

**MAYA TÜRÜ MİKROORGANİZMALARLA
LİPAZ ENZİMİ ELDESİ**

**NEŞE KEKLİKCİOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
2009**

**T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOMİSYON BAŞKANLIĞI
PROJE SONUÇ RAPORU**

MAYA TÜRÜ MİKROORGANİZMALARLA LİPAZ ENZİMİ ELDESİ

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. ÜNSAL AÇIKEL

NEŞE KEKLIKÇİOĞLU

Bu proje Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığınca M-345 Numaralı Yüksek Lisans Tez Projesi Olarak Desteklenmiştir.

SİVAS-2009

İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xiii

	Sayfa
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL ve METOD.....	10
2.1. Enzimler.....	10
2.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması.....	10
2.1.3. Enzimlerin kimyasal yapısı.....	11
2.1.4. Enzimlerin katalitik özellikleri.....	12
2.1.5. Enzim aktivatör ve inhibitörleri.....	13
2.1.6. Enzim substrat ilişkisi.....	13
2.1.7. Enzim aktivitesine etki eden parametreler.....	14
2.1.7.1. pH etkisi.....	14
2.1.7.2. Sıcaklık etkisi.....	14
2.1.7.3. Substrat konsantrasyonu etkisi.....	14
2.1.7.4. Enzim konsantrasyonu etkisi.....	14
2.1.8. Enzimatik reaksiyon kinetiği.....	15
2.1.9. Lipaz enzimi.....	16
2.1.9.1. Spesifik olmayan lipazlar.....	16
2.1.9.2. (1,3)-Spesifik Lipazlar.....	17
2.1.9.3. Yağ asidi spesifik lipazlar.....	17
2.1.9.4. Lipaz aktivite tayin metotları.....	18
2.1.9.5. Para nitro phenil palmitate (p-NPP) metodu.....	19
2.2. Mikroorganizmalar.....	19
2.2.1. Mikroorganizmaların genel özellikleri.....	19
2.2.2. Mikroorganizmaların büyümesi.....	20
2.2.2.1. Enerji kaynağı.....	20
2.2.2.2. Azot kaynağı.....	21
2.2.2.3. Mineral kaynakları.....	21
2.2.3. Mikroorganizmanın büyümesine etki eden parametreler.....	21
2.2.3.1. pH.....	21
2.2.3.2. Sıcaklık.....	22
2.2.3.3. Oksijen ihtiyacı.....	22
2.2.4. Mikroorganizmaların büyüme evreleri.....	22
2.2.4.1. Gecikme evresi.....	22
2.2.4.2. Logaritmik evre.....	22
2.2.4.3. Duraklama evresi.....	23
2.2.4.4. Sabit evre.....	23
2.2.4.5. Ölüm evresi.....	23

2.2.5. Mayalar.....	24
2.2.5.1. <i>Candida utilis</i>	26
2.2.5.2. Mikroorganizmalar ve üretim yöntemleri.....	27
2.3. Deneyler.....	27
2.3.1. Analiz yöntemleri.....	27
2.3.2 Lipaz aktivitesi tayini.....	28
2.3.3. Mikroorganizma derişimi tayini.....	28
2.3.4. Sakkaroz derişimi tayini.....	28
2.3.5. Bakır(II)/nikel(II) iyon derişiminin tayini.....	28
2.4. Mikroorganizma özgül üreme hızı.....	28
2.4.1. Monod eşitliği, metal iyonu içermeyen ortamda büyüme kinetiğinin modellenmesi.....	29
3. BULGULAR.....	30
3.1. Enzim Deneyleri.....	30
3.1.1. Başlangıç pH'ının etkisi.....	30
3.1.2. Başlangıç sakkaroz derişiminin etkisi.....	31
3.1.3. Aktivatör etkisi.....	31
3.1.3.1. Soya yağı etkisi.....	33
3.1.3.1. Mısır yağı etkisi.....	36
3.1.3.1. Zeytin yağı etkisi.....	39
3.1.3.1. Ayçiçeği yağı etkisi.....	41
3.1.3.1. Kanola yağı etkisi.....	45
3.1.4. Metal iyonları bakır(II), nikel(II) etkisi.....	47
3.1.3.1. Bakır(II) iyonu etkisi.....	48
3.1.3.2. Nikel(II) iyonu etkisi.....	52
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55
5. KAYNAKLAR.....	59
6. ÖZGEÇMİŞ.....	64
7. EKLER.....	65
Ek 1. Bakır (II) ve Nikel(II) İyon Derişimlerinin Tayini.....	65
Ek 2. Melas Sakkarozu Derişiminin Tayini.....	66
Ek 3. Mikroorganizma Derişimi Tayini.....	67

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYA TÜRÜ MİKROORGANİZMALARLA LİPAZ ENZİMİ ELDESİ

Neşe KEKLİKÇİOĞLU

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ünsal AÇIKEL

Yapılan tez çalışmasında lipaz enzimi üretebilen *Candida utilis* mayasıyla lipaz enzimi aktivitesi, enzim aktivitesini artırıcı ve azaltıcı ortamlarda incelenmiştir. Lipaz enzimi aktivitesinin incelendiği çalışmalar için hazırlanan besin ortamlarında bir şeker endüstrisi atığı olan melas kullanılmıştır.

Çalışmaların ilk aşamasında mikroorganizmanın maksimum lipaz enzim aktivitesi gösterdiği optimum pH değeri araştırılmıştır. Mikroorganizmanın maksimum üreme ve lipaz aktivitesini pH 4.0 değerinde gösterdiği bulunurken, başlangıç sakkaroz derişimi 10 g/L iken maksimum lipaz aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum mikroorganizma üreme değerleri elde edilmiştir. Ayrıca Monod eşitliğine göre çizilen izotermlerden mikroorganizma üremesi için kinetik sabitler bulunmuştur.

Çalışmaların ikinci aşamasında besin ortamına eklenen enzim aktivitesini artırıcı yağların etkileri araştırılmıştır. Bu amaca yönelik olarak besin ortamına %0.25-1.25 oranında eklenen soya, mısır, zeytin, ayçiçeği ve kanola yağlarının enzim aktivitesine etkileri daha önce maksimum aktivitenin gözlemlendiği pH 4.0 değerinde incelenmiştir. Genel olarak yağların hepsinin enzim aktivitesini artırdığı bulunmuş, yağların içerisinde maksimum aktivite artışı ise ortamda %1.25 oranında soya yağı varken yaklaşık %85 oranında artış değeriyle elde edilmiştir. Aktivatör yağların

mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreme miktarlarını da kısmen artırdığı bulunmuştur.

Çalışmaların son aşamasında ise mikroorganizma üremesini inhibe ettiği bilinen bakır(II) ve nikel(II) iyonlarının mikroorganizmanın lipaz enzimi aktivitesi ve mikroorganizma üremesine etkileri metal iyonlarının 25-250 mg/L derişim aralığında incelenmiştir. Ortama eklenen tekli durumdaki bakır(II) ve nikel(II) iyonlarının başlangıç derişimleri arttıkça mikroorganizmanın gösterdiği enzim aktivitesinin önemli oranda düştüğü bulunmuştur. En büyük düşüş ortamda 250 mg/L nikel(II) iyonu varken gözlenmiş ve bu durumda normal besin ortamdaki aktivitenin ancak %5'i kadar aktivite gözlenmiştir. Metal iyonlarının artan başlangıç derişimleriyle enzim aktivitesinin önemli oranda azalmasının yanında, mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarı değerleri de önemli oranda düşmüştür. Enzim aktivitesini artırıcı ve azaltıcı ortam sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Lipaz enzimi, *C. utilis*, melas, sakkaroz, aktivatör, *Monod*, bakır(II), nikel(II), kinetik

ABSTRACT

Master Thesis

PRODUCTION of LIPASE ENZYME USING YEAST TYPE MICROORGANISMS

Neşe KEKLİKÇİOĞLU

Cumhuriyet University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assistant Prof. Ünsal AÇIKEL

In the thesis work, lipase enzyme activity with yeast *Candida utilis* that can produce lipase enzyme is examined in the media which increase and decrease the enzyme activity. In nutrient media which are prepared for the works that examine lipase enzyme activity melas, which is a sugar industry waste, is used.

On the first stage of the study optimum pH level in which the microorganism shows the maximum lipase enzyme activity, is examined. Beside finding out that the microorganism shows the maximum lipase reproductivity and lipase enzyme activity on the pH level 4.0, we also got the maximum lipase activity, microorganism specific reproduction rate and maximum microorganism reproduction value when the beginning sakkaroz concentration rate is 10 g/L. Moreover, kinetic constants for microorganism reproductivity is gained from izoterms drawn according to Monod equation..

The effect of the enzyme activity increasing oils added to the nutrient media are examined on the second stage. Soybean, corn, olive, sunflower and canola oils are added to the nutrient media and rate % 0.25-1.25 for this aim and their effects to the enzyme activity are examined at pH 4.0 in which the maximum activity increase rate at the presence of % 1.25 soybean oil in the media.

On the final stage of the study, the effects of copper (II) and nickel (II) ions, known to inhibit the proliferation of microorganisms, on the lipase enzyme activity of microorganism and on the microorganism proliferation are digged out between the rate of 25-250 mg/L concentration of

metal ions. It is found that the more the beginning concentrations of copper (II) and nickel (II) single case ions added to media increase, the more the enzyme activity that the microorganism shows decreases. The maximum reduction is found out the presence of 250 mg/L nickel (II) in the media and only % 5 of the activity is observed in proportion to the normal nutrient media. Beside the significant decrease of enzyme activity with the increasing beginning concentrations of metal ions, also the rate of the specific proliferation of the microorganism and the amount of spawning microorganism decrease significantly.

The results of the media increasing and decreasing the enzyme activity are examined relatively.

Keywords: Lipase enzyme, *C.Utilis*, molasses, sakkaroz, activator, Monod, Copper(II), Nickel(II), Kinetic

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarına yön veren, yaptığım deneylerin, araştırmaların her aşamasında bilgi, öneri ve her türlü tecrübesini esirgemeyerek engin fikirlerini paylaşarak gelişmeye büyük katkısı olan danışman hocam sayın Yrd.Doç.Dr. Ünsal AÇIKEL 'e en derin duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

Dostluklarını ömrüm boyunca unutamayacağım her zaman yanımda olan ve moralimin her zaman düzgün olmasına yardımcı olan arkadaşlarımdan öte kardeşlerim Fidan HARUN ve Gülçin MUNAR 'a teşekkür ederim.

Bütün öğrenim hayatım boyunca olduğu gibi bu çalışmamda da maddi manevi desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim çok değerli ve kıymetli, canımdan çok sevdiğim annem, babam, ablam ve biricik kardeşim Orhan KEKLİKÇİOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunar ömrüm boyunca yanımda olmanızı dilerim...

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kofaktörlerin sınıflandırılması (Pekin, B.,1979; Erdal, E., 2004).	12
2.1.4. Enzimlerin katalitik özellikleri	12
Şekil 2.2. Enzim katalizli ve katalizsiz reaksiyonların aktivasyon enerjileri	15
Şekil 2.3. Mikroorganizma büyüme evreleri	23
Şekil 3.1. <i>Candida utilis</i> için başlangıç pH'ının enzim aktivitesi ve üreyen mikroorganizma derişimine etkisi (S ₀ : 10 g/L; T: 25°C; KH: 150 rpm)	31
Şekil 3.2. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişiminin enzim aktivitesi ve üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkisi (T: 25°C; KH: 150 rpm).....	32
Şekil 3.3. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki soya yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	33
Şekil 3.4. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgöl üreme hızının farklı miktarlardaki soya yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	34
Şekil 3.5. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki soya yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)	34
Şekil 3.6. <i>Candida utilis</i> için soya yağı içeren ortamda 1/μ-1/S grafiğı (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	35
Şekil 3.7. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki mısır yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	36
Şekil 3.8. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgöl üreme hızının farklı miktarlardaki mısır yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	37
Şekil 3.9. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki mısır yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	37
Şekil 3.10. <i>Candida utilis</i> için mısır yağı içeren ortamda 1/μ-1/S grafiğı (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	38
Şekil 3.11. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki zeytin yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	39
Şekil 3.12. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgöl üreme hızının farklı miktarlardaki zeytin yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	40
Şekil 3.13. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki zeytin yağı ile değışimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	40
Şekil 3.14. <i>Candida utilis</i> için zeytin yağı içeren ortamda 1/μ-1/S grafiğı (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	41

Şekil 3.15. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki ayçiçeği yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	42
Şekil 3.16. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı miktarlardaki ayçiçeği yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	43
Şekil 3.17. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki ayçiçeği yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	43
Şekil 3.18. <i>Candida utilis</i> için ayçiçeği yağı içeren ortamda 1/μ-1/S grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	44
Şekil 3.19. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki kanola yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	45
Şekil 3.20. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı miktarlardaki kanola yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	46
Şekil 3.21. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki kanola yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	46
Şekil 3.22. <i>Candida utilis</i> için kanola yağı içeren ortamda 1/μ-1/S grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	47
Şekil 3.23. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı derişimlerdeki bakır(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	49
Şekil 3.24. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı derişimlerdeki bakır(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	50
Şekil 3.25. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı derişimlerdeki bakır(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	50
Şekil 3.26. <i>Candida utilis</i> için bakır(II) içeren ortamda 1/μ-1/S grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	51
Şekil 3.27. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı derişimlerdeki nikel(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	52
Şekil 3.28. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı derişimlerdeki nikel(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	52
Şekil 3.29. <i>Candida utilis</i> için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı derişimlerdeki nikel(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	53
Şekil 3.30. <i>Candida utilis</i> için nikel(II) içeren 1/μ-1/S grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	54
Şekil E.2. Nikel(II) iyon derişiminin tayini için kullanılan çalışma doğrusu 66	
Ek 2. Melas Sakkarozu Derişiminin Tayini.....	66

Şekil E.4. *C. utilis* için yaş mikroorganizma çalışma doğrusu.....68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Farklı oranlarda soya yağı ve 1-10 g/l aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri.....	35
Çizelge 3.2. Farklı oranlarda mısır yağı ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri.....	38
Şekil 3.14. Candida utilis için zeytin yağı içeren ortamda 1/μ-1/S grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm).....	41
Çizelge 3.3. Farklı oranlarda zeytin yağı ve 1-10 g/l aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri.....	41
Çizelge 3.4. Farklı oranlarda ayçiçeği yağı ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri.....	44
Çizelge 3.5. Farklı oranlarda karnola yağı ve 1-10 g/l aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri.....	47
Çizelge 3.6. Farklı derişimlerde bakır(II) iyonu ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri.....	51
Çizelge 3.7. Farklı derişimlerde nikel(II) iyonu ve 1-10 g/l aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri.....	54
Çizelge 4.1. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken elde edilen lipaz aktivitesinin yağ içermeyen ortam aktivitesiyle karşılaştırılması.....	56
Çizelge 4.2. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarının yağ içermeyen ortamdaki değerlerle karşılaştırılması.....	56
Çizelge 4.3. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken Monod eşitliğine göre çizilen izotermelere göre bulunan maksimum maksimum özgül üreme hızları değerlerinin yağ içermeyen ortamdaki değerlerle karşılaştırılması.....	57
Çizelge 4.4. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda 25 ve 250 mg/L derişiminde bakır(II) ve nikel(II) varken elde edilen lipaz aktivitesinin normal ortam aktivitesiyle karşılaştırılması.....	57
Çizelge 4.5. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda 25 ve 250 mg/L derişiminde bakır(II) ve nikel(II) varken elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarının normal ortamdaki değerlerle karşılaştırılması.....	58
Çizelge 4.6. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda 25 ve 250 mg/L derişiminde bakır(II) ve nikel(II) varken Monod eşitliğine göre çizilen	

izotermelere göre bulunan maksimum özgül üreme hızları değerlerinin normal ortam değerleriyle karşılaştırılması58

SİMGELER DİZİNİ

μ : Özgül üreme hızı (sa^{-1}),

X: Kuru mikroorganizma derişimi (g /L),

t : Zaman (sa)'dır.

μ_m : Maksimum özgül üreme hızı (sa^{-1}),

K_S : Doygunluk sabiti (g/L)'dir.

U: Standart koşullar altında 1 dakikada $1\mu\text{mol}$ substratı dönüştürebilen miktar.

S: Mikroorganizma ve substrat derişimleri (g/Lt).

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünce hazırlanan ve yayınlanan “Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu” adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan.....

Üye.....

Üye.....

Üye.....

Üye.....

Üye.....

ONAY

Yukarıda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../2009

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Sezai ELAGÖZ

1. GİRİŞ

Kimyasal reaksiyonları hızlandıran bileşiklere katalizör denir. Enzimler metabolik reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran ve protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bu reaksiyonlar enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı, özgül (spesifik) olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler (Telefoncu 1986, İnal 1996, Shuler vd. 2002, Pekin, B., 1980).

