu ile gerçekleştirmiştir.

Bu bilgilerin ışığında, mevcut çalışmada da ilk olarak izole edilen 42 maya ön tarama işlemine tabi tutularak en iyi lipaz üretici izolat belirlenmeye çalışılmıştır. Bu aşamadaki deneyler atık yağ ve mineral tuzları içeren besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlardan 34 tanesinin düşük (9.0 U/L'nin altında), 8 tanesinin ise yüksek lipaz aktivitesi sahip olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden Çizelge 4.1'de sadece 8 izolatın lipaz aktivite değerleri verilmiştir. Sekiz izolat arasında da en iyi lipaz üreticisi izolatın HL25 kodlu maya olduğu belirlenmiştir. Bu izolat *Rhodotorula glutinis* olarak teşhis edilmiş ve çalışmanın takip eden aşamalarında kullanılmıştır.

5.2. Rhodotorula Glutinis HL25'in Serbest ve Immobilize Hücreleriyle Lipaz Üretimi

İmmobilize hücrelerin serbest hücrelere oranla bazı önemli avantajları olduğu belirtilmektedir. Bu yüzden, bu proses lipaz, proteaz, pektinaz, tannaz ve pektinaz gibi bir çok ekstrasellüler enzimin üretiminde kullanılabileceği gösterilmiştir (Ferrer and Sola 1992; Hung *et al.* 2003; Ellaiah *et al.* 2004; Taskin 2013; Aydoğan *et al.* 2014; Unver *et al.* 2015). Özellikle sodyum aljinat matrisi içerisinde tutuklamanın basit ve ucuz olmasının yanı sıra toksik olmamasından dolayı hücre immobilizasyonuna dayalı üretim çalışmalarında çok etkili bir şekilde kullanılabileceği belirtilmektedir (Ahmed 2008). Bu yüzden mevcut çalışmada, *R. glutinis* HL25 hücrelerinin immobilizasyonu için sodyum aljinat kullanılmıştır. Çalışma süresince, bu mayanın serbest ve immobilize hücreleri ile lipaz üretimi için kültür parametreleri optimize edilmiştir. *R. glutinis* HL25'in serbest ve immobilize hücreleriyle lipaz üretimi üzerine ilk olarak farklı sıcaklıkların etkisi araştırılmıştır. Deneyler sonucunda, mayanın maksimum lipaz aktivitesini 20°C'de ardından da 15°C'de gösterdiği tespit edilmiştir Hatta mayanın 10°C'de az da olsa lipaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu bulgular da bize test mayasının soğukta aktif olan lipaz enziminin bir kaynağı olabileceğini göstermektedir. Diğer bir ifadeyle, test mikroorganizması maksimum miktarda lipazı 15 ve 20°C'de üretiyorsa bu mayadan

izole edilecek olan lipazda muhtemelen bu sıcaklıklara yakın değerlerde maksimum aktivite gösterecektir. Dolayısıyla, bu mayanın lipazı düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen yıkama işlemlerinde kullanılabilir. Ayrıca, sonuçlar test mayasının psikrotolerant karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Çünkü, literatürde psikrofilik mikroorganizmaların 20°C'nin üzerinde gelişme göstermediğini psikrotolerantların ise sadece düşük sıcaklıklarda değil aynı zamanda 20°C'nin üzerindeki sıcaklıkları da tolere edebildiği belirtilmektedir (Rossi *et al.* 2009).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda sıcaklığın yanı sıra pH'nın da mikrobiyal enzim üretimini önemli ölçüde etkilediği belirtilmiştir (Echevarria *et al.* 1991; Merek *et al.* 1996; Gupta *et al.* 2004; Lin *et al.* 2006; Sumanjelin *et al.* 2013). Bu yüzden, mevcut çalışmada sıcaklığın ardından pH'ında lipaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Deneysel sonucunda mayanın pH 3 ve 9 hariç (bu pH değerlerinde düşük aktiviteler elde edilmiştir) geniş bir pH aralığında lipaz ürettiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, düşük (10°C) ve yüksek sıcaklıklarda (40°C) olduğu gibi çok düşük (pH 3) ve çok yüksek (pH 9) pH değerlerinin de serbest hücrelere oranla immobilize hücrelerin lipaz aktivitesinde daha az inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum immobilize hücrelerin pH ve sıcaklık stresine karşı daha dayanıklı olmasıyla açıklanabilir (Beshay 2003; Unver *et al.* 2015).