Son kırk beş yıl içinde pek çok sanayi dalında uygulama alanı bulan enzimler, günümüzde yeni kullanım alanlarının ortaya çıkmasıyla giderek önem kazanmaktadırlar (Telefoncu 1986). Enzimolojinin gelişimi sonucunda, dünya çapında endüstriyel enzimlerin satışı, 1995 yılında 1 milyar dolardan, 2000 yılında 1.5 milyar dolara yükselmiştir (Kirk vd., 2002; Gupta vd., 2004). 1960'lara kadar toplam enzim satışı her yıl sadece birkaç milyon dolarken; biyokimyasal üretim, fermentasyon prosesleri, iyileştirme metotları ve enzim sayısının artmasıyla enzim piyasası önemli bir şekilde gelişmiştir. Dünyada enzim üretimi, 12 büyük ve 400 küçük firma tarafından sağlanmaktadır (Sharma vd., 2001). Endüstriyel öneme sahip mikrobiyal enzimler dünyada Genencor International, Amano Pharmaceuticals, Biocatalysts, Novo Nordisk vs (Gupta vd., 2004) gibi çeşitli firmalar tarafından üretilmektedir. Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı 1.4 milyar dolarken yılda % 10'un üzerinde pazar ağı artışı ve % 4-5 dolayında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından. Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin % 75'i gıda ve deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadırlar ve proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar en yaygın kullanılan enzim gruplarından. Bu alanda her gün yeni potansiyel kaynaklar aranmakta ve gündeme gelmektedir (Topal vd., 2000, Bailey, 1977).

Dünyada üretilen enzimlerin yaklaşık %80'ni mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalarda bu amaçla mantarlar ve bakteriler kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların enzim üretiminde potansiyel olarak kullanılmasının avantajı ise ortam koşullarının değiştirilmesiyle ya da genetik manipülasyonlarla, sentezlenen enzim miktarının binlerce kez artırılmasıdır (Telefoncu, 1986).

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görünmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Topal vd., 2000).

Endüstriyel enzim pazarında büyük paya sahip olan hidrolitik enzimler içinde yer alan lipazlar, anahtar enzimler olarak ortaya çıkmakta ve endüstriyel uygulamalarda yüksek oranda

kullanılmaktadırlar (Jaeger vd., 1994, 1999).

Lipazlar, doğada farklı orijinlerden elde edilebilmektedirler. Özellikle mikrobiyal orijinli lipazlar, biyoteknolojik uygulamalar ve organik kimyada yüksek oranda kullanılmaktadırlar. Ekstraselüler mikrobiyal lipazlar ticari olarak çok önemli olup, bunların üretimi diğer kaynaklara göre çok daha kolaydır (Gupta vd., 2004).

Genellikle küflerden elde edilen lipazlar ,trigliseridleri digliseridlere ,monogliseridlere, gliserin ve yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen ve ayrıca belli şartlar altında ters tepkimeyi yani gliserin ve yağ asitlerinden trigliseridleri oluşturan biyolojik katalizörlerdir. Günümüzde biyoteknolojinin sürekli yeni arayışlar ve mevcut prosesleri geliştirme çabası içerisinde olması, mikrobiyal kaynaklı lipaz üretimine de bir hız kazandırmıştır.

Her geçen gün farklı endüstrilerde önemi artan lipazların ticari amaca yönelik kullanımı başlangıç aşamasındadır (Gupta vd., 2004). Bu nedenle yeni mikrobiyal kaynakların bulunmasına, enzim üretiminin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla yapmış olduğumuz çalışmada güçlü bir lipaz üreticisi olan ‘Candida’ cinsinin farklı türlerinin lipaz üretim kabiliyetlerinin araştırılması, ayrıca karbon ve azot kaynakları, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi lipaz üretimine etkisi olan parametrelerin optimizasyonu hedeflenmiştir.

Lipazlar kullanılacakları yerlere görede farklılık göstermektedirler. Örneğin deterjan üretiminde kullanılacak lipazların yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde aktivite göstermesi gerekmekte, ayrıca surfaktantlarla inhibisyona ve proteazlarla parçalanmaya karşı dirençli olmaları istenmektedir. Yağ leke giderici olarak kullanılacak olan lipazlar alkali koşullar altında aktif olmalıdırlar. Bu durumda istenen koşulları sağlayan yeni lipazları üretecek yeni mikroorganizmaların belirlenmesi ve lipolitik aktivitelerine göre mikroorganizmaların elenmesi gerekmektedir.

Öte yandan fermentasyon prosesi esnasında lipaz üretkenliğinin arttırılması, daha düşük üretim fiyatları yeni endüstriyel uygulamaları ilerleteceğinden büyük önem taşımaktadır. Lipaz üretkenliği sıcaklık, pH, ortam bileşimi, inhibitörlerin ve indükleyicilerin varlığı gibi farklı çevresel faktörler tarafından etkilenir. Lipaz aktivitesi önemli ölçüde karbon kaynağına bağlıdır. Bu nedenle lipaz üretimi için karbon kaynağını optimize etmek ve daha ucuz alternatifler bulmak önemli ölçüde ilgi çekmektedir.

Biyolojik yolla enzim üretimine yönelik bilimsel çalışmaların bir kısmı literatür özeti olarak aşağıda özetlenmiştir:

Katı hal fermantasyonunun kullanıldığı çalışmalara örnek verecek olursak; *Munoz vd (1991)* , *Penicillium candidum* , *Mucor miehei* ve *Penicillium canemberti* gibi üç misel oluşturan

mikroorganizmadan katı hal fermantasyonu ile lipaz üretimi incelenmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak kepeğin kullanıldığı bu çalışmada en fazla ve en kararlı üretimin *P. candidum* 'un verdiği rapor edilmiştir.

Bir diğer çalışmada Zhu (1994), katı hal fermantasyon şartlarını elde etmek için poliüretan foam parçacıkları ve buğday kepeğinin kimyasal içeriğine özdeş bir ortam kullanmışlardır. Böylelikle katı hal fermantasyonunda kolaylıkla ölçülemeyen biyokütlenin bu şekildeki fermantasyon ortamı ile mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca yine bu çalışmada *Penicillium citrinum* dan elde edilen amilaz ve nükleaz enzimlerinin aktivitelerinin yapay katı hal fermantasyon şartlarında daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Kamini vd (1998), *A. niger* le substrat olarak susam yağı, pamuk tohumu, pirinç kepeği, buğday kepeği, susam tohumu, keneotu tohumu, şeker kamışı posası, yerfıstığı tohumu, yer fıstığı içi, kahve kabuğu ve arpa kullanılarak lipaz üretimi gerçekleştirmişler ve en iyi sonucu susam yağının verdiğini bulmuşlardır.

Bhushan vd.(1998), *Candida* BG-55 mayasıyla substrat olarak pirinç ve buğday kepeğiyle lipaz üretimini gerçekleştirdiler ve 96 saat sonra (pirinç kepeği+% 10 pirinç kepeği yağı +mineral tuz) ortamında aktivitenin (buğday kepeği + % 10 pirinç kepek yağı +mineral tuz) ortamına göre daha fazla olduğunu gözlemişlerdir.

Andreas vd.(1999), *Penicillium restrictum* ' la katı hal fermantasyonuyla lipaz üretimini çalışmışlardır. Esas besin kaynağı olarak babassu yağ endüstrisi katı atıklarına ek olarak değişik C/N oranlarında pepton, zeytinyağı ve nişasata kullanıldı. En fazla lipaz aktivitesinin kültivasyondan 24 saat sonra % 2 zeytinyağıyla zenginleştirilmiş ortamda elde edildiğini ve lipaz aktivitesinin besin kaynağının çeşidine ve miktarına çok duyarlı olduğunu ve ortamın pH sınır ve proteaz miktarının azalmasıyla arttığını bulmuşlardır.

Smythe ve Drake (1949) *Aspergillus luchuensis* le buğday kepeği kullanarak lipaz üretimini incelemişlerdir.

UI-Haq vd.(2002), *Rhizopus oligosporous* la besin kaynağı olarak badem kullanılarak enzim üretimi için optimum büyüme koşullarında lipaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Enzimin ekstrasellüler olarak sentezlendiğini ve daha sonra bu mikroorganizmanın büyük ölçekli çalışmalarda kullanılabilir çalışmalarda olduğunu tespit etmişlerdir.

Cordova vd.(1997), Termotabl mantar kültürleri Rhizomucor pusillus ve Rhizopus rhizopodiformis 'le zeytinyağı keki ve şeker kamışı posası kullanılarak lipaz üretimne çalışmışlardır.Şeker kamışı posası kullanılan ortamda Rhizomucor pusillus un gösterdiği aktivite daha fazla olmasına karşın, % 50 şeker kamışı posası ve zeytinyağı keki karışımında ise Rhizopus rhizopodiformis le aktivitenin daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

Mikrobiyal lipazlar çoğunlukla su altındaki kültürlerce üretilirler,fakat katı hal fermentasyon yöntemleride kullanılabilir.(Chisti,1999a)Bazı durumlarda immobilize hücre kültürü de kullanılır.Su altındaki kültürlerin lipaz üretimi için gerekli optimal kültür ve besleyici gereksinimleri tanımlamak için bir çok araştırma yapılmıştır.Lipaz üretimi ,karbon ve azot kaynaklarının türü ve karışım oranından,kültür pH derecesinden sıcaklık artışından ve çözülmemiş oksijen konsantrasyonundan etkilenir.

KARBON KAYNAKLARININ ETKİSİ:

Sugihara ve arkadaşları (1991) kültür ortamında %1 zeytinyağı varken Bassilus sp.den lipaz üretildiğini bildirdiler.Sürdürülen kültürden sonra zeytinyağı olmadığında bile çok az enzim aktivitesi gözlenmiştir.Rhodotorula Glunisten hücre dışı lipaz üretimi için Fruktoz ve Palmiye yağının diğerlerine göre en iyi karbonhidrat ve yağ kaynağı olduğu belirtilmiştir.İki karbon kaynağı karşılaştırıldığında % 2 lik konsantrasyonda palmiye yağının fruktoz ortamında 12 kat fazla lipaz ürettiği bulunmuştur.(Papaparaskevas et all,1992)

Karbon kaynağı olarak işlenmiş zeytinyağı bulunan ortamda P.fluorescens S1K WI dan üretilen alkalın lipaz (pH :8.5) için 7395 U/mg proteinin (özel)bir aktivitesi gözlenmiştir.İncelenen diğer triaçilgliserollerle karşılaştırıldığında bu enzim tricaprylin (C8)ve tricaproicne (C6) karşı yüksek lipolitik aktivite göstermiş ve çoğunlukla trioleinin 1. ve 3. pozisyonlarında ester bağları hidroliz etmiştir.{Benzer olarak (Sztajer ,1993) Penisilium alanındaki alkalın lipaz maksimum aktivite üretmiştir.pH 8.3 'de yağ içeren bir ortamda biokütle arttığında penisillium alanındaki alkalın lipaz maksimum aktivite üretmiştir.}Tween 20 ve Lubrol PX eklendiğinde enzimin sabitliği artmaktadır. (Sztajer ,1993) Bu enzim triacilglycerole yatkındır,ancak durumsal bir özellik göstermemektedir. (Sztajer ,1993)

70 °C ' de tripalmitin bulunduğu bir ortamda termofilik Basilus sp.strain Wai 28 A 45, ' den sabit ısılı lipaz üretimi Janssen ve arkadaşları (1994) tanımlamıştır.Tripalmitin, tristearin, trimystin karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlar test edilmiş ve tripalmitin lipaz aktivitesinin en iyi tetikleyicisi olduğu bulunmuştur.

Gao ve Breul (1995) *Ophiostoma piceae* mantarının canlı kısmından lipaz üretmek için değişik bitki yağlarını karşılaştırmışlardır. Karbon kaynağı olarak sebze yağlarını (zeytin, soya fasülyesi, ayçiçeği, susam, keten tohumu, mısır ve yer fıstığı yağı) kullandığında yüksek oranda lipaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Maksimum lipaz üretimi zeytinyağı kullanıldığında elde edilmiştir.

Benzer şekilde karbon kaynağı olarak mısır yağı ve zeytinyağı kullanıldığında (% 1) termofilik *Basilus zinciri* A30-1 (ATCC 53841) en yüksek seviyede sabit ısılı alkalın lipazı üretmiştir. (Wang et al. 1995). Üretilen lipaz C 16:0-C 22:0 yağlı asitlerin trigliseridlerinde ve doğal hayvansal ve bitkisel yağlarda aktiftir.

Gordillo ve arkadaşları (1995) grup kültüründe *Candida Rugosa*' dan lipaz üretmenin, kullanılan lipaz tetikleyicilerin (yağ, tween 80... vb) hidrolizlenmesinin en önemli ürünü olan oleik asit konsantrasyonundan etkilendiğini gözlemlenmişlerdir. Maksimum lipaz ürünü oleik asitin 2 g/lt konsantrasyonunda elde edilmiştir ve daha yüksek oleik asit konsantrasyonunda ürün azalmıştır. Yapılan bir çok araştırma enzim tetikleyicisi olarak yağ kullanıldığında lipaz üretiminin genişlediğini kanıtlamaktadır.

Lin ve arkadaşları (1996) hem zeytinyağı (%4) hem Triton X-100 (%2) içeren bir ortamda *P.pseudoalcaligenes* F-111' den alkalın lipaz üretmişlerdir. *Rhizopus oryzae* için ortama çeşitli bitkisel yağların eklenmesi lipaz aktivitesini ve hücre büyümesini lipidlerden bağımsız ortamdaki sonuçlara göre 3 kat artırmıştır. (Essamri et al. 1998)

Olgun tohumlar ve mısır yağı hücre büyümesi ve lipaz üretimi için en uygun ortamlardır. (Essamri et al. 1998) En uygun biyokütle büyümesi için gerekli yağ konsantrasyonu % 3 dür. Fakat beklenen lipaz üretimi % 2 lik konsantrasyonda gerçekleşmiştir.

Alkalın deterjanlarındaki kullanımlarından dolayı alkalostabil lipazların özellikleri araştırılmaktadır. Gruplu ve grup olmayan bölümlerde sitrik asit ve soya fasülyesi yağının bulunduğu ortamlarda *P.alkaligen* M- 1 den alkalın lipaz üretilmiştir. (Gerritse et al ,1998) Bu lipazın hayvansal yağları alkalın ortama taşıma yeteneği vardır. Alkalın lipaz kodlayan gen ayırıştırılmış ve incelenmiştir.

Kim ve arkadaşları (1998) sığır eti, don yağı ve palmye yağı içeren bir ortamda *Basilus steoretermofilis* L₁ den yüksek alkalın sabit ısılı lipaz üretildiğini bildirmişlerdir. Bu lipaz 60-65 °C ve pH 9-10 ' da en aktif haldedir. Sentetik ortamlardaki aktivite değerlendirmeleri bu enzimin özellikle

p-nitrofenil caprytat e karşı aktif olduğunu göstermiştir.(Kim 1998)

Candida rugosa mayası, sıvı kültür ortamına hayvansal yağlı asitlerin eklenmesiyle üretimi tetiklenebilen hücre dışı lipaz salgılamaktadır.(Lotti et all 1998).Bu lipaz katalitik yapılardan çok ince şekilde ayrılan çeşitli izoformlardan oluşmaktadır.Lipaz üretimi karbon kaynağı olarak oleik asitin eklenmesiyle tetiklenebilir.Aynı mayada yapıcı lipaz üretimi karbon kaynağı olarak glikoz kullanılmasıyla tetiklenmektedir.(Lotti et all,1998)

pH 6.9 da karbon kaynağı olarak hint yağı (%2) kullanıldığında *P.aeruginosa* KKA-5 maksimum lipaz aktivitesi göstermiştir.(Sharon 1998) Bu enzim hint yağının % 90' a kadar hidrolizlenmesine neden olabilir ve alkalın şartlarında (pH 7-10) sabittir.Maksimum aktivite pH 8.5 ' de elde edilir.(Sharon 1998)

Bir çalışma küflerin 56 türünün lipaz üretebildiğini ortaya koymuştur.(Costave Peralta ,1999).*Pe.wortmani* olarak tanımlanan bir türün en iyi lipaz üreticisi olduğu belirtilmektedir.(Costa ve Peralta 1999)Maksimum lipaz üretimi karbon kaynağı olarak zeytinyağının kullanıldığını 7 günlük bir kültürden sonra elde edilmiştir.(12.5 U/ml).Ham lipaz aktivitesi için uygun pHve sıcaklık 7.0 ve 45 °C'dir.(Costa ve Peralta ,1999)

Endonezya da ki sıcak su kaynaklarından alınan bir termofilik bakteri olan *B.termoleourans* yüksek sıcaklıkta lipid ortamlarda hücre dışı lipaz aktivitesi ve yüksek büyüme oranları göstermiştir.(Lee,1999) Tek karbon kaynağı olarak zeytinyağı {(1.5 % vol/vol)} kullanıldığında izole edilmiş ID-1 yağ (zeytin, soya fasulyesi ve mineral yağlar, trigliseritler (triolein, tributrin)ve sentetik yüzeyleri (Tween 20 ve 40)gibi lipidli ortamlarda büyüebilmektedir.Gözden geçirilen raporlara göre, lipaz üretimi çoğunlukla tetikleyiciye bağlıdır ve bir çok durumda enzimin en iyi tetikleyicisi yağdır.

AZOT KAYNAKLARININ ETKİSİ :

Pe.citrinum ' un hücre dışı bir lipazı için ,Sztajer ve Maliszewska (1989)maksimum üretimi % 5 wt/vol peptonu (pH 7.2) içeren bir ortamda elde etmişlerdir.Mısır suyu likörü ve soyafasulyesi gibi azot kaynakları lipaz üretimini harekete geçirmiştir ancak peptondan daha az etkili olmuştur.Üre ve amonyum sülfat lipaz sentezlerini engellemiştir.(Sztajer and Maliszewska,1998).Lipolitik aktivite (1120 U/lt) hücreden bağımsız ortamlarla birleşen zeytinyağından çıkan serbest yağlı asitlerin titrasyonu ile elde edilmiştir.

Pseu domanos SP KW1-56'nın sabit ısılı lipazı, azot kaynağı olarak pepton (%2 wt/vol) ve maya özütü (0,1 wt/vol) içeren bir ortamda üretilmiştir. (Izumi et all, 1990) Lipaz aseton çözeltisi ve jel

filtresiyle arıtılmıştır. Arıtım faktörü 13,9'dur. Fakat sadece % 2,9'u iyileşmiştir. (Izumi et all, 1990). Enzim sodyum dodosil sulfat poliakrilamid jel elektroforezi de (SDS –PAGE) tek bağ oluşturmuştur ve moleküler kütesinin 33 k Da olduğu sanılmaktadır.

Enzim için en uygun ısı 60 C'dir ve 24 saat sonra 60 C'de orijinal aktivitenin yüzde 96'sından fazlası hala devam etmiştir. (Izumi et all, 1990)

Genellikle organik azot kaynakları kullanıldığında mikroorganizmalar yüksek lipaz üretimi sağlar. Bildirilen tek istisna Rho giutinis'dir. (Papaparaskevas etall, 1992). Rho gultinisin iyi gelişmesi için organik azot kaynağı (maya özütü, tripton) gerekli görünse de amonyum fosfat gibi inorganik bir azot kaynağının lipaz üretimine fayda sağladığı görülmektedir. Bu enzimin geçerlilik süresi 45 ve 55 C'de 45 ve 118 dakikadır.

Diğer yazarların da belirttiği gibi Salleh ve arkadaşları (1993) azot kaynağı olarak pepton bulunan bir ortamda termofilik mantar Rhizoporyzae'dan hücre dışı lipaz maksimum seviyede üretmişlerdir. Rhizoporyzae'dan kaynaklanan hücre içi lipazların üretimi kullanılan organik azot kaynaklarına (tripton, triptik,diyest, polipepton) fazla duyarlı değildi. Eminicella, rugulosa, Huricola Sp, T.laniuginassus, Pe purpurogenum, and Chiysexaspirum sulfersem gibi termofilik mantarlardan sabit ısılı lipaz üretme çalışmalarında azot kaynağı olarak maya özü kullanılması oldukça yüksek lipaz ürünleri vermiştir. (Ven Kateshwaklu ve Reddy, 1993).

Azot kaynağı olarak maya özü (% 1), polypepton (% 2) ve soya fasulyesi özü (% 3) bulunan bir ortamda A. Oryzal maksimum alkalin lipaz üretmiştir. (Ohnishi et all. 1994 a). Üretilen enzim, zeytinyağı ve tributrin ortamlarda pH 7.5 ve 10.00'da hareket göstermiştir. Pe.Citrinum'un Brezilya türü, azot kaynağı olarak % 0.5 maya özütü bulunan ortamda 409 U/ml maximum hareketi üretmiştir. (Pimental et all, 1994) Maya özütü konsantrasyonun azaltılması lipaz hareketini de azaltmıştır. Maya özütünün amonyum sülfatla değiştirilmesi lipaz üretimini ortadan kaldırmıştır. (Pimental, 1994) Lipidlerden bağımsız bir ortamda A.niger lipaz üretmiştir ancak üretimi geliştirecek bir tetikleyiciye ihtiyaç duyulmuştur. (Pokorny D 1994). Aynı şekilde ortama amonyum sülfat ve pepton eklenmesi O. Piceace mantarından elde edilen lipaz üretimini genişletmiştir. (Gao ve Breuil, 1995) Enzim 60 C'de ve pH 9.5'de istenen hareketliliği kazanmıştır. ((Gao ve Breuil, 1995)

Wang ve arkadaşları (1995) azot kaynağı olarak % 0.1 maya özütü ve % 1 amonyum klorid içeren ortamda Bacillus soylu A 30-1 (ATCC 53841)'den sabit ısılı alkalin lipaz üretildiğini bulmuşlardır. Kısmen arıtılmış lipaz hazırlığında uygun hareket derecesi 60 C'dir ve uygun pH 9.5'dir. Bu enzim hem hidrojen peroksida hem de alkalin proteasela stabildir. (Sabit). (Wang 1995)

Vordervillbecko ve arkadaşları (1996) *Acinetobacter calcoaceticus*'dan hücre dışı lipaz üretmek için çeşitli azot kaynaklarını araştırmışlardır. Amonyum maya özütü ve protease peptone kullanımıyla kıyaslandığında aminoasit ve tripton kullanımı 2 veya 3' ün faktöründen üretilen lipazı geliştirmiştir. (Vordervillbecko, 1992)

Yine de lipaz üretimi ve sabitliği, seçilen organik azot kaynağını amonyumla desteklenerek geliştirilebilir. (Cordenons 1996) Hücre dışı lipaz, ortam olarak PNPP kullanılarak ölçülmüştür. (Vordervillbecko, 1992)

Lin ve arkadaşları (1996) , % 1 soya fasülyesi özü, % 1.5 pepton, % 0.5 maya özütü bulunan bir ortamda *P.alcaligeros* F-111'den hücre dışı alkolün lipaz üretildiğini bildirmişlerdir. Üretilen lipaz çeşitli deterjanlardan etkilenmiştir. Deterjan uygulaması için iyi bir olay olduğunu varsayarak, SDS, sodyumtripoli fosfat, sodyum dodesil benzer benzeri sulfonat ve sodyum alkoli benzeri gibi katyonik yüzey aktif ajanlar ezim aktivitesini etkilememiştir. % 7'den daha büyük konsantasyonlarda mısır suyu likörü, hücre büyümesi ve lipaz üretiminde hızlı düşüslere neden olmuştur. % 4 popipepton ve % 0.05 maya özütünden oluşan bir ortamda *P.aeruginosa* KKA.5 hücre dışı lipaz üretmiştir. (Sheron 1998)

Hiol ve arkadaşları azot kaynağı olarak %4 mısır özü likörü ve % 1 peptondan oluşan bir ortamda yüksek hücre dışı lipaz hareketi üreten *Rhizop oryoe*'nin lipolitik bir türünü izole etmişlerdir. Bu enzimin hareketi için uygun pH ve sıcaklık pH 7.5 ve 35 C' dir. (Hiol 2000) bu enzim 4.5-7.5 pH aralığında sabittir ve 45 C'de 30 dk inkÜbe edildikten sonra ilk hareketinin % 65'ini korumaktadır.

METAL İYONLARININ ETKİSİ

Magnezyum, demir ve kalsiyum iyonları üretim ortamına eklendiğinde termofilik *Bosilus sp*'ten elde edilen lipaz üretimi birkaç kat artmıştır. (Jansen 1994). Aynı şekilde Pokorny ve arkadaşları (1994) Mg^{+2} bulunan ortamda *A.niger*'den lipaz üretimin genişlediğini bildirmişlerdir.

Ortam Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} ve Co^{+2} ile desteklendiğinde *Acic calcoaceticus* BD 413'den hücre dışı lipaz üretimi genişlemiştir. (Kok etall, 1995)

Bu enzim PNPP gibi uzun açıl zincir p-nitrofenol (pNP) esterleni hidroliz etmiş ve beklenen aktivitesi pH 7.8 ve 8.8 arasında meydana gelmiştir. (Kok, 1995)

A calcoaticus lipazı, *Pseudomonas* lipazlarla oldukça benzerdir. Fosfat içeren ortam Mg^{+2} ile desteklendiğinde *P.pseudoalcoligenler* F-111'den lipaz üretimi artmıştır. (Lin 1995) Bu alkalın lipaz 6-10 pH değerlerinde en aktif ve sabit haldedir ve beklenen reaksiyon ısısı 40 C'dir. *Basilus sp.* A 30

-1 (ATCC 53841)'den lipaz üretilmesi Ca^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} , Na^{+2} , Fe^{+2} , K^{+} , Mn^{+2} , Zn^{+2} içeren karmaşık bir ortam gerektirmektedir. (Wang, 1995) Mineral bakımından zengin sıcak su kaynaklarından (Yellowshane Ulwall Park) alınan bakteriler ortalama 60 C'da pH=9'da büyümektedir. (Wong 1995)

P.pseudoalcaligenes KKA-5'dan maksimum lipaz üretimi, O&M'nin Mg^{2+} konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. (Shoron 1998). Magnezyum iyonlarının ortamda varolması lipaz üretiminde yaklaşık % 50 azalmaya sebep olmuştur. Fakat ortamın kalsiyum iyonlarıyla desteklenmesi lipaz üretimini etkilememiştir. Bir durumda Ca^{2+} 'nın varlığının termofilik *Bacillus* sp. RS-12'lerden lipaz üretimi artırdığı bildirilmiştir. (Sidhu, 1998 a.b). Bakteriler tercihen 50 C'de büyümüş, 40 C'nin altında büyüme göstermemişlerdir. Enzim üretimi büyüme ile bağlantılıdır. % 0.5 Tween 80 ve % 0.5 maya özütünün ortamda kullanılması 50 C kültür sıcaklığında enzimin maksimum seviyede üretilmesini sağlamıştır.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Enzimler

Biyolojik sistemlerde meydana gelen tepkimeler laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmek istendiğinde çok yüksek sıcaklık, basınç vb. gibi ağır fizikokimyasal yöntemlerin uygulanması gerekir. Bu koşullar altında bile reaksiyonların çoğu izlenemeyecek kadar yavaştır. Örneğin lipidlerin standart koşullarda kimyasal olarak herhangi bir katalizör söz konusu olmadığı zaman çok zor şartlar altında hidroliz olduğunu görürken , vücut içerisinde 37 °C çok daha yumuşak koşullarda ve hızlı olarak hidroliz olduğunu görüyoruz. Biyolojik sistemlerdeki tepkimelerin böylesine kolay ve hızlı oluşu enzim adını verdiğimiz biyolojik katalizörler ile gerçekleşebilmektedir (Pekin, B., 1980).

Enzimler, sarmal biçimde kıvrılmış yüksek molekül ağırlıklı proteinlerdir. Enzimlerin en belirgin fonksiyonu canlı hücrelerdeki kimyasal tepkimeleri katalizlemeleridir. Katalizleme olayı, enzimin üzerinde bulunan ve etkin bölge olarak bilinen çok küçük bir bölge tarafından gerçekleştirilir. Katalizleme sırasında substrat etkin bölgeye bağlanır. Maksimum katalitik etki, bu bölgede bulunan fonksiyonel grupların en uygun konuma gelmesiyle oluşur. Enzimlerle ilgili yapılan çalışmalar 1878 yıllarına kadar dayanmaktadır. İlk defa bir enzimin kristal halde elde edilmesi 1926 yılında Sumner adında bir bilimadamı tarafından başarılmış ve bu enzime Üreaz adı verilmiştir. Bunu izleyen yıllarda protein yapıları hakkındaki bilgilerin artması ve giderek yeni enzim türlerinin bulunması sonucu enzimoloji adı verilen büyük bir bilim dalı doğmuştur.

Önceleri, enzimlerin katalitik aktivitelerin yalnızca sağlam hücrelerde kaldığı düşünülmüştür. Oysa zamanla bilimsel çalışmalar ilerleyince enzimlerin büyük bir kısmının biyolojik ve katalitik aktiviteleri kaybolmadan hücrelerden ayrılabilirdiği görülmüş ve bu nedenle laboratuvar ya da endüstri koşullarında kullanılabilme olanağının varolduğu anlaşılmıştır (Pekin, B., 1980).

2.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimler kullanıldıkları substratın veya katalize ettikleri reaksiyonun tipine göre adlandırılmaktadır. Genellikle enzimler, enzimin etkilediği substratın sonuna “ase = az” eki getirilerek adlandırılmaktadır. Örneğin, üreaz üreyi amonyak ve karbondioksit ayırmaktadır. Amilaz ise nişastayı hidroliz eden enzimdir. Enzimler oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar izomerazlar ve ligazlar olmak üzere 6 genel sınıfa ayrılmaktadır.

Enzimlerin bu şekilde adlandırılması halen kullanılmasına rağmen önemini kaybetmiştir. Yeni keşfedilen ve sayıları hızla artan enzimler Uluslararası Biyokimya Derneği (International Union of Biochemistry – IUB) tarafından yeni bir sınıflandırmaya tabi tutulmuştur.

Enzimlerin sınıflandırılmasına yönelik IUB sistemine göre her enzimin sistematik bir kod numarası (E.C.) vardır. Enzimlere 4 numara verilmektedir. İlk numara enzimin yukarıdaki 6 sınıftan hangisine ait olduğunu, ikinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara da enzimin aldığı sıra numarasını belirtmektedir (Özata, A., 2000; Erdal, E., 2004).

2.1.3. Enzimlerin kimyasal yapısı

Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş yan gruplarına kofaktör adı verilir. Örneğin sitokrom oksidaz Cu^{+2} , DNA polimeraz Zn^{+2} ye kofaktör olarak gereksinim duyarlar.

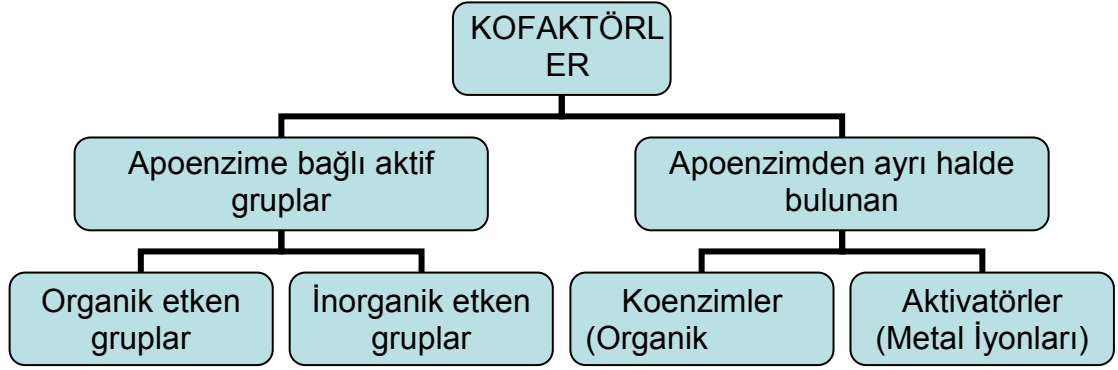
Enzimlerin aktivite göstermek için ihtiyaç duyduğu kompleks organik moleküllere koenzim adı verilmektedir. Örneğin piruvat karboksilaz biotine, suksinik dehidrogenaz ise koenzim olarak FAD' a ihtiyaç duyarlar. Bazı hallerde enzim aktivite göstermek için hem kofaktöre hem de koenzime ihtiyaç duyabilir. Kofaktörler ve koenzimler gevşek veya sıkı bağlıdır. Genellikle diyaliz ile ayırmak mümkündür. Kofaktör ve koenzimler bazen enzime kovalent olarak bağlanır ve diyaliz ile bile ayırmak mümkün olmaz. Enzim yüzeyine sıkıca bağlanmış ve protein yapısında olmayan bu gruplara prostetik grup adı verilmektedir.

Koenzimlerin yapısında genellikle vitaminler bulunmaktadır. Bu bakımdan vitaminler, koenzimlerin yapısına girdiği için metabolik olayların enzimler tarafından kolayca başarılması için organizma bakımından son derece gerekli bileşiklerdir.

Eğer enzim koenzim ve kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif ise enzimin bu haline haloenzim adı verilir. Eğer enzim koenzim ve kofaktörden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelecek olursa enzimin diyalize edilemeyen ve yalnız proteinden meydana gelmiş bu inaktif şekline ise apoenzim adı verilir (Gözükara, E., 1997).

Apoenzime katalitik aktivite özelliği veren kısım kofaktördür. Kofaktörler aşağıda şekil 2.1' de olduğu gibi sınıflandırılırlar.