Araştırmacılar, kültüre aşılana mikroorganizma yoğunluğunun enzimler dahil birçok mikrobiyal ürünün verimini önemli ölçüde etkilediğini belirtmektedirler. Diğer bir ifadeyle, sadece çok düşük değil aynı zamanda çok yüksek hücre yoğunluklarının da ürün verimini azalttığı belirtilmektedir (Beshay 2013; Ahmed 2008; Shivakumar 2012; Duarte *et al.* 2013). Bu yüzden mevcut çalışmada kültüre aşılama gereken en uygun hücre yoğunluğunu belirlemek için serbest hücreler için inokulum hacmi, immobilize hücreler için ise yatak miktarı optimize edilmiştir. Özellikle, immobilize hücreler için 150 g/L'nin üzerindeki yatak miktarlarının aktiviteyi azalttığı görülmüştür. Bu durum, yüksek yatak konsantrasyonlarında besiyerindeki sıvı oranının azalmasına dolayısıyla yatakların yer değiştirme potansiyelinin düşmesine bağlanmıştır. Yatakların yer değiştirme potansiyeli azaldığı için hücrelerin lipaz substratı olan zeytin yağı ya da

diğer besinsel öğelerle olan teması azalmış ve bu yüzden de lipaz üretimi düşmüş olabilir.

Araştırmacılar, besiyerlerine substrat olarak katılan yağların ve bunların farklı konsantrasyonlarının da lipaz aktivitesini önemli ölçüde etkilediğini rapor etmektedirler (Elibol and Ozer 2001). Mevcut çalışmada da, substrat olarak kullanılan atık yağın hem serbest hem de immobilize hücreler için farklı konsantrasyonları test edilmiştir. Deneyle, serbest hücrelere oranla immobilize hücrelerin daha yüksek yağ konsantrasyonunda maksimum aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Immobilize hücrelerin daha yüksek yağ konsantrasyonunda maksimum aktivite göstermesi serbest hücrelere oranla yatakların daha fazla hücre içermesiyle açıklanmıştır. Literatürde Triton X-100 ve Tween-80 gibi sürfaktantların lipaz üretimini teşvik ettiği belirtilmektedir. Bununla birlikte bu maddelerin çok yüksek konsantrasyonlarının lipaz üretimi üzerinde inhibisyon etkisi oluşturabileceği de rapor edilmektedir (Sharma *et al.* 2001; Anbu *et al.* 2011). Bu yüzden mevcut çalışmada lipaz üretimi üzerine Triton X-100 ve Tween-80'nin farklı konsantrasyonlarının etkisi de test edilmiştir.

Deneyle her iki sürfaktantın da uygun konsantrasyonlarda eklendiğinde lipaz üretimini artırdığını ortaya çıkarmıştır. Bu sürfaktantların lipaz üretimi üzerine pozitif etkisi önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi sürfaktantların hücre membranlarının geçirgenliğini artırmasıyla açıklanmıştır (Galabova *et al.* 1996; Dalmau *et al.* 2000; Silva *et al.* 2005). Çok yüksek sürfaktantlarının lipaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi ise aşırı hücre geçirgenliğine bağlı olarak hücre canlılığının kaybolmasına bağlanmıştır. Diğer taraftan, serbest hücrelere oranla immobilize hücrelerin lipaz aktivitesinin yüksek sürfaktant konsantrasyonlarından daha az inhibe olduğu görülmüştür. Bu durum ise sodyum alginat matriksinin koruyucu bir tabaka olarak işlev görmesiyle açıklanmıştır.