Genelde apoenzimler yalnız başına katalitik aktivite göstermezler. Ancak, bir apoenzim ile kofaktörü birarada oldukları zaman gerçek enzim aktivitesi gözlenir (Pekin, B., 1979).



Şekil 2.1. Kofaktörlerin sınıflandırılması (Pekin, B.,1979; Erdal, E., 2004)

2.1.4. Enzimlerin katalitik özellikleri

Enzimler biyolojik reaksiyonları katalize ettikleri için genel olarak biyokatalizörler sınıfına girerler. Doğal enzimler molekül büyüklükleri bakımından genellikle kolloidal tanecikler sınıfına girerler. Bu nedenle kimyasal kataliz yönünden enzimler mikro heterojen katalizörler olarak adlandırılabilirler.

Enzimlerin katalitik aktiviteleri katalize ettikleri reaksiyon hızını tayin ederek saptanır. Enzim aktivitesi turnover sayısı ile belirlenir. Turnover sayısı 1 mol aktif enzim tarafından 1 dakikada ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Enzim örneklerinin spesifik aktivitelerini tanımlamak için turnover sayısı yerine ‘enzim birimi veya ünitesi’ de denilebilir. Enzim birimi (UI) dakikada 1 mikromol substrat dönüşümünü katalizleyen miligram enzim miktarı olarak tanımlanır. Reaksiyon spesifiklikleri bakımından enzimler 4 gruba ayrılırlar.

1.Salt spesifiklik: Bir enzim yalnız bir reaksiyonu hızlandırabiliyorsa böyle enzimlere salt (mutlak) spesifik enzimler adı verilir.

2.Grup spesifikliği: Bu sınıfa giren enzimlerin etki alanı salt spesifik enzimlerden biraz daha geniştir. Örneğin pepsin enzimi bazı peptid bağlarının hidrolizinde etki eden bir katalizördür.

3.Reaksiyon veya bağ spesifikliği: Kimi enzimler belli bir reaksiyon türlerini katalize ederler. Mesala lipazlar tüm trigliseridlerin tepkimelerini hızlandırır. Yalnız hız artışı yağın çeşidine göre değişiklik gösterir.

4.Stereokimyasal spesiflik: Eğer bir enzim bir bileşimin yalnız bir stereokimyasal şekli üzerine etki ediyorsa, bu tür enzimler bu gruba girerler. Örneğin arjinaz enzimi l-arjininin üzerine etki yaparken d-arjinine hiç bir etki yapmaz (Pekin, B., 1980).

2.1.5. Enzim aktivatör ve inhibütörleri

Enzimlerin katalitik etkileri serbest ya da enzime bağlı olarak bazı metal iyonları tarafından artırılmakta veya azaltılmaktadır. Aktivatör olarak etki eden metal iyonlarını yapısında bağlı olarak bulunduran enzimlere de metalloenzimler adı verilir. Enzimler üzerinde aktivatör olarak etki yaptığı saptanan iyonlar şunlardır: Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Al^{+3} , NH_4^+

Aktivatör ve inhibütör olarak etki eden her bir iyon için belirli bir optimum konsantrasyon vardır. Bazı enzimler, aktivite gösterebilmeleri için mutlaka bir metal iyonuna gereksinim duyarlar. Bu iyonlar EDTA gibi şelat yapıcı bileşiklerle ortamdaki uzaklaştırıldığı zaman enzim aktivitesinde büyük oranda düşmeler gözlenir.

Inhibütörlerinde aktivatörler gibi reaksiyon hızına etkileri farklılık gösterir. Özellikle protein çöktürmede kullanılan bir takım maddeler inhibüsyona yol açabilirler. Özellikle enzimlerin protein kısmında -SH grubu bulunuyorsa bazı ağır metal iyonları inhibütör olarak etki ederler (Gözükara, E., 1997).

2.1.6. Enzim substrat ilişkisi

Enzim aktif merkezinde görev alan aminoasitlerden bazıları substratın doğru olarak aktif merkeze bağlanmasını sağlamaktadır. Başka bir deyişle enzimlerin aktif merkezinde bir substratın bağlandığı bir de katalitik değişikliğe uğratıldığı merkez bulunmaktadır. O halde aktif merkezdeki bazı bölgeler substratı bağlamakta diğer bölge de kataliz olayını başarmaktadır. O halde aktif merkezde iki bölge bulunmaktadır. Bunlardan birincisi bağlanma bölgesi diğer ise katalitik aktivite bölgesidir.

Substrat ve enzimin birbiriyle bağlanmasıyla alakalı çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Örneğin anahtar-kilit modelinde substratın aktif merkezde enzime bağlanırken anahtar kilit gibi bağlandığı kabul edilmiştir. Diğer bir görüşe göre ise enzim substratı olmadığı zaman serbest olarak bulunmaktadır. Ancak substratı ile buluşacak olursa enzim özel yapısını almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır. Bu ikinci hipoteze de indüklenmiş uyum hipotezi adı verilmektedir.

2.1.7. Enzim aktivitesine etki eden parametreler

2.1.7.1. pH etkisi

Enzim reaksiyon hızları farklı hidrojen iyonu konsantrasyonlarında farklı değerler almaktadırlar. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH' a da o enzimin optimum pH' ı denir. Optimum pH değerinin hemen yanındaki pH değerlerinde enzim reaksiyonlarının yavaşladığı görülmektedir. Genellikle optimum pH değerinden uzaklaştıkça aktivite düşmekte, enzim denature olmakta veya inaktif hale geçmektedir. Enzim çalışmalarında optimum pH da çalışabilmek için tampon çözeltiler kullanılmakta ve pH belirli bir değerde sabit tutulmaya çalışılmaktadır.

2.1.7.2. Sıcaklık etkisi

Normal kinetik kurallarına göre sıcaklık arttıkça reaksiyon hızıda artmaktadır. Enzim reaksiyonları aktivite sıcaklık ilişkisi bakımından incelendiğinde normal kimyasal reaksiyonlarla birebir uyumadığı görülür. Enzim reaksiyonlarında ancak belirli bir sıcaklığa kadar reaksiyon hızının dolayısıyla aktivitenin arttığı görülür. Enzimatik reaksiyonlarda bu sıcaklık sınırları içerisinde Arrhenius kanununa uymaktadırlar. Enzimler protein yapısında oldukları için belirli bir sıcaklıktan sonra yapıları bozulmaya başlar, belirli bir süre sonra enzim tamamen denatüre olacağından enzim üst sıcaklık sınırına doğru çıktıkça tamamen aktivitesini yitirir.

2.1.7.3. Substrat konsantrasyonu etkisi

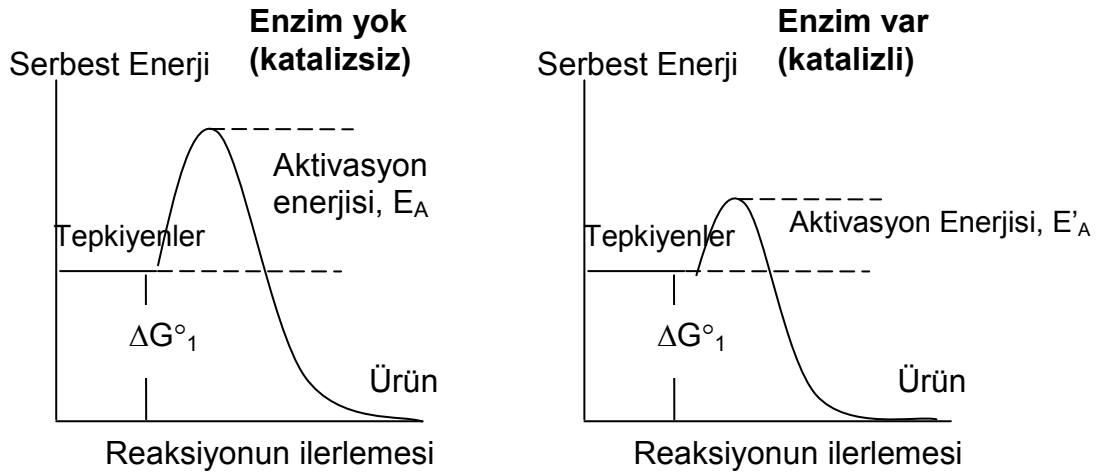
Enzim substrat konsantrasyonu ilişkisi incelendiği zaman başlangıçta substrat konsantrasyonu arttıkça enzimatik tepkime reaksiyon hızının arttığı dolayısıyla enzim aktivitesinin arttığı görülmektedir. Substrat konsantrasyonu belirli bir limite ulaşıncaya iki ihtimal söz konusudur: Substratı inhibe edici etkisi varsa reaksiyonun yavaşladığı gözlemlenir, inhibe edici bir etkisi yoksa substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın hızın değişmeden sabit kaldığı gözlemlenmektedir.

2.1.7.4. Enzim konsantrasyonu etkisi

Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar, bu seviyeden sonra substrat konsantrasyonunun artması ile reaksiyon hızı değişmez. Bu durumun grafiksel ifadesi Şekil 2.13' de görülmektedir.

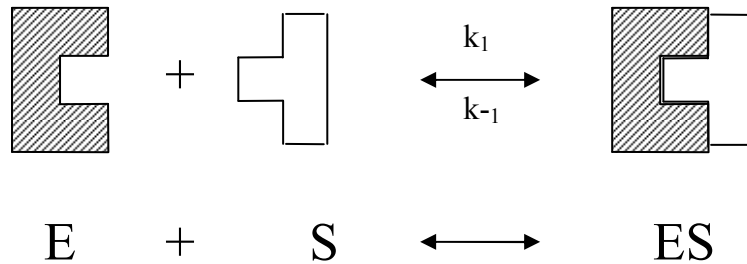
2.1.8. Enzimatik reaksiyon kinetiği

Enzimler katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini substrata bağlanarak ve enzim substrat kompleksi oluşturarak düşürürler. Enzimler serbest enerji yükünü ya da denge sabitini etkilemezler. Şekil 2.6.'da da enzimin reaksiyonun aktivasyon enerjisine etkisini görülmektedir.



Şekil 2.2. Enzim katalizli ve katalizsiz reaksiyonların aktivasyon enerjileri

X – ışını ve Raman spektroskopisi kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar enzim–substrat (ES) kompleksinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Ancak enzim – substrat etkileşimi moleküler açıdan henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu etkileşim farklı enzim – substrat kompleksleri için farklı olabilmektedir. Enzim ve substratı arasındaki etkileşim genellikle zayıf kuvvetlerle olmaktadır. Çoğunlukla, Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı ES komplekslerinin oluşumunu sağlar. Substrat aktif bölge olarak bilinen enzimin özel bir bölgesine bağlanır. Substrat bağıl olarak küçük bir moleküldür ve çok daha büyük olan enzim molekülünde belli bir bölgeye yapısal olarak uyar. Bu etkileşimi anlatan en basit model şekil 2.7' de anlatıldığı gibi, enzimi kilit, substratı anahtar olarak alan anahtar – kilit modelidir (Erdal, E., 2004).



2.1.9. Lipaz enzimi

Lipazlar, enzimler içerisinde yağ asitlerini sentezleyen veya yağları hidrolizleyen lipolitik enzimler olduğundan önemli bir grup oluştururlar ve lipazlar gliserin ile yağ asitlerinden oluşan esterleri hidroliz eden enzimler olarak tanımlanır Lipazlar sulu ortamda katı ve sıvı yağların ve diğer lipidlerin hidrolizini katalizleyerek diaçilgliserinler, monoaçilgliserinler, gliserin ve serbest yağ asitlerini oluştururlar. Enzimatik hidroliz tepkimesine lipoliz adı verilir.

Lipazların doğal substratları uzun zincirli yağ asitlerinin gliserin esterleri suda çok az çözünürler. Lipazlar, enzimin çözündüğü sulu faz ve su ile karışmayan substrat fazı arasındaki ara yüzeyde ester bağlarının hidrolizini katalizler. Gliseridler tercih edilen substratlarsa da lipaz enzimleri yağ asitlerinin diğer alkollerle yaptıkları esterleri de hidrolizleyebilirler. Ancak suda çözünen esterlere karşı aktiviteleri oldukça düşüktür. Lipazlar spesifik seçiciliği olan biyokimyasal katalizörler olup belirli özellikte ve yapıdaki ester bağlarına etkilidirler. Bu nedenle kimyasal katalizörlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan ürünlerin kontrolü mümkün değilken lipazlarla yapılan reaksiyonlar kontrol altında tutulabilir, istenmeyen yan ürünlerin oluşumu engellenebilir ya da minimum düzeyde tutulabilir. Lipaz enzimi ile katalizlenen enzimatik reaksiyonların bir diğer önemli avantajı reaksiyonların kimyasal prosese göre nispeten daha ılımlı koşullarda (nötral pH, sıcaklık, atmosferik basınç gibi) gerçekleştirilmesidir. Lipazlar substrat spesifliklerinden dolayı reaksiyonu daha seçimli gerçekleştirirler. Lipolizinin spesifliği ve derecesi kullanılan lipaza bağlıdır.

Lipazlar, hidrolazlar sınıfında olup triaçil gliserol ester hidrolazlar olarak da adlandırılırlar. Üsttede bahsedildiği gibi lipazlar hidrolazlar sınıfında olmakla beraber yağ asit esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Katalizleme su ile çözünmez substratın oluşturduğu ara yüzeyde gerçekleşir. Su ve yağın oluşturduğu bu ara yüzey enzim aktivitesi için gereklidir. Lipazın tutuklanması sırasında lipaz ile birlikte tutuklanmış olan su bu ara yüzeyin oluşmasını sağlar.

Dünyada ticari olarak üretilen enzimlerin % 3' ünü lipazlar oluşturur. Lipazlar özelliklerine göre, spesifik olmayan lipazlar, 1,3-spesifik lipazlar ve yağ asidi spesifik lipazlar olarak üç ayrı grupta incelenir.

2.1.9.1. Spesifik olmayan lipazlar

Bu gruba giren lipazlar, trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açil gruplarını koparabilme yeteneğine sahip olup, sonuçta trigliseridleri, gliserin ve serbest yağ asitlerine parçalarlar. Reaksiyonda ana ürün olarak diaçil ve monoaçil gliserinler oluşur. *Candida cylindracea*,

Corynebacterium acnes, *Staphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girerler (Elibol, M., 1997)

2.1.9.2. (1,3)-Spesifik Lipazlar

Bu gruba giren lipazlar nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda triaçilgliserinlerden yağ asitleri 1,2(2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler oluşur. 1,2(2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçilgliserinlere ve 1,3-monoaçilgliserinlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilir ve sonuçta 1,3-spesifik lipazlar da spesifik olmayan lipazlar gibi trigliserinleri gliserin ve serbest yağ asidlerine kadar parçalayabilirler. Pankreas, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-spesifiktir (Haas, M.J., 1992).

2.1.9.3. Yağ asidi spesifik lipazlar

Bu grup lipazlar açilgliserinlerdeki bazı yağ asidlerine spesifik olup sadece bu yağ asidlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar. Yağ asidi spesifik lipazlar içesterleşme reaksiyonunda kullanılırsa oluşacak ürünler çok sınırlıdır ve bu sayede amaca uygun triaçil gliserinler sentezlenebilmektedir. *Geotrichum candidum* tarafından üretilmiş lipazın uzun zincirli bir yağ asidine özel bu tipinin esterlerin hidrolizi için bir çok özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. (Baillargeon, M.W., 1989)

Lipaz enzimleri, iç esterleşme prosesinde serbest halden çok ekonomik açıdan daha uygun olan tutuklanmış halde kullanılırlar. Enzim tutuklanması için organik çözücülerden etkilenmeyen inert desteklerin (taşıyıcı) kullanılması gerektiğinden, enzim tutuklanmasında kieselguhr, diatome toprağı, celite, hidrosiapatit gibi inorganik taşıyıcıların kullanılması uygundur. Literatürde lipaz enzimini tutuklamak için kullanılan diğer malzemeler ise, silika jel, oyuklu elyaf, prepolimer reçineler, poliüretan prepolimerler, Ca-aljinat, reçineler (amberlite), jeller (octyl sefaroze, diaion), sefadeks, PVC, kitin, kitosan, agaroz, sefaroze ve trisakrildir (Sharma, R., 2001).

Lipazlar fiziksel özellikleri, substrat spesiflikleri gibi biyokimyasal özellikleri, optimum reaksiyon koşulları, aktivatörlere gereksinimleri ve inhibitörlere duyarlılıkları açısından birbirlerinden farklılıklar gösterirler. Lipazların büyük çoğunluğu trigliseridlerdeki ester bağları ve bu moleküllerdeki yağ asidlerinin uzunluğu için yüksek spesifliğe sahiptir. Örneğin *Candida*

cylindracea' dan elde edilen enzim trigliseriddeki üç ester bağının hepsine birden atak yapar ancak oldukça zayıf termal kararlılığa sahiptir. *Penicillium cyclopium*' dan elde edilen lipazın bu üç pozisyonada atak yaptığı fakat bu zincirin trigliseridlere nazaran monogliseridlere daha hızlı atak yaptığı kaydedilmiştir. Taksonomik olarak yakın zincirler farklı tipte lipazlar üretebilirler, bu nedenle lipazın farklı kaynaklarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Saxena, R.K., 2003). Eukaryotlarda, lipazlar yağın sindirilmesi, absorpsiyon, yeniden yapılanmayı kapsayan lipid metabolizmasının ve lipoprotein metabolizmasının değişik basamaklarında içerilmektedirler. Bitkilerde lipazlar enerji depolama dokularında bulunurlar. Lipazlarla lipidlerin ara yüzeyde nasıl etkileştikleri hala tam olarak açık değildir ve yoğun araştırmaların konusudur. Hemen hemen her hafta yeni bir kaynaktan yeni bir lipazın keşfi literatürde kaydedilmektedir. Lipazlar üzerindeki araştırmalar Avrupa Topluluğu tarafından desteklenen bir araştırma projesinden esas ivmesini almaktadır. Bu projede, bir kaç lipaz yapısı X- ışını kristalografisi ile çözülmüştür ve enzimlerin bu sınıfı moleküler biyoloji ve kinetik açısından ayrıntılı bir şekilde incelenmektedir (Haas, M.J., 1992).

2.1.9.4. Lipaz aktivite tayin metotları

Lipaz aktivitesi oluşan tepkimedeki trigliseridin ortadan kaybolması veya yağ asidi ve gliserol oluşumu izlenerek saptanabilir. Trigliseridin azalma hızının saptanmasıyla ilgili eski bir metot olan ve özellikle tributirin substratı için geliştirilen stalagmometrik yöntemden bahsedilebilir. Yöntemin esası yüzey gerilimindeki değişimin ölçümüdür. Bunun yanında tepkimenin olduğu ortamdaki emülsiyonun berraklığının zamanla değişiminin izlendiği türbidimetrik metottan da bahsedilebilir. Bu iki metot da trigliseridin azalma hızının tespitiyle alakalıdır.

Yağ asidi artım hızının ölçülmesiyle ilgili özellikle pH stat metodundan bahsedilebilir. Aktivite tayininde en çok tercih edilen metotlardan birinin bu olduğu söylenebilir. Yöntemin esası yağ asidi oluşumuyla düşen pH'ın kontrolü esasına dayanır. Ortam pH'ı düzenli olarak ölçülür ve azalan pH bir baz yardımı ile belli bir pH değerinde sabit tutulmaya çalışılır. Tepkime boyunca kullanılan baz miktarından hareketle kullanılan enzimin aktivitesi tayin edilmeye çalışılır.

Bu bahsedilen metotların yanında karbondioksit hacminin zamanla ölçüldüğü warburg analizinden, özgül hacimlerin değişimine dayanan dilatometrik yöntemden ve genellikle kompleks oluşumlarına dayanan bir yöntem olan kolorimetrik yöntemlerden bahsedilebilir.

2.1.9.5. Para nitro phenil palmitate (p-NPP) metodu

Lipaz aktivite tayin metotlarından biri de spektrofotometrik bir metot olan p-NPP metodudur. Özellikle çok sayıda aktivite tayininin yapılacağı durumlarda pratikliği, ölçüm hassasiyeti ve çok sayıda deney setine kolayca uygulanabilirliği açısından son yıllarda özellikle tercih edilen bir metottur. Esası p-nitro phenil palmitate kullanılarak oluşan tepkime sonucu ortaya çıkan p-nitro phenolun zamanla değişiminin spektrofotometre yoluyla takibine dayanır.

2.2. Mikroorganizmalar

2.2.1. Mikroorganizmaların genel özellikleri

Canlılar alemi genel olarak üç grupta incelenebilir.

1. Protista: Bu gruptaki canlılar da iki sınıfa ayrılırlar.

Prokaryotlar: En ilkel tek hücreli canlılar olan bu grubun başlıcaları bakteriler, virüsler ve mavi-yeşil alglerdir.

Ökaryotlar: Prokaryotlardan daha gelişmiş canlılar grubudur. Hücre yapılarında farklılıklar vardır. Mantarlar (şapkalı mantarlar, küfler ve mayalar), tek hücreli hayvanlar (protozoalar) ve su yosunları (algler) bu gruba girerler (Pekin, 1983).

2. Bitkiler

3. Hayvanlar

Bu üç grupta yer alan canlıların çoğu biyokimya mühendisliğinde oldukça önem taşırlar ve çeşitli ürünlerin eldesi, enzim ve protein ayırma ve saflaştırma, genetik ve medikal uygulamalar, atıksuların arıtılması gibi birçok amaç için geniş ölçüde kullanılırlar. İkinci ve üçüncü grupta yer alan canlılar gelişmiş canlılardır. Birinci grupta yer alan ve ancak mikroskop altında görülebilen ve çoğunlukla tek hücreli olan canlılar mikroorganizma olarak adlandırılır. Mikroorganizmalar doğada, su ve toprakta, bazı gıda maddelerinde, gelişmiş canlıların deri ve bağırsaklarında, organik maddelerde hemen her yerde bulunurlar (Pekin, 1983; Walker, 2000).

Mikroorganizmaları çeşitli şekillerde gruplandırabilmek mümkündür. Kullandıkları besin yönünden inorganik hammadde kullanarak çoğalan mikroorganizmalara litotrof, organik besin kullanarak çoğalanlara organotroflar denir. İhtiyacı olduğu karbonu organik bileşiklerden sağlıyorsa hetotrof, CO₂'den sağlıyorsa ototrof mikroorganizma denir. Enerji kaynağı olarak güneş ışığı kullananlara fototrof, enerjisi kimyasal maddelerden sağlayan mikroorganizmalara kemotrof denir. Ayrıca oksijen ihtiyacına göre de aerobik, anaerobik, fakültatif ve mikroarofilik olmak üzere dört gruba ayrılırlar.

Mikroorganizmalar yapılarında (virüsler hariç) yaklaşık %75-80 oranında su içerirler. Bakteri, maya ve tek hücreli alglerin kuru ağırlıklarının %50'si proteinden oluşur. Mantarlar gibi daha karmaşık mikroorganizmaların hücre duvarını oluşturan inert polisakkarid bileşikler ise, kuru ağırlıklarının büyük oranını oluşturur. Virüsler hariç bütün mikroorganizmaların diğer bir önemli bileşeni de lipidlerdir.

Mikroorganizmalar uygun koşullarda büyür, gelişir ve çoğalırlar, uygun olmayan ortamlarda üreyemezler, ya ölürler ya da bu ortamlara dayanacak şekiller oluştururlar. Mikroorganizmaların gelişmesi ve üreyebilmesi için gerekli şartları sağlayan (ortam pH'ı, nemlilik, oksijen ve çeşitli derişimlerde kimyasallar) ve gerekli maddeleri içeren ortama besin ortamı denir.

2.2.2. Mikroorganizmaların büyümesi

Her mikroorganizma grubu farklı şekilde büyür ve aynı besin maddesini farklı metabolik yollarla kullanabilir. Çoğalmaları için farklı büyüme ortamlarını tercih eden mikroorganizmalar, hücre içerisinde de farklı kimyasallar içerebilirler. Üstte de denildiği gibi virüsler haricindeki mikroorganizmaların yaklaşık %75- 80'ni su oluşturur. Bakteriler, maya ve tek hücreli algler kuru ağırlıklarının yarısı kadar protein içerebilirler ve bu proteinlerin çoğu enzim yapısındadır.

Mikroorganizmaların üremesini etkileyen en önemli faktörlerden biri de ortamdaki besin maddeleridir. Özellikle şeker (glukoz, sakkaroz, laktoz, maltoz, fruktoz) türü maddeler mikroorganizmaların büyümesini etkileyen büyümeyi sınırlayan ana besin maddesidir. Ayrıca mikroorganizmalar azot, potasyum, fosfor, kalsiyum, magnezyum gibi maddelere de ihtiyaç duyarlar.

2.2.2.1. Enerji kaynağı

Mikroorganizma, büyüme ve sentez için gerekli enerjiyi, karbon kaynağı olarak karbondioksiti veya çözeltideki bikarbonatları kullanarak içerdiği klorofil a ve b pigmentleri katalizörlüğünde güneş enerjisinden sağlar. Karanlıkta ise gerekli enerjiyi glukoz ve sakkaroz gibi organik kökenli karbon kaynaklarından temin eder. Bunlar nişasta, şeker, organik asitler, yağlar ve hidrokarbonlardır. Fakat aynı karbon kaynaklarını parçalama şekilleri mikroorganizmadan mikroorganizmaya çok değişiklik gösterir. Ekseri mayalar nişastayı ya hiç ya da yeter derecede hızlı parçalayamadıkları halde, şekerleri kolaylıkla parçalayabilirler. Birçok hallerde, hidrokarbonlarda olduğu gibi, parçalanma ilk defa parçalayıcı enzimlerin substrata adaptasyonlarından sonra meydana gelir. Yüksek sıcaklıklarda yaşayamayan mikroorganizma 20-25°C ve pH 7.0 değerinde en verimli üremeyi gösterir.

2.2.2.2. Azot kaynağı

Azot kaynağı olarak birçok hallerde NH_4 ve NO^{-3} gibi anorganik azotlu maddeler asimile edilebilir. Başka hallerde ise organik azot kaynakları daha iyi değerlendirilir. Örneğin ürin, pürin, çeşitli aminoasitler, pepton, maya ekstraktı ve protein bu gibi maddelerdir.

2.2.2.3. Mineral kaynağı

Mikroorganizmalar azot ve karbon kaynaklarından farklı olarak element halinde O, H, P, S, K, Ca, Mg, Fe ve kısmen iz element olarak Mn, Cu, Zn, Mo, Co, Ni, V, B ve Na isterler. Bu iz elementlerin pek çoğu diğer tuzlar ve kompleks maddeler içinde bulaşmış bir halde bulunurlar (Pekin, 1983).

2.2.3. Mikroorganizmanın büyümesine etki eden parametreler

2.2.3.1. pH

Hidrojen iyonu derişimi (pH) mikrobiyal üreme hızını, dolayısı ile enzimlerin aktivitesini etkiler. Üreme için optimum pH, ürün oluşumu için olan optimum pH'tan farklı olabilir. Genellikle kabul edilebilir pH aralığı optimumdan ± 1 ile 2 pH birimi kadar değişebilir. Farklı mikroorganizmalar farklı pH optimumlarına sahip olabilir; bir çok bakteriler için optimum pH 3.0–8.0 arasında değişir, mayalar için 3.0–6.0, küfler için 3.0–7.0, bitki hücreleri için 5.0–6.0, hayvan hücreleri için 6.5–7.5 arasında değişir. Birçok organizma, çevresel pH'ta düzensizlikler oluştuğunda, hücre içindeki pH'ı göreceli olarak sabit bir değerde tutmak için mekanizmalara sahiptir. pH optimum değerinden farklılık gösterdiğinde, organizmanın varlığını sürdürme enerji gereksinimleri artar. Farklı mikroorganizmaların, farklı pH optimumlarına sahip olmaları nedeniyle, ortam pH'ı üremesi istenen mikroorganizma türüne seçimlilik sağlamak için kullanılabilir.

Çoğu fermentasyonlarda pH önemli ölçüde değişebilir. Azot kaynağı önemli olabilir. Eğer amonyum tek azot kaynağı ise, hidrojen iyonları amonyağın mikrobiyal kullanımının bir sonucu olarak, pH'ta gözlenen bir azalma ile birlikte, ortama serbest bırakılabilir. Eğer nitrat tek azot kaynağı ise, hidrojen iyonları, pH'ta gözlenen bir artış ile birlikte nitratı amonyağa indirgemek için, ortamdaki uzaklaştırılır. Aynı zamanda pH, organik asitlerin üretimi, asitlerin özellikle de aminoasitlerin kullanımı veya bazların üretimi nedeni ile de değişebilir. CO_2 'in ortama eklenmesi veya ortamdaki uzaklaştırılması, deniz suyu veya hayvan hücre kültürü gibi bazı sistemlerde pH'ı önemli ölçüde değiştirebilir. Bir tampon veya aktif pH kontrol sistemi aracılığı ile pH kontrolü önemli olabilir (Shuler ve Kargı, 2002).

2.2.3.2. Sıcaklık

Mikroorganizmalar için diğer önemli bir koşul sıcaklıktır. Her mikroorganizma için belli sıcaklık sınırları içinde bir gelişme optimumu vardır. Sıcaklık, mikroorganizma ortamının içerisindeki çözülmüş oksijen derişimini, buna bağlı olarak biyolojik aktiviteyi oldukça fazla etkilemektedir. Her mikroorganizma için belli sıcaklık içinde bir gelişme optimumu vardır. Bu her zaman belli bir metabolizma ürününün optimum oluşumu ile uyum halinde bulunmaz. Sıcaklık mikroorganizmanın gelişmesinde yalnız bir koşul değil aynı zamanda bir sterilizasyon aracıdır.

2.2.3.3. Oksijen ihtiyacı

Mikroorganizmanın gelişmesinde çok önemli bir faktör de oksijendir. Ayrıca mikroorganizmaların verimli gelişimi için, karıştırma ile substratla devamlı teması da sağlanmalıdır (Pekin, 1983; Kargı, 1993; Walker, 2000). Birçok fermentasyon olaylarında başlangıçta substratta mevcut olan oksijen CO₂ veya H₂ oluşmasıyla substrattan veya substrat üstündeki hava tabakasından sürülüp atılır. Bazı durumlarda daha iyi bir oksijensiz koşul yaratmak için fermentasyon sıvısı içine CO₂ - N₂ sevk edilir (Shuler ve Kargı, 2002).

2.2.4. Mikroorganizmaların büyüme evreleri

Bakterilerin bir çok maya ve küf mantarlarının gelişmesinde aşağıdaki evreler gözlemlenebilir (Şekil 2.1).

2.2.4.1. Gecikme evresi

Belirli bir besin ortamına ekilen mikroorganizmalar yeni ortama uyum gösterip çoğalmaya başlayıncaya kadar belirli bir süre geçer. Bu sırada hücre sayısında hemen hemen hiçbir artış gözlenmez. Bu süreye gecikme evresi adı verilir. Bu sürenin uzunluğu aşılana bakterinin yaşı ve besiyerinin iyi seçilmesine bağlıdır. Gecikme evresinden sonra mikroorganizma sayısı yavaş yavaş artmaya başlar. Mikroorganizma sayısı belirli bir düzeye ulaşıncaya kadar da geçiş evresi diye adlandırabileceğimiz ara evre devam eder.

2.2.4.2. Logaritmik evre

Bu evrede mikroorganizmaların canlı, genç ve dinç olduğu kabul edilir. Logaritmik evrede mikroorganizmalar üstel olarak arttığı için kesikli kültürlemede ortamdaki besinler giderek azalır. Ortamda inhibe edici ürünlerde oluşabileceği için maksimum derişime ulaşılmayabilir.

2.2.4.3. Duraklama evresi

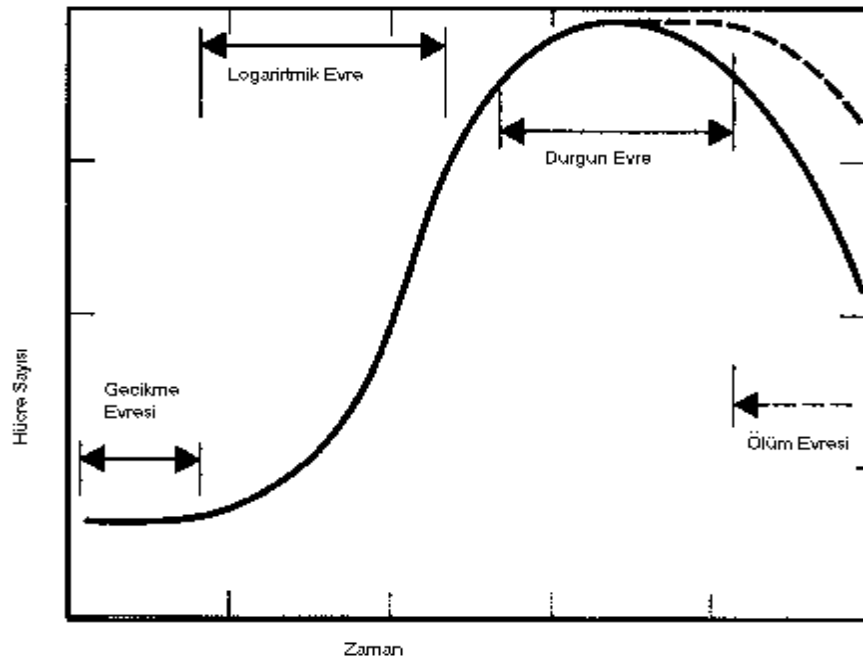
Logaritmik evreden sonra mikroorganizmaların yaşlanması ve ölüm olayının belirginleşmesi nedeni ile çoğalmada yavaşlama yani logaritmik evreye kıyasla çoğalma hızında azalma gözlenir. Buna duraklama evresi denir.