Literatürde, lipazlar dahil ekstrasellüler enzimlerin üretimini inkübasyon süresinin son derece etkilediği belirtilmektedir (Mahanta *et al.* 2008; Taskin 2013; Aydogan *et al.* 2014). Bu yüzden mevcut çalışmada, lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi de test edilmiştir. Kültürün ilk 12 saatinde serbest hücreler için çok düşük lipaz aktivitesi tespit edilirken, aynı inkübasyon süresi içerisinde immobilize hücrelerin kayda değer ölçüde bir lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, serbest hücreler için 84, immobilize hücreler içinse daha kısa süreli (72 saat) inkübasyon periyodunun sonunda maksimum lipaz aktivitesine ulaşılmıştır. Her iki durumda, immobilize yatakların daha fazla hücre içermesine ve dolayısıyla reaksiyonu hızlandırmasına bağlanmıştır (Taskin 2013). Diğer taraftan serbest hücreler için 84, immobilize hücreler için ise 72 saatin üzerindeki inkübasyon sürelerinin lipaz aktivitesini arttırmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, lipaz substratı olarak kullanılan atık yağın kültüde tükenmesine bağlanmıştır. Hatta, immobilize hücreler için 84, serbest hücreler içinse 96 saatten sonra lipaz aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. Aktivitedeki bu azalma ise kültür ortamında enzim stabilitesinin bozulmasıyla açıklanmıştır.

İmmobilize hücreleri üretim çalışmalarında avantajlı kılan en önemli özelliklerden biri de immobilize hücrelerin tekrar kullanılabilirliğidir. Bununla birlikte, tekrarlı kullanım için immobilize hücreler (yataklar) in yüksek stabilitiyeye sahip olması istenmektedir. Bu yüzden, bu tez çalışmasında yatakların döngüler halinde tekrarlı olarak kullanılabilme potansiyeli de araştırılmıştır. Her inkübasyon periyodu sonunda yataklar steril fizyolojik su ile yıkanmış ve taze hazırlanmış besiyerine aktarılmıştır. Diğer taraftan, araştırma bulguları kısmından da görülebileceği gibi immobilize hücreler için 60 ve 72 saatler arasında lipaz aktivitesinde çok önemli bir artış gözlenmemiştir (sadece 0.7 U/L'lik bir artış). 12 saatlik zaman farkı ise iş ve enerji tüketimini önemli ölçüde arttıracığından dolayı her döngü için 60 saatlik inkübasyon süresinin uygun olacağı düşünülmüştür. Deneyle ilk döngüler boyunca lipaz aktivitesinin az da olsa kademeli bir artış gösterdiğini ve üçüncü döngünün sonunda lipaz aktivitesinin maksimum değere ulaştığını göstermiştir. İlk iki döngüye oranla 3. döngü sonunda immobilize hücrelerin daha yüksek aktivite göstermesi her döngüde hücrelerin ortama daha iyi adapte olmasıyla açıklanmıştır. 4 ve 5. döngülerde lipaz aktivitesinde her hangi bir artış ya da

azalma gözlemlenmemiş, ancak 6. döngüden itibaren 10. döngünün sonuna kadar maksimum aktivitede yaklaşık %30'luk bir düşüş tespit edilmiştir. Aktivitedeki azalma özellikle 11 ve 13. döngüler sonunda en üst seviyeye ulaşmıştır. Benzer şekilde, immobilize yataklarda da 11 ve 13. Döngüler arasında önemli parçalanmalar ve yumuşmalar göze çarpmıştır. Dolayısıyla, bu döngüler arasında da yataklardan kültür ortamına büyük miktarda maya hücrelerinin sızdığı mikroskop altında tespit edilmiştir. Bu yüzden, immobilize hücrelerin lipaz aktivitesinde döngüye bağlı olarak görülen azalma sodyum alginat matriksindeki parçalanma ve yumuşamaya bağlanmıştır. Yataklardan hücre sızıntısı ayrıca kırmızı renge sahip olan yatakların renklerinin kademeli olarak azalmasıyla da belirlenmiştir. Yataklarda görülen parçalanma ve yumuşama her döngü sonunda yatakların yıkanması ve buna bağlı olarak yataklardan Ca^{+2} iyonlarının uzaklaşmasıyla açıklanmıştır. Ca^{+2} iyonları uzaklaştığından yataklar yumuşamış ve çevresel strese karşı daha dayanıksız hale gelmiştir. Ayrıca, kültür ortamının asitliği de sodyum alginat matriksi üzerinde parçalama etkisi göstermiş olabilir (Taskin 2013). Diğer taraftan, kültür ortamına katılan Triton X-100 sürfaktantı da yataklar üzerinde parçalayıcı bir etki göstermiş olabilir.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular göstermektedir ki;

1. Uygun izolasyon kaynağı (toprak), besiyeri (lipaz substratı içeren) ve kültür parametreleri (sıcaklık ve pH) seçildiğinde düşük sıcaklıklarda gelişebilen ve lipaz üreten mayalar spesifik olarak izole edilebilir.
2. Etkili bir tarama (screening) prosesi en iyi lipaz üretici mayayı ortaya çıkarabilir.
3. Kültür ortamında sıcaklığın, pH'nın, substrat konsantrasyonunun, inducerlerin (teşvik edicilerin) ve inkübasyon süresinin optimizasyonu sayesinde lipaz üretimi artırılabilir.
4. Lipaz üretimi mayanın immobilize hücreleriyle gerçekleştirildiğinde daha kısa süreler içerisinde daha yüksek verimler elde edilebilir.
5. Maya hücrelerinin immobilizasyonunda sodyum alginat etkili bir immobilizasyon matriksi olarak kullanılabilir.
6. Soğukta aktif olan enzimler genellikle soğukta iyi gelişim gösteren

mikroorganizmalardan elde edildiği için mevcut maya izolatın lipazı da düşük sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterebilir. Bununla birlikte, bu varsayımı desteklemek için bu izolattan izole edilecek enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmelidir. Sonraki çalışmalarımızda, enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılması düşünülmektedir.

7. Sonuç olarak, laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilen bu çalışmadan elde edilen bulgular endüstriye uygulanarak daha az maliyetle ve daha yüksek verimle lipaz üretimi gerçekleştirilebilir.



KAYNAKLAR

- Abdel- Fattah Y.R., 2002. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic, *Geobacillus* sp. using Box-Behnken experimental design. *Biotechnoogyl Letters*, 24: 1217-1222.
- Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad SD (2003) Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *Am Assoc Pharma Sci Technol* 4(4):56.
- Ahmed, S.A., 2008. Invertase Production by *Bacillus macerans* Immobilized on Calcium Alginate Beads. *Journal of Applied Sciences Research*, 4, 1777-1781.
- Ali, A., Kaur M., Mehra U., 2011. Use of immobilized *Pseudomonas* sp. as whole cell catalyst for the transesterification of used cotton seed oil. *Journal of Oleo Science*, 6, 7–10.
- Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., Lucia, M.D., Leonardi, A., Rossi, M., 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb. Cell Fact.*, 9,73.
- Anbu, N., M.J., Kim D.H., Seo J.S., Hur B.K. and Min K.H., 2011. Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. *African Journal of Biotechnology*, 10, 4147-4156.
- Andrews, JH., 1991. *Comparative Ecology of Microorganisms and Macroorganisms*. Springer-Verlag, New York.
- Antranikian, G., Vorgias E.C. and Bertoldo C., 2005. Extreme Environments as a Resource for Microorganisms and Novel Biocatalysts. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 96, 219–262.
- Arroyo, M., Sanchez-Montero J.M., Sinisterra J.V., 1999. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme Microbial Technology*, 24:3–12.
- Arslan, N.P., 2014. Psikrotolerant maya *Yarrowia lipolytica* B9' un immobilize hücreleriyle steril olmayan peynir altı suyu ortamında sitrik asit üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Aydogan, M.N., Taskin M., Canli O., Arslan N.P., Ortucu S., 2014. Tris–sucrose buffer system: a new specially designed medium for extracellular invertase production by immobilized cells of isolated yeast *Cryptococcus laurentii* MT-61. *Folia Microbiologica*, 59, 9-16.
- Beer, H.D., McCarthy J.E., Bornscheuer U.T., Schmid R.D., 1998. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1399:173–80.
- Beshay, U., 2003. Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in Ca-alginate beads. *African Journal of Biotechnology*, 2, 60-65.
- Bisht, D., Yadav S.K., Darmwal N.S., 2013. Optimization of immobilization conditions by conventional and statistical strategies for alkaline lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* mutant cells: scale-up at bench-scale bioreactor level. *Turkish Journal of Biology*, 37, 392–404.