2.2.4.4. Sabit evre

Bu evrede kimi mikroorganizmalar ürer, kimileri ölür ve bazıları da çoğalmadan yaşamlarını sürdürür. Bu üç etken birbirini dengelediği için mikroorganizma sayısında zamana göre net bir artış gözlenmez.

2.2.4.5. Ölüm evresi

Mikroorganizmaların dışa salgıladığı enzimlerden dolayı hücre zarlarında parçalanma ve hidroliz olayları belirgin bir hal alır. Hidrolitik ve lipolitik enzimlerin meydana getirdiği bu olaya genel olarak 'Lisis' denir (Pekin, 1983; Shuler ve Kargı, 2002).



Şekil 2.3. Mikroorganizma büyüme evreleri

2.2.5. Mayalar

Mayalar mantar ailesinin geniş bir bölümünü oluştururlar. Doğada çok yaygın olarak bulunan mayaların hücre yapıları büyük oranda proteinler, polisakkaritler, lipidler ve nükleik asitlerden oluşur. Hücre büyüklüğüne göre bakterilerle yüksek mantarlar arasında yer alırlar (Shuler ve Kargı, 2002). Maya hücre zarı ise genellikle protein, lipid ve fosfat yapıdadır. Genel olarak maya hücrelerinin %75'i su geri kalanı ise diğer maddelerdir. Diğer maddelerin yaklaşık yarısını proteinler, geri kalan kısmını da karbonhidratlar, yağlar, aminoasitler, peptidler, vitaminler ve enzimler oluşturur. Mayalarda bulunan enzimler hidrolazlar ve desmolazlar olarak iki ana gruba ayrılabilir. Hidrolaz enzimleri karbohidrolaz, proteaz ve esterazlardır. Karbohidrolazlardan olan glikonaz yedek besin maddesi glikojeni glikoza, sakkaraz sakkarozu glikoz ve fruktoza, maltaz maltozu glikoza dönüştürür. Proteazlar yüksek moleküllü proteinleri hidrolize ederek parçalayan enzimlerdir. Esterazlardan olan lipaz, yağları hidroliz eder, fosfataz ise fosforik asitin organik bileşimlerini parçalayarak fosforik asit açığa çıkarır. Desmolaz enzimleri yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerini katalizler. Ayrıca hücre zarında permaazlarda denilen ve dış ortamdan hücre içerisine madde transferini sağlayan enzimler de bulunmaktadır.

Mayaların üremeleri bölünerek ya da tomurcuklanarak olmaktadır. Bölünerek çoğalan maya hücreleri, hücre ortasından bölünerek bir ara bölme oluşturur ve buradan hücre ikiye ayrılarak aynı büyüklükte iki yavru hücre oluşur. Tomurcuklanarak çoğalan mayalar uygun çevre koşulları bulurlarsa tomurcuklanma ile bir hücreden bir veya daha çok çıkıntı meydana gelir ve bunlar yeni hücreler halinde gelişir. Gelişen bu hücreler daha sonra ana hücreden ayrılır. Tomurcuklanarak çoğalan bir maya hücresi yaklaşık 50-55 defa tomurcuklanabilmektedir.

Maya hücreleri, hücre boyutları, şekilleri ve renkleri bakımından geniş bir dağılım gösterirler. Hücre biçimleri genellikle küresel, elipsoidal, uç kısımları küresel silindirik (limon yapısına benzer) veya oval olabilmektedir. Mayaların hücre çapları bazı türlerde farklılık göstermesine karşın, genellikle 1-10 µm aralığında değişmektedir.

Mayaların gelişebilmeleri ve aktivitelerini devam ettirebilmeleri için bazı ortam şartlarına ve bazı besin maddelerine ihtiyaçları vardır. Mayaların üremelerini etkileyen en önemli ortam şartları pH, sıcaklık ve havalandırmadır. Mayalar asidik ortamda gelişebilen mikroorganizmalardır. Mayalar için en uygun üreme pH'ı 4.0-4.5'tir. Ayrıca mayalar 0-50°C arasında değişen geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilir. Mayadan mayaya fark etmesine rağmen genellikle hepsi en iyi üremeyi 25-27°C'de gösterir. Ancak daha düşük ve yüksek sıcaklık maya aktivitesini ve üremesini oldukça yavaşlatır. Mayaların üremesini etkileyen bir diğer etken ise havalandırmadır. Mayalar havalandırılmalı ve havasız ortamda üreyebilirler. Ancak havalandırılmalı ortamda daha hızlı ürerler. Havasız ortamda ise besin maddesini ürüne (etil alkol) dönüştürürler. Maya büyümesine ortam şartları dışında bazı besin maddeleri de doğrudan etki eder. Heterotrof bir mikroorganizma olan mayaların en önemli ve üremesini kısıtlayan ve kontrol eden besin maddesi

karbonhidratlardır. Bu karbonhidrat kaynağı glukoz, sakkaroz, fruktoz, mannoz veya laktoz olabilir. Mayaların üremesine etki eden bir diğer önemli madde ise azottur. Bunun yanında potasyum, fosfor, kalsiyum, magnezyum gibi maddelere de ihtiyaç duyarlar.

Tipik bir maya hücresini oluşturan kısımlar ve içerdikleri organellerin işlevleri aşağıda açıklanmaya çalışılmıştır (Pekin, 1983; Walker, 2000):

Hücre duvarı: Maya hücresinin en dış tabakasında bulunan hücre duvarı hücreye şekil verir ve hücreyi korur. Hücre içi ve dış ortam arasındaki osmotik basınç dengesini sağlar. Başta su olmak üzere hücre içine giren maddelerin kontrolünü hücre duvarı yapar. Ayrıca dış ortamdaki bütün maddelerin tanınması işlevini de yapar (Walker, 2000).

Hücre zarı: Hücre duvarının altında hücre zarı bulunur ve yarı geçirgendir. Besin maddelerini içeri alırken, maya metabolizmasının ürettiği ürünleri hücre dışına aktarır.

Stoplazma: Maya stoplazması su içeriği fazla ve asidik (genellikle pH 4.0-5.5 aralığında) akışkan bir sıvıdır. Yapısında düşük ve büyük molekül ağırlıklı bileşikler, çözülmüş proteinler, glikojen ve diğer çözünebilir bileşikler bulunur. Maya stoplazması içerisinde bulunan taneciklerin çeşitli işlevleri vardır. Bunlar;

Ribozom: Protein ve ribonükleik asitlerden oluşan ribozomların görevi protein sentezidir.

Mitokondri: Çubuk şeklindeki bu organel hücrenin solunum organıdır. Lipoprotein ve ribonükleik asitten oluşur. Hücrenin aktivitesi için gerekli enerjiyi depo ederler. Enzim sentezleri ve yedek besin maddelerinin yapımında görev alır.

Golgi aygıtı: Çift zarlı olan bu aygıt lipid, protein ve ribonükleik asit yapıdan oluşmaktadır. Hücrenin diğer organellerinden gelen atıklar bu aygıtta toplanarak atılmak üzere buradan vakollere verilir.

Endoplazmik retikulum: Hücre zarından başlayarak stoplazma içerisinde çekirdeğe kadar uzanan çift katlı zardan oluşmuş bir ağ örgüsüdür. Plazma iletti yoludur.

Lizozom: Mitokondride sentez edilen bazı enzimler lizozomlarda depo edilir.

Sentrozom: Çekirdeğe yakın bulunan sentrozom çekirdek bölünmesinde rol oynar.

Vakol (boşluk): İnce bir zarla çevrili olan bu boşlukların içerisinde düşük molekül ağırlıklı maddeleri içeren sıvı bulunur (Walker, 2000).

Çekirdek: Stoplazma içerisinde bir zarla çevrili çekirdek bulunur. DNA'dan oluşan kromozomları ve çeşitli proteinleri içeren çekirdek, kalıtım özelliklerini barındırır. Çekirdek içerisinde ayrıca RNA'ca zengin küresel çekirdekcik bulunur.

İnsanlık tarihinde ilk kullanılan mikroorganizmalar mayalardır. Günümüze kadar yaklaşık 700 çeşit maya kültürü belirlenmiş olmakla beraber yeni maya kültürlerinin tanımlanmasına da halen devam edilmektedir. Mayalar binlerce yıldır insanlar tarafından değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Mayaların ilk kullanımının Babil'liler, Sümer'ler ve Mısır'lular tarafından bira ve şarap üretiminde ve hamurun mayalanmasında olduğu sanılmaktadır. Modern çağda ise mayalar geleneksel gıda endüstrisinde (ekmek mayası üretimi, çeşitli enzimler, pigmentler, gıda

asitlendiricilerin elde edilmesi) kullanımlarının yanısıra, birçok fermantasyon prosesinde (bira, etanol) de kullanılmaktadır. Mayaların gelecekte yenilenebilir enerji kaynaklarında, çevresel biyoteknolojide ve insan sağlığını ilgilendiren pek çok biyolojik gelişmede daha geniş uygulama alanı bulacağı beklenmektedir. Enerji üretimi açısından bakıldığında mayaların metabolik olarak etanol ürettikleri bilinmektedir. Bu üretimi yenilenebilir karbonhidratlar üzerinden gerçekleştirdiği göz önüne alındığında bunun büyük bir avantaj sağlayacağı görülmektedir. Mayaların çevresel biyoteknolojide de gittikçe artan önemde kullanılacağı tahmin edilmektedir. Atıksulardan biyosorpsiyon ve biyobirikim yöntemleriyle ağır metal iyonlarının ve boyarmaddelerin giderimi ve geri kazanımı çalışmalarında çeşitli türdeki mayalar başarıyla kullanılmaktadır. Mayaların zorlu ortam koşullarında, örneğin, asidik ve toksik etkiye sahip ağır metal iyonu içeren ortamlarda üreyebilme dayanıklılığı göstermesi ve bu tür maddeleri hücre içerisine alabilme özelliğinin bulunması (biyobirikim), mayaların diğer mikroorganizmalara göre üstünlüğünü göstermektedir. İlaç endüstrisinde aşı üretimi ve özellikle insan tedavi amaçlı proteinlerin, hormonların ve kan faktörlerinin üretiminde de mayalar kullanılmaktadır. Tek hücre proteinlerinin üretilmesi ve bunların farklı fonksiyonel gruplar içermesi önemli uygulamalardan sayılabilir.

Bazı maya türlerinin özel kullanım alanları ise aşağıda verilmiştir;

Arxula adenivorans: Nitrat ve aminlerin dönüştürülmesinde önemli rol oynar. Optimum üreme sıcaklığı 45°C'nin üzerindedir.

Candida türleri: Çok geniş kullanım alanına sahip olan bu maya, 6-aminopenisillanik asit, B6 vitamini, NAD, FAD, metil ketonlar, sitrik asit, riboflavin, triptofan ve biyokütle, ve enzim üretiminde kullanılır.

Hansenula polymorpha: Metil tüketen bir mayadır. Gen aktarımı için önemlidir.

Kluyveromyces marxianus: Laktöz ve polifruktozan fermantasyonunda kullanılır.

Pachysolen tannophilus: Bazı hidroliz ürünlerinde bulunan pentoz şekerlerinin fermantasyonunda kullanılır.

Phaffia rhodozyma: Gıda boyalarının eldesinde kullanılır.

Saccharomyces türleri: Bira, ekmek mayası, vitaminler, şarap, şampanya, sirke, alkol, gliserol, invertaz, hayvan yemi, ilaç ham maddesi, biyofarmosetiklerin üretiminde ve nişasta fermantasyonunda kullanılır.

Schizosaccharomyces pombe: Şaraptan asit gideriminde, etanol üretiminde ve geleneksel Afrika alkollü içeceklerinin fermantasyonunda kullanılır (Walker, 2000).

2.2.5.1. *Candida utilis*

Geniş kullanım alanına sahip olan bu maya, 6-aminopenisillanik asit, B6 vitamini, NAD, FAD, metil ketonlar, sitrik asit, riboflavin, triptofan ve biyokütle üretiminde kullanılır. Optimum çoğalma sıcaklığı 0-50°C olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında ürer. En iyi üreme 25-30°C'de olmaktadır. Hücre çapı 1-10 µm aralığında değişmektedir. Üremesi tomurcuklanarak olmaktadır.

Tomurcuklanma ile bir hücreden bir veya daha çok çıkıntı meydana gelir ve bunlar yeni hücreler halinde gelişir. Gelişen bu hücreler daha sonra ana hücreden ayrılır. Tomurcuklanarak çoğalan bu maya hücresi yaklaşık 50-55 defa tomurcuklanabilmektedir. Maya özütü, glukoz, sülfat ve potasyum gibi besinleri içeren ortamlarda özellikle pH 4.0-4.5 aralığında hızlı büyürler. Besin ortamı çok asidik olmamak kaydıyla diğer pH'larda da ürerler.

2.2.5.2. Mikroorganizmalar ve üretim yöntemleri

Yapılan çalışmalarda Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünden temin edilen *Candida utilis* mayası kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların üretiminde karbon kaynağı olarak bir şeker endüstrisi atığı olan melas kullanılmış ve Afyon şeker fabrikasından temin edilmiştir. Şekerin kristallenme yolu ile elde edilmesiyle son ana şurup olarak geri kalan melas önemli miktarda şeker (sakkaroz) içerir. Ayrıca melas şeker dışı maddeler bakımından da zengindir. Melas yaklaşık %50 sakkaroz, %30 şeker dışı maddeler ve %20 sudan oluşmaktadır. Şeker dışı maddelerin yaklaşık %10'unu ise kül teşkil etmektedir. Kül, melasın yanmasından sonra geri kalan anorganik maddedir. Geri kalan %20 ise organik şeker dışı maddelerdir.

Mayanın üretimi için hazırlanan sıvı besin ortamları 10 g/L melas sakkarozu, 1 g/L amonyum sülfat ve 1 g/L potasyum dihidrojen fosfat içermektedir. Üreme çalışmaları için hazırlanan besin ortamları otoklav'da 15 dk süresince 121°C ve 2 atmosfer basınçta sterillemiştir.

2.3. Deneyler

Deneyisel çalışmalar 100.0 mL çalışma hacmine sahip 250.0 mL'lik steril erlenlerde sabit sıcaklık ve 150 rpm karıştırma hızında çalışan çalkalayıcıda kesikli olarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler aktifleştiriciler, metal iyonu içeren ve içermeyen besin ortamlarına alıştırılarak üstel üreme evresine gelmiş mikroorganizma çözeltilisinden 1.0 mL aşı alınarak deney ortamına eklenmesiyle başlatılmıştır. Bütün deneylerde sıcaklık 25°C'de sabit tutulmuştur.

2.3.1. Analiz yöntemleri

Belirli zaman aralıklarında deney ortamından steril olarak alınan örnekler santrifüjlenerek, sıvı kısım lipaz, metal iyonu ve sakkaroz derişiminin tayininde, dipte çökelen kısım ise mikroorganizma derişiminin bulunmasında kullanılmıştır.

2.3.2 Lipaz aktivitesi tayini

Lipaz aktivitesinin saptanması için de spektrofotometrik yöntem kullanılacaktır. Bir lipaz birimi 30°C ve pH 6.0' da dakikada 1 µmol yağ asitini serbest bırakmak için ihtiyaç duyulan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

2.3.3. Mikroorganizma derişimi tayini

Alınan örnekteki yaş maya derişimi g/L cinsinden spektrofotometrik olarak 360 nm'de absorbans okunarak tayin edilmiştir. Daha sonra yaş ağırlık, yaş ağırlık-kuru ağırlık mikroorganizma çalışma doğrusundan yararlanarak kuru mikroorganizma derişimine geçilmiştir.

2.3.4. Sakkaroz derişimi tayini

Örnekteki sakkaroz derişimi g/L cinsinden, sakkarozun dinitrosalisilikasit ile verdiği turuncu-koyu kırmızı renkli kompleks yardımıyla spektrofotometrik olarak 575 nm'de absorbans okunarak tayin edilmiştir (Forouchi and Gunn, 1983).

2.3.5. Bakır(II)/nikel(II) iyon derişiminin tayini

Biyosorpsiyon ve biyobirikim deneylerinde tekli bakır(II) veya nikel(II) içeren deney ortamından alınan örnekteki serbest bakır(II) veya nikel(II) derişimi, bakır(II) iyonlarının veya nikel(II) iyonlarının sodyum dietil ditiyokarbamatla yaptığı sarı-kahverengi renkli kompleks yardımıyla spektrofotometrik olarak 460 nm'de absorbans okunarak tayin edilmiştir (Snell and Snell, 1959; Sandell, 1961).