- Bhushan, I., Parshad R., Qazi G.N., Gupta V.K., 2008. Immobilization of Lipase by entrapment in Ca-alginate beads. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23, 552–62.
- Bourlieu, C., Bouhallab S. ve Lopez C. 2009. Biocatalyzed modifications of milk lipids: applications and potentialities. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 458-469.
- Bumpus, J.A., Tien M., Wright M.-T.D. and Aust S.D., 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, 228, 1434-1436.
- Bussamara, R., Fuentesfria, A.M., Oliveira, E.S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2010. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresour. Technol.*, 101, 268-275.
- Canakci, M., Ozsezen A. N., Arcaklioglu E., Erdil A., 2009. Prediction of performance and exhaust emissions of a diesel engine fueled with biodiesel produced from waste frying palm oil. *Expert Systems with Applications*, 36, 9268–9280.
- Carrasco, M., Rozas J.M., Barahona S., Alcaino J., Cifuentes V., Baeza M., 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology*, 12, 251.
- Charpe, T.W., Rathod V.K., 2011. Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Management*, 31, 85–90.
- Chen, H.P., Hsiao K.F., Wu S.H., Wang K.T., 1995. Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 17:305–8.
- Chen J., Ishii T., Shimura S., Kirimura S., Usami S., 1992. Lipase . production of *Tricosporon fermentans* WUC12 a newly isolated yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73: 412-414.
- Ciafardini, G., Zullo B. A. and Iride A. 2006. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 23, 60–67.
- Colla, L. M., Rizzardi, J., Pinto, M. H., Reinehr, C. O., Bertolin, T. E., Costa, J. A. V., 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, 101, 8308–8314.
- 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– 63.
- Dewan SS (2014). *Global Markets for Enzymes in Industrial Applications*. Welles- ley, MA: BCCResearch.
- Dharmstithi, S., Kuhasuntisuk B., 1998. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: Biochemical Properties Application for Wastewater Treatment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21: 75-80.
- Dhillon, G.S., Brar S.K., Verma M. and Tyagi R.D., 2011. Recent advances in citric acid bio production and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 505–529.
- Duarte, J.C., Rodrigues J.A.R., Moran P.J.S., Valença G.P., Nunhez J.R., 2013. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3, 31.
- Echevarria, J., Leon J.A., Espinosa M.E., Delgado G., 1991. Optimization of solid state fermentation of sugar cane by *Aspergillus niger* considering the particle size effect. *Acta Biotechnologica*, 11,15-22.

- Ellaiah, P., Prabhakar T., Ramakrishna B., Taleb A. T., Adinarayana K., 2004. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 39, 525–528.
- Ertugrul, S., Donmez G., Takac S., 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 720–724.
- Felizardo, P., Correia M.J.N., Raposo I., Mendes J.F., Berkmeier R., Bordado J.M., 2005. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage*, 26:487–94.
- Feller, G., Thiry M., Arpigny J.L., Mergeay M., Gerday C., 1990. Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 66, 239–44.
- Ferrarezi, A.L., Ohe T.H.K., Borges J.P., Brito R.R., Siqueira M.R., Vendramini P.H., Quilles J.C.J., Nunes C.C.C., Bonilla-Rodriguez G.O., Boscolo M., da Silva R., Gomes E., 2014. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 107, 106–113.
- Ferrer, P., Sola C., 1992. Lipase production by immobilized *Candida rugosa* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 737–41.
- Galabova, D., Tuleva B., Spasova D., 1996. Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 18–22.
- Garbayo, I., Vilchez, C., Vega, J.M., Nava-Saucedo, J.E. and Barbotin, J.N., 2004. Influence of immobilization parameters on growth and lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* co-immobilized in calcium alginate gel beads. *Biotechnology Letters* 26, 1825–1827.
- Ghosh, P.K., Saxena T.K., Gupta R., Yadav R.P., Davidson S., 1996. Microbial lipases: production and applications. *Science Progress* , 79:119–57.
- Godfrey, T., West S., 1996. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*. 2nd ed. New York: Stockton Press, pp. 1–8.
- Grbavcic, S. Z., Dimitrijevic-Brankovic S. I., Bezbradica D. I., Siler-Marinkovic S. S. and Knezevic Z. D., 2007. Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(8–9), 757–765.
- Griebeler, N., Polloni, A. E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Cechet, J. L., Luccio, M., Oliveira, D., Treichel, H., Cansian, R. L., Rigo, E., Ninow, J. N., 2011. Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. *Food Bioprocess Technol*, 4, 578–586.
- Gupta, R., Gupta N. ve Rathi P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Biotechnology*, 64, 763-781.
- Gurung, N., Ray S., Bose S., and Rai V., 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 1,18.
- Haba, E., Brescoa O., Ferrera C., Marque'sa A., Busquetsb M., Manresaa A., 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 40–44.

- Haddar A, Bougatef A, Agrebi R, Sellami-Kamoun A, Nasri M, A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. *Process Biochemistry* 44 (2009) 29–35.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235–251.
- He, Y.Q., Tan T.W., 2006. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp.. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 99-125.
- Heravi, K.M., Eftekhar F., Yakchali B., Tabandeh F., 2008. Isolation and Identification of a Lipase Producing *Bacillus* sp. from soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(5), 740-745.
- Hiteshi K, Gupta R (2014) Thermal adaptation of α -amylases: a review. *Extremophiles* 18:937–944.
- Hung, T.C., Giridhar R., Chiou S.H., Wu W.T., 2003. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26, 69–78.
- Iftikhar, T., Niaz M., Anwer, M., Abbas, S. Q., Saleem, M. and Jabeen, R., 2011. Ecological Screening of Lipolytic Cultures and Process Optimization for Extracellular Lipase Production from Fungal Hyperproducer. *Pak. J. Bot.*, 43(2), 1343-1349.
- Joseph, B., Ramteke P.W., Kumar P.A., 2006. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 52, 315–320.
- Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas, G., 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, 26, 457–470.
- Joshi, S. and Satyanarayana, T., 2013. *Biotechnology of Cold-Active Proteases*. *Biology*, 2, 755-783.
- Kaieda M., Samukawa T., Matsumoto T., Fukuda H., 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88:627–31.
- Kamzolova, S., Morgunov, I., Aurich, A., Perevoznikova, S., Shiskanova, N., Stottmeister, U., Finogenova, T., 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food Technol. Biotechnol.* 43, 113–122.
- Kaushik R., Saran S., Isar J., Saxena R.K., 2006. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40: 121-126.
- Kim B.S., Hou C. T., 2006. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29, 59–64.
- Kirk O., Borchert T.V. and Fuglsang C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351.
- Kok R.G., Thor J.J.V., Roodzant I.M.N., Brouwer M.B.W., Egmond M.R., Nudel C.B., Vosman B., Hellingwer K.J., 1995. Characterization of the extracellular lipase lipA of *Acinetobacter colcoaticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular Microbiology*, 15:803–18.

- Komesli, Ş., 2015. Steril Olmayan Kültür Koşulları Altında Soğuğa-Adapte Olmuş Bakterilerle Lipaz Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Shamsher, S.K. and Gupta, R., 2005. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41; 38–44.
- Lee, D., Kim, H., Lee, K., Kim, B., Choe, E., Lee, H., Kim, D., Pyuna, Y., 2001. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 363-371.
- Lin, E-S., Wang, C-C., Sung, S-C., 2006. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 98–102.
- Liu, C.H., Lu, W.B., Chang, J.S., 2006. A reviews on microbial lipases production. *Process Biochem*, 41, 1940–1944.
- Liu, Z.Q., Chi, Z.M., Wang, L. & Li, J., 2008. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical engineering journal*, 40, 445-451.
- Liu, C.H., Huang, C.C., Wang, Y.W, Chang, J.S, 2012. Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 43, 511–516.
- Loperena, L., Soria, V., Varela, H. Lupo, S., Bergalli, A., Guigou, M., Pellegrino, A., Bernardo, A., Calvino, A., Rivas, F., Batista, S., 2012. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, 2249–2256.
- Loperena, G., Alizadeh S., 2013. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. *Fluid Phase Equilibria*, 353, 132-134.
- Lopes M., Gomes N., Mota M. and Belo I. 2009. *Yarrowia lipolytica* growth under increased air pressure: Influence on enzyme production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Lotrakul P. and Dharmsthiti S., 1997. Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 163-166.
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J. L., Brocca S., Valero, F., Lafuente, J., 1998. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem. Phys. Lipids.*, 93, 143-148.
- Mahadik ND., Puntambekar US., Bastawde KB., Khire JM., Gokhale DV., 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 38, 715-21.
- Mahanta N., Gupta A., Khare S.K., 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresource Technology*, 99, 1729–1735.