2.4. Mikroorganizma özgül üreme hızı

Kesikli sistemde üstel üreme evresinde mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi özgül üreme hızı ile ifade edilir ve Eşitlik 2.1 ile verilir (Pekin, 1983; Kargı, 1993).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

$t=0$ anında $X=X_0$, $t=t$ anında $X=X$ sınır koşullarında Eşitlik 2.2'nin integrasyonu ile Eşitlik 2.13 elde edilir.

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (2.2)$$

Bu eşitliklerde;

- μ : Özgül üreme hızı (sa^{-1}),
 X : Kuru mikroorganizma derişimi (g /L),
 t : Zaman (sa)'dır.

2.4.1. Monod eşitliği, metal iyonu içermeyen ortamda büyüme kinetiğinin modellenmesi

Kesikli sistemde substrat inhibisyonunun gözlenmediği durumda, özgül üreme hızı ile mikroorganizmanın üreme hızını kontrol eden besin maddesi (substrat) arasındaki ilişki Monod eşitliği ile verilir (Shuler and Kargı, 2002).

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (2.3)$$

Burada $S \gg K_s$ olduğu zaman;

- μ : Özgül üreme hızı (sa^{-1}),
 μ_m : Maksimum özgül üreme hızı (sa^{-1}),
 K_s : Doygunluk sabiti (g/L)'dir.

Eşitlik 2.14'ün doğrusallaştırılmış şekli Eşitlik 2.15 ile gösterilebilir:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} \quad (2.4)$$

$1/\mu$ 'ye karşı $1/S$ grafiğinin, x eksenini kesim noktasından μ_m , doğrunun eğiminden ise K_s bulunur. Düşük K_s değeri mikroorganizmanın düşük substrat derişimlerinde de hızlı ürediğini gösterir.

3. BULGULAR

3.1. Enzim Deneyleri

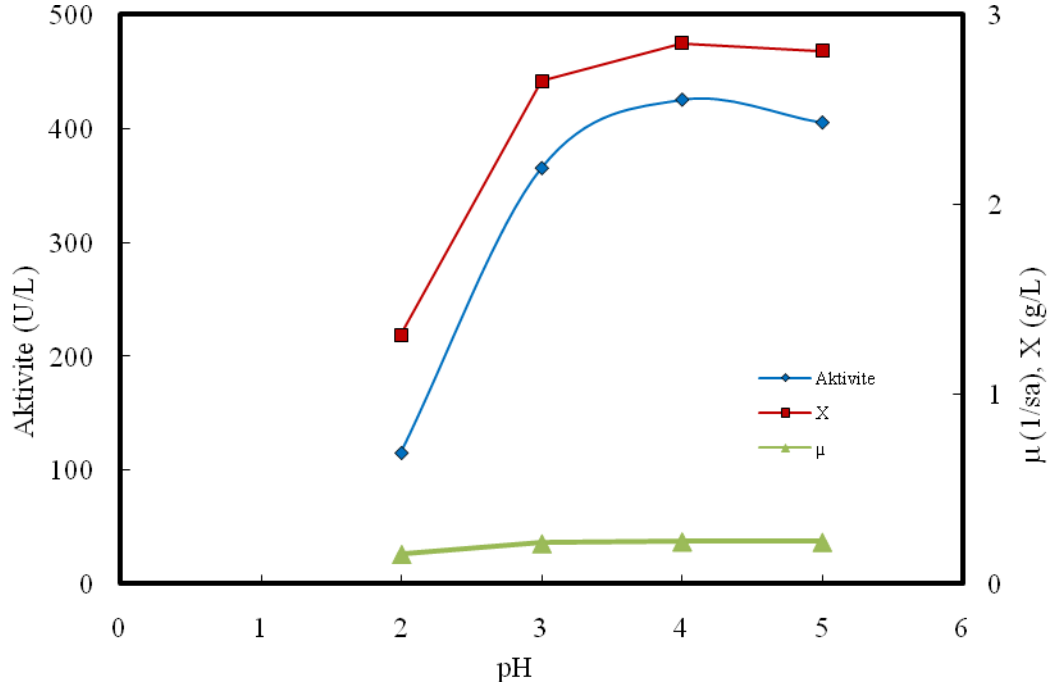
Candida utilis mayasıyla enzim üretim çalışmalarında başlangıç pH'ı, başlangıç sakkaroz derişiminin etkisi, ortama katılan aktivite artırıcı yağların ve bu yağların farklı oranlarının etkisi ve karışımdaki metal iyonunun türü, mikroorganizma üremesi ve lipaz enzimi üretim hız ve verimini etkileyen en önemli parametreler olarak ele alınmıştır. Bu amaçla aktivite artırıcı olarak soya, mısır, zeytinyağı, ayçiçeğı ve kanola yağları, aktivite azaltıcı olarak da bakır(II) veya nikel(II) tekli metal iyonu karışımları seçilerek mikroorganizma üremesi ve enzim üretimine etkileri incelenmiştir.

DeneySEL çalışmaların ilk kısmında normal besin ortamında mayanın enzim üretme yeteneğı incelenmiş ve mikroorganizmanın optimum üreme pH'ı belirlenmiştir. Mikroorganizmanın maksimum enzim aktivitesini de maksimum ürettiğı pH'da gösterdiği bulunmuş ve enzim deneyleri pH 4.0 değerinde gerçekleştirilmiştir.

Karıışımdaki aktivatör olarak farklı yüzdelerde katılan yağların ve inhibitör metal iyonlarının etkileri karşılaştırmalı incelenmiştir.

3.1.1. Başlangıç pH'ının etkisi

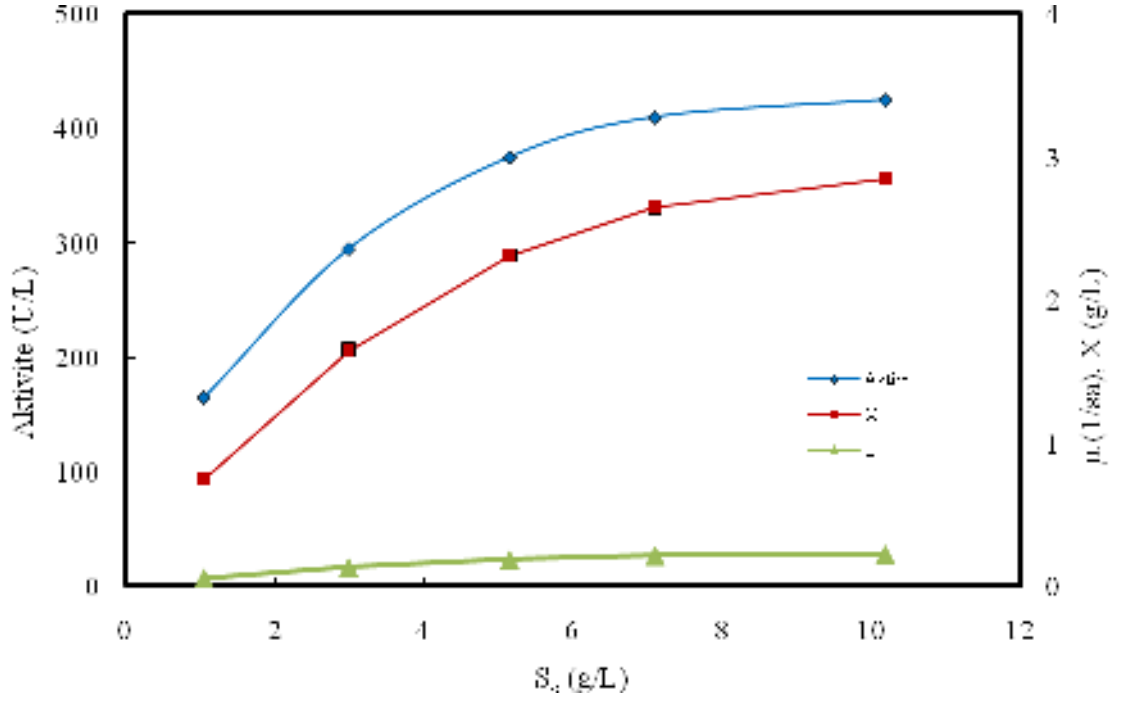
Ortam pH'ı mikroorganizma üremesi ve mikroorganizmanın enzim aktivitesi göstermesi için en önemli parametrelerden biridir. Şekil 3.1'den başlangıç pH'ındaki artışın enzim aktivitesi ve mikroorganizma üremesini artırdığı ve pH 4.0 değerinde maksimum üreme ve enzim aktivitesi elde edildiğı görülmektedir (Şekil 3.1) .



Şekil 3.1. *Candida utilis* için başlangıç pH'ının enzim aktivitesi ve üreyen mikroorganizma derişimine etkisi (S_0 : 10 g/L; T: 25°C; KH: 150 rpm)

3.1.2. Başlangıç sakkaroz derişiminin etkisi

Deneysel çalışmalar boyunca melas sakkarozu ana karbon kaynağı olarak kullanılmış, başlangıç sakkaroz derişiminin etkisi 1-10 g/L derişim aralığında incelendiğinde başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla üreyen mikroorganizma derişiminin ve lipaz enzimi aktivitesinin arttığı görülmüştür (Şekil 3.2).



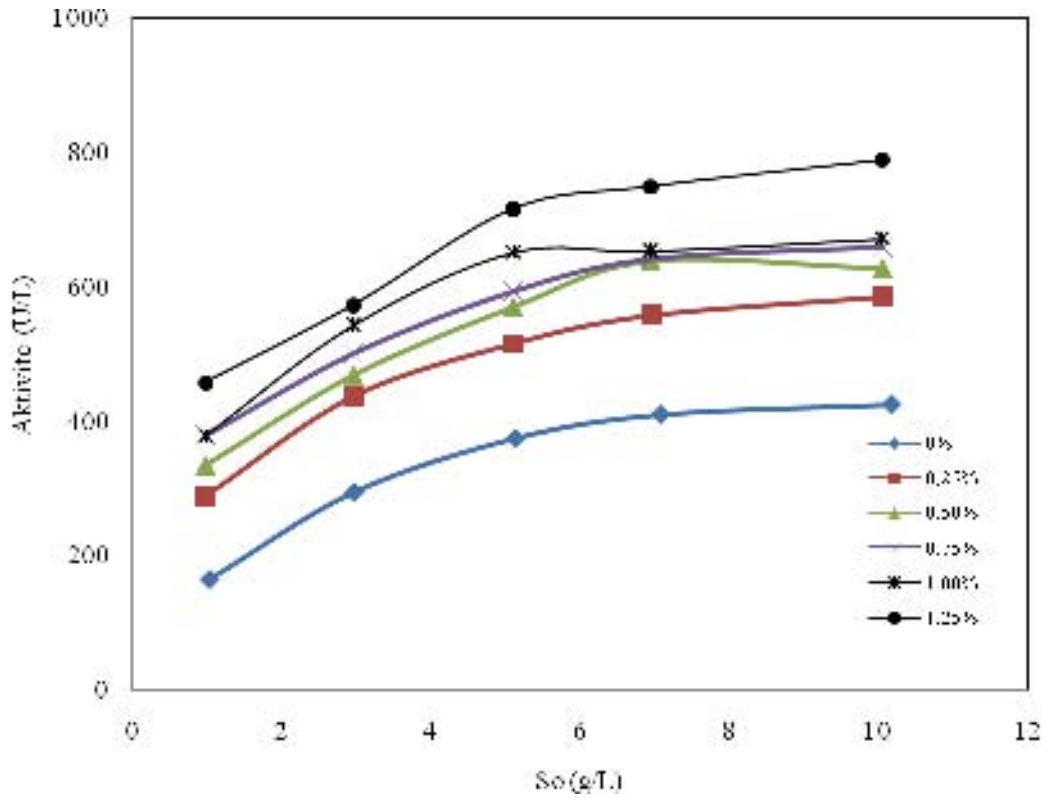
Şekil 3.2. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişiminin enzim aktivitesi ve üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkisi (T: 25°C; KH: 150 rpm)

3.1.3. Aktivatör etkisi

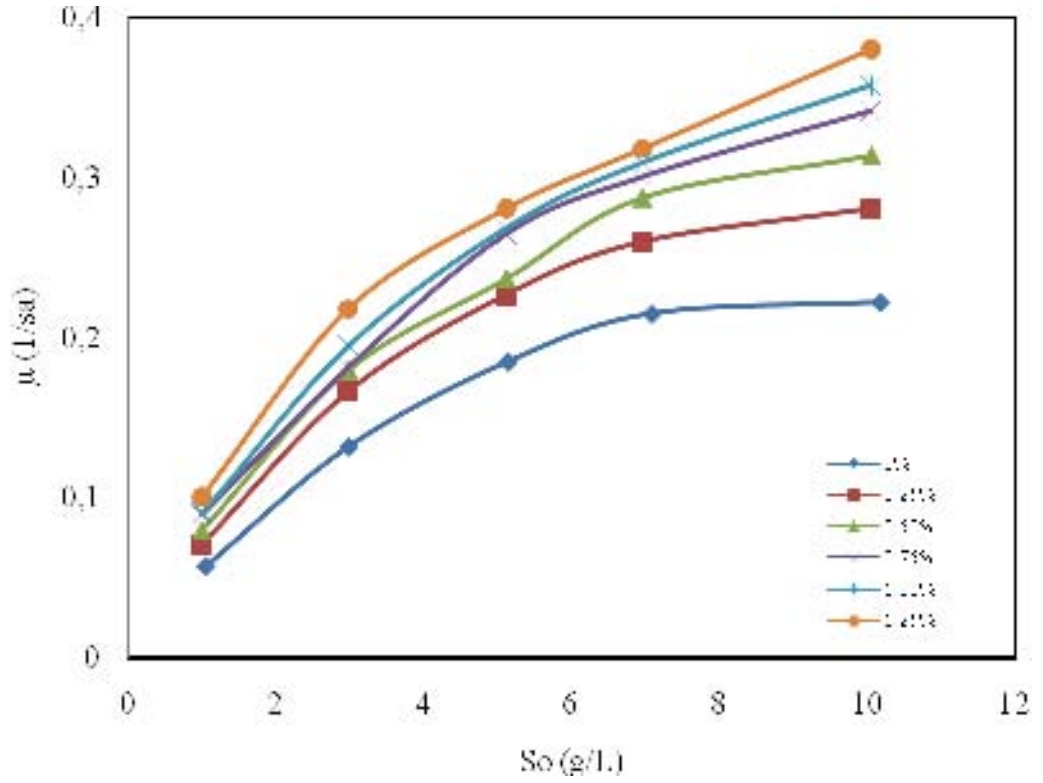
Besin ortamına enzim aktivitesini artırıcı olarak %0.25-1.25 oranında soya, mısır , zeytin, ayçiçeği ve kanola yağları eklenmiş ve enzim aktivitesini artırıcı etkileri incelenmiştir. Bütün yağlarda ortama eklenen yağ miktarı artıkça enzim aktivitesinin, üreyen mikroorganizma özgül hızı ve mikroorganizma miktarının arttığı görülmüştür. Maksimum aktivite artışı ortama %10 soya yağı eklendiğinde bulunmuştur. Deneysel sonuçlar mikroorganizma üremesi ve lipaz enzimi aktivitesinin artma ve azalma yönünde beraber değiştiğini de göstermektedir. Aktivatör olarak yağların kullanıldığı besin ortamlarında başlangıç sakkaroz derişimi de 1-10 g/L aralığında değiştirilerek sonuçlar birbirleriyle karşılaştırmalı incelenmiştir.

3.1.3.1. Soya yağı etkisi

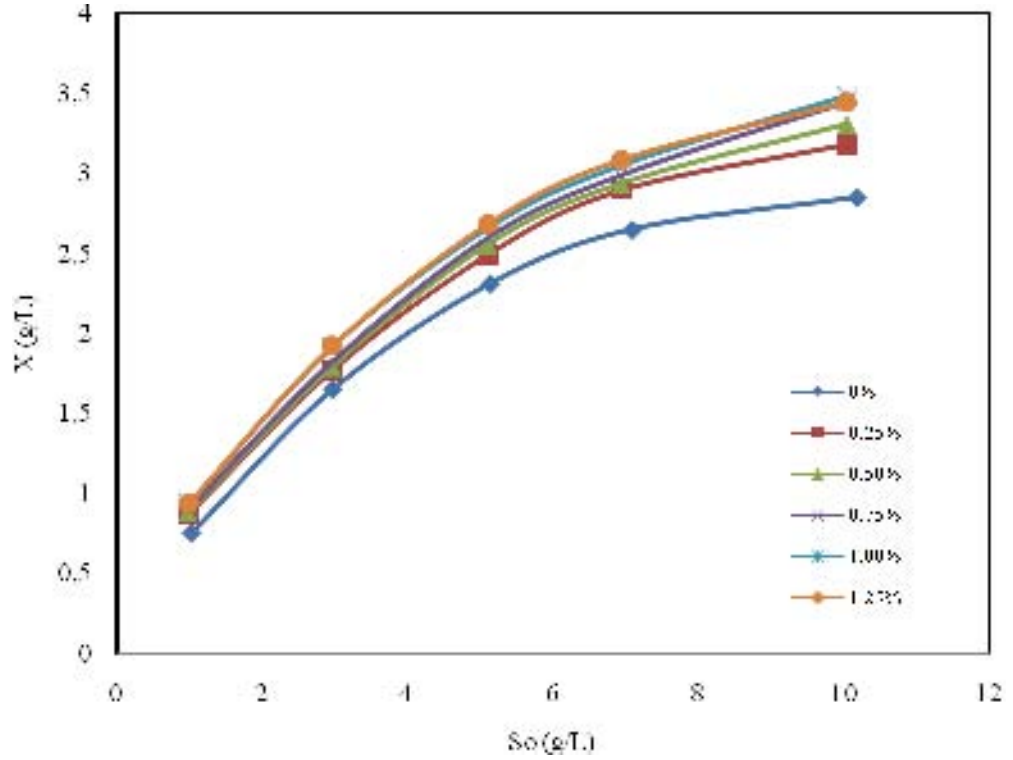
Ortama %0.25-1.25 soya yağı eklenirken başlangıç sakkaroz derişimi de 1-10 g/L aralığında değiştirilmiş, aktivatör yağ ve sakkarozun lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgöl üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Değişen başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizmanın gösterdiği lipaz aktivitesi Şekil 3.3., mikroorganizma özgöl üreme hızı Şekil 3.4. ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi ise Şekil 3.5. de sunulmuştur. Şekillerden ortama eklenen soya yağı miktarı ve başlangıç sakkaroz derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesini, mikroorganizma özgöl üreme hızını ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarını önemli ölçüde artırdığı görölmektedir. Enzim aktivitesindeki artışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi arttıka üreyen mikroorganizmaların daha fazla enzim ürettiği anlaşılmaktadır.