- Mangesh G.K., Ajay K.D., Narendra N.B., 2006. Utilization of green seed canola oil for biodiesel production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:1886–93.
- Maragoni A.G., 1994. *Candida* and *Pseudomonas* lipase catalyzed hydrolysis of butter oil in the absence of organic solvents. *Journal of Food Science*, 59:1096–9.
- Maxwell, Shaw K., 1967. Effect of Abrupt Temperature Shift on the Growth of Mesophilic and Psychrophilic Yeasts Division of Food Preservation Journal of Bacteriology, Apr., 1967, p. 1332-1336 Copyright @ 1967 American Society for Microbiology Vol. 93, No. 4
- Mencher J.R., Alford J.A., 1967. Purification and characterization of the lipase of *Pseudomonas fragi*. *Journal of general microbiology*, 48:317–28.
- Merek A., Bednasski W., 1996. Some factors affecting lipase production by yeast and filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 18:1155–60.
- Metin K. , Burcu Bakir Ateslier Z. , Basbulbul G. and Halil Biyik H., 2006. Characterization of esterase activity in *Geobacillus* sp.. *Journal of Basic Microbiology*, 46, 400–409.
- Mobarak, Q.E., Kasra-Kermanshahi, R, Moosavi-nejad, Z., 2011. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iran. J. Microbial.*, 3(2), 92-98.
- Mukhopadhyay, R., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., Banerjee, P. C., and Guha, A. K., 2005. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*, 15(3), 299-303.
- Neethu, C.S., Rahiman, K.M.M., Rosmine E., Saramma, A.V., Hata A.A.M., 2015. Utilization of agro- industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctican doptimization of physical parameters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4, 703–709.
- Prakasham R.S., Rao CS, Sarma PN, Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 97 (2006) 1449–1454.
- Potumarthi R., Subhakar C., Vanajakshi J. and Jetty A. 2008. Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa*-MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 700–710.
- Pratungdejkul and Dharnstithi, 2000. Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Microbiol. Res.* 155, 95-100.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A., 2002. *Microbiology*, fifth edition. The McGraw-Hill Companies, page 96-98, New York, USA.
- Rajendran A., Palanisamy A. and Thangavelu V. 2008. Evaluation of medium components by Plackett–Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24(3), 436–444.
- Rao, M.B., Tanksale M.A., Ghatge S.M. and Deshpande V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597–635.
- Ribeiro DS, Henrique SMB, Oliveira LS, Macedo GA, Fleuri LF (2010) Enzymes in juice processing: a review. *Int J Food Sci Technol* 45:635–641.
- Rees G.D., Robinson B.H., 1995. Esterification reactions catalysed by

- Chromobacterium viscosum* lipase in CTAB-based microemulsion system. *Biotechnology and Bioengineering*, 45:344–5.
- Rigo, E., Ninowa, J.L., DiLuccio, M., Oliveira, J.V., Polloni, A., Remonato, D., 2010. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT-Food Sci. Technol*, 43(7), 1132-1137.
- Rodriguez, JA., Mateos, JC., Nungaray, J., Gonzalez, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., Baratti, J., 2006. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid-state fermentation. *Process Biochem*, 41, 2264–9
- Rossi, M., Buzzini, P., Cordisco, L., Amaretti, A., Sala, M., Raimondi, S., Ponzoni, C., Pagnoni, UM and Matteuzzi, D., 2009. Growth, lipidaccumulation, and fattyacid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiol Ecology*, 69, 363–372.
- Rua M.L., Schmidt-Dannert C., Wahl S., Sprauer A., Schimide R.D., 1998. Thermo alkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*, 56:89–102.
- Saxena, R.K., Sheoran A., Giri B., Davidson W.S., 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 1–18.
- Schmidt, Rolf D. and Verger R., 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol.37, no.12, p.1608-1633.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627–662.
- Sharma, R., Soni S.K., Vohra R.M., Jolly R.S., Gupta L.K., Gupta J.K., 2002. Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Indian Journal of Microbiology*, 42: 49-54.
- Sharon, C., Furugoh S., Yamakido T., Ogawa H., Kato Y., 1998. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20:304–7.
- Shivaji, S., Prasad, GS., 2009. Antarctic yeast: Biodiversity and potential applications, *Yeast biotechnology: Diversity and Applications*, ed: Satyanarayana T., Kunze G., Springer, Netherlands. pp: 3-18.
- Shivakumar, S., 2012. Studies on the free and immobilized cells of *Bacillus* sp. Y for the coproduction of amylase and alkaline protease. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 03, 1401-1407.
- Silva, W.O.B., Mitidieri S., Schrank A., Vainstein M.H., 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 40, 321-326.
- Sumanjelin, B., Ramachandra Rao C. S. V., Satish Babu R., 2012-2013. Isolation, Characterization of Lipase Producing Bacteria from Crude Rice Bran Oil and Optimization studies by Response Surface Methodology (RSM). *J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec. B*, Vol.3, No.1, 289-296.
- Taskin M., Esim N. and Ortucu S. 2012. Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly

- isolated *Rhizopus oryzae* TS-61, *Food and Bioproducts Processing*, 90, 773-779.
- Taskin M., Esim N., Genisel M., Ortucu S., Hasenekoglu I., Canli O., Erdal S., 2013. Enhancement of invertase production by *Aspergillus niger* OZ-3 using low – intensity static magnetic fields. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43:177-188.
- Taskin, M., 2013. Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 165-172.
- Taskin, M., Saghafian, A., Aydogan, M.N., Arslan, N.P., 2015. Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 9, 595-605.
- Treichel, H., Oliveira, D.D., Mazutti, M.A., Luccio, M.D., Oliveira, J.V., 2010. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Tech.*, 31, 82–196.
- Unver Y., Yildiz M., Taskin M., Arslan N.P., Ortucu S., 2015. Protease production by free and immobilized cells of the cold-adapted yeast *Cryptococcus victoriae* CA-8. *Biocatalysis and Biotransformation*, 33, 105-110.
- Vakhlou, J., Kour, A., 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and genecloning. *Electron.J.Biotechnol.*, 9, 69-85.
- Van Oort M.G., Debeer A.M.T.J., Dijkman R., Tjeenk M.L., Verheij H.M., De Haas G.H., Wenzig E., Gotz F., 1989. Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry*, 28:9278–85
- Vaz, A.B.M., Rosa L.H., Vieira M.L.A. *et al.* 2011. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 937-947.
- Veerapagu, M., Dr. Narayanan, A. S., Ponmurugan, K., Jeya, K. R., 2013. Screening Selektion Identification Production and Optimization of Bacterial Lipase from Oil Spilled Soil. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 6, Suppl 3, 62-67.
- Wen, Z., Liao W., Chen S., 2005. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology*, 96, 491–499.
- Wilke, D., 1999. Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and fermentation industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 135-45.
- Xin, M.X., Zhou P.J., 2007. *Mrakia psychrophila* sp. nov., a new species isolated from Antarctic soil. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8, 260–
- Zaher, F., 2003. Utilization of used frying oil as diesel engine fuel. *Energy Source*, 25:819–26.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi: 19.04.1985

Doğum Yeri: Bitlis

Lise: Cemile Hamdi ONGUN süper Lisesi (2003)

Lisans: Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2008)

Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı (2012-)