Şekil 3.3. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki soya yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

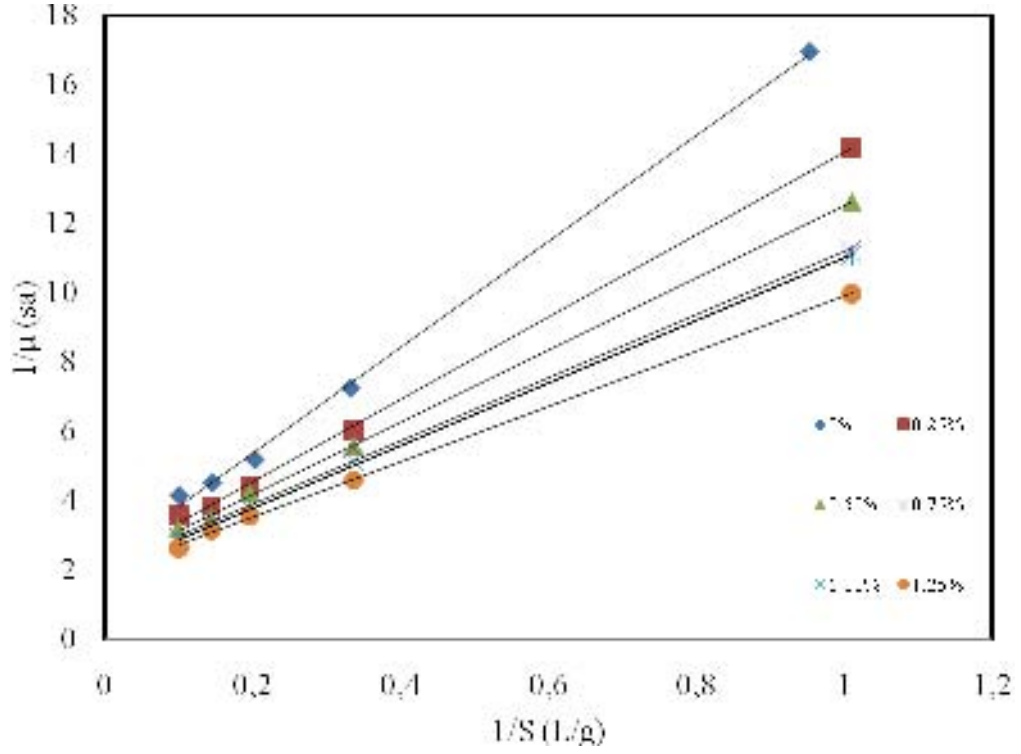


Şekil 3.4. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı miktarlardaki soya yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)



Şekil 3.5. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki soya yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

Monod eşitliğine göre çizilen $1/\mu-1/S$ (Şekil 3.6.) izotermelerden bulunan kinetik sabitler olan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri Çizelge 3.1.'de sunulmuştur.



Şekil 3.6. *Candida utilis* için soya yağı içeren ortamda $1/\mu-1/S$ grafiği (pH: 4,0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

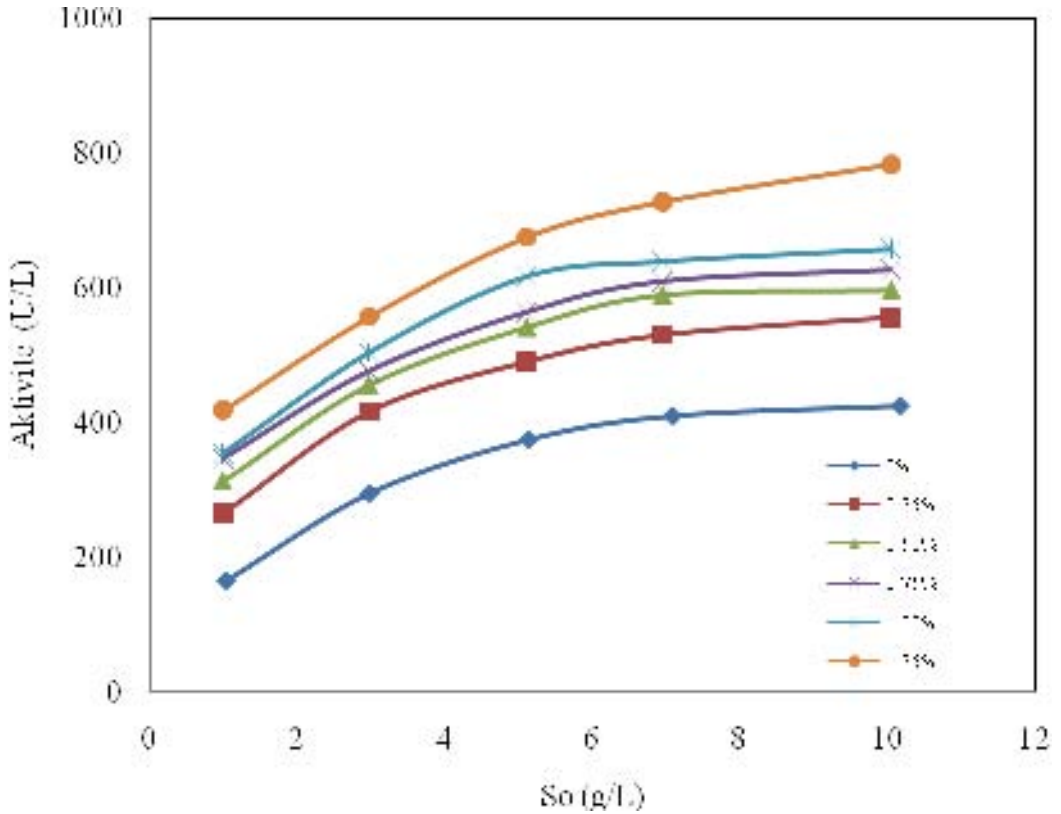
Çizelge 3.1. Farklı oranlarda soya yağı ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri

% Soya Yağı Miktarı	μ_{\max} (1/sa)	K_s (g/L)
0.00	0,417223	6,282961
0.25	0,460236	5,462537
0.50	0,4761	4,959055
0.75	0,476849	4,343522
1.00	0,51096	4,633693
1.25	0,516716	4,121687

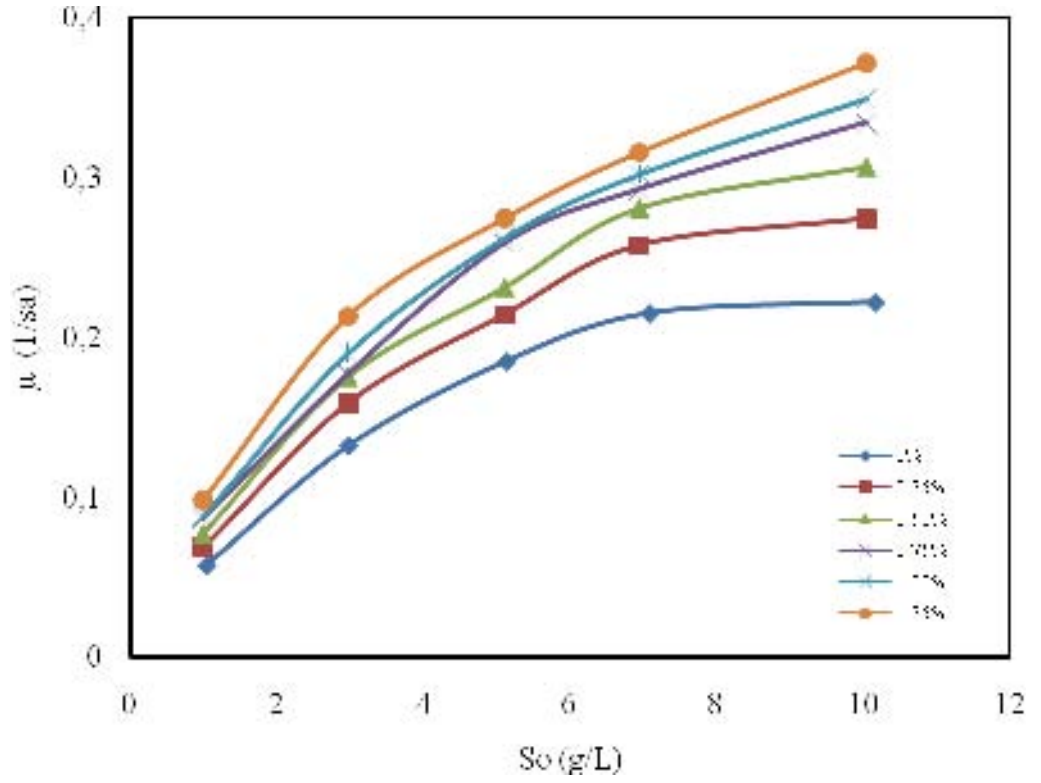
Çizelge 3.1.'den başlangıç sakkaroz ve eklenen soya yağı miktarındaki artışla mikroorganizma maksimum özgül üreme hızının arttığı, doygunluk sabiti değerlerinin ise azaldığı görülmektedir.

3.1.3.1. Mısır yağı etkisi

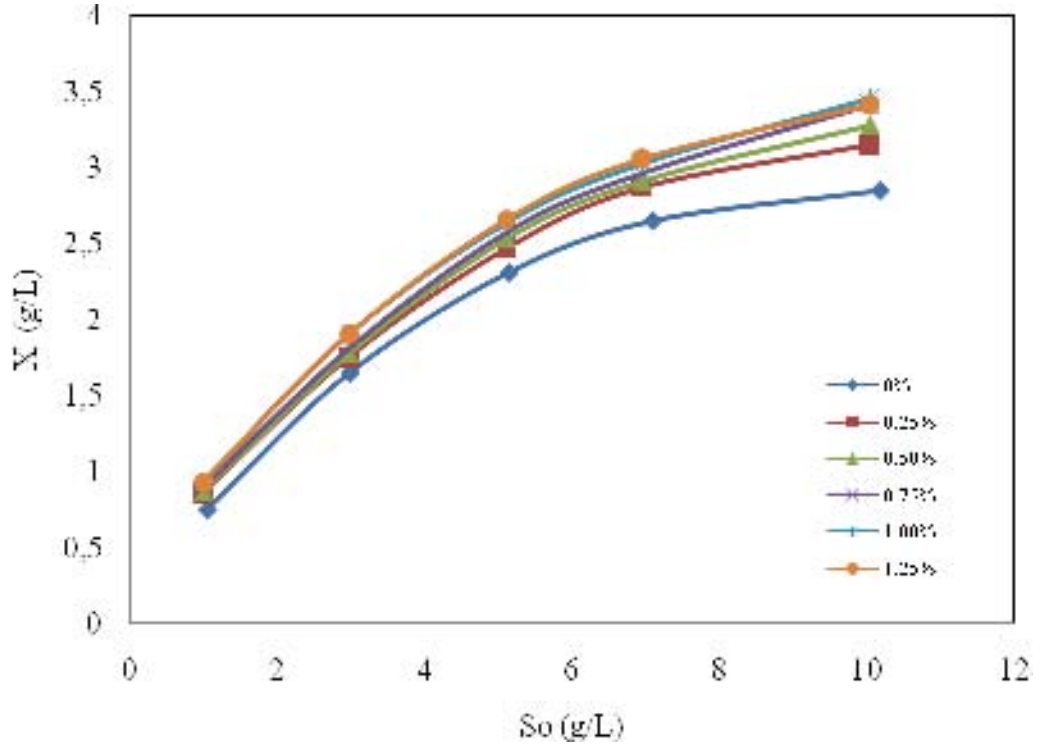
Ortama %0.25-1.25 mısır yağı eklenirken başlangıç sakkaroz derişimi de 1-10 g/L aralığında değiştirilmiş, aktivatör yağ ve sakkarozun lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgöl üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Değişen başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizmanın gösterdiği lipaz aktivitesi Şekil 3.7., mikroorganizma özgöl üreme hızı Şekil 3.8. ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi ise Şekil 3.9.'da sunulmuştur. Şekillerden ortama eklenen mısır yağı miktarı ve başlangıç sakkaroz derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesini, mikroorganizma özgöl üreme hızını ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarını önemli ölçüde artırdığı görölmektedir. Enzim aktivitesindeki artışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi arttıkça üreyen mikroorganizmaların daha fazla enzim ürettiği anlaşılmaktadır.



Şekil 3.7. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki mısır yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

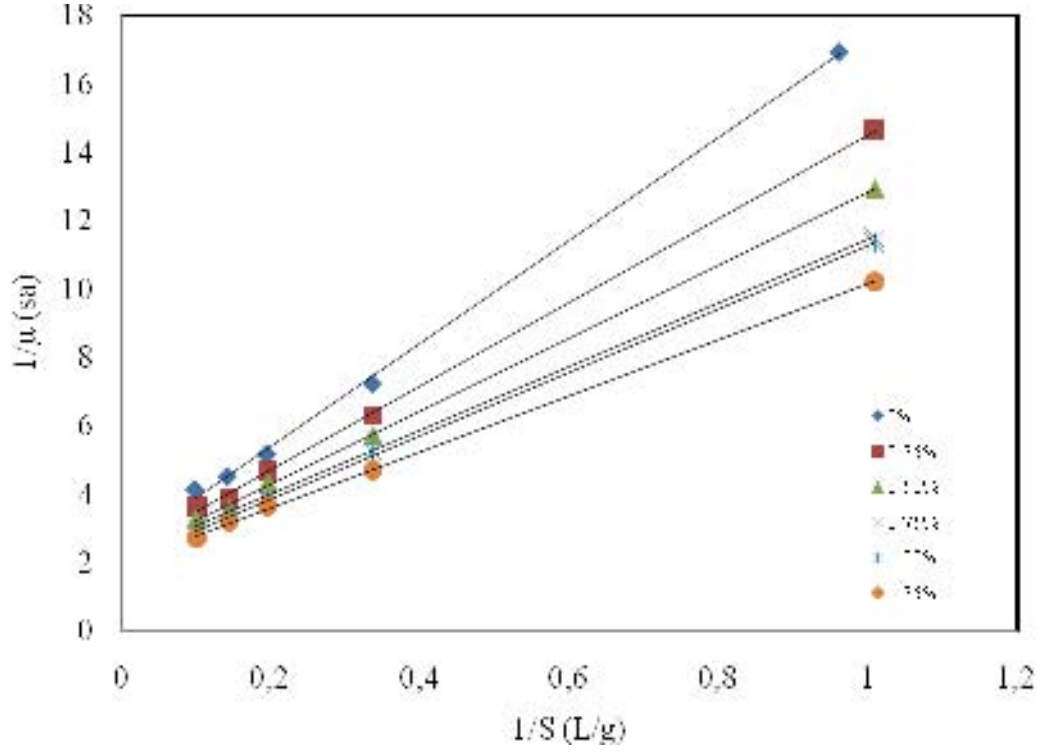


Şekil 3.8. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı miktarlardaki mısır yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)



Şekil 3.9. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki mısır yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

Monod eşitliğine göre çizilen $1/\mu-1/S$ (Şekil 3.10.) izotermlerden bulunan kinetik sabitler olan maksimum özgül üreme hızı ve doyumluk sabiti değerleri Çizelge 3.2.'de sunulmuştur.



Şekil 3.10. *Candida utilis* için mısır yağı içeren ortamda $1/\mu-1/S$ grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

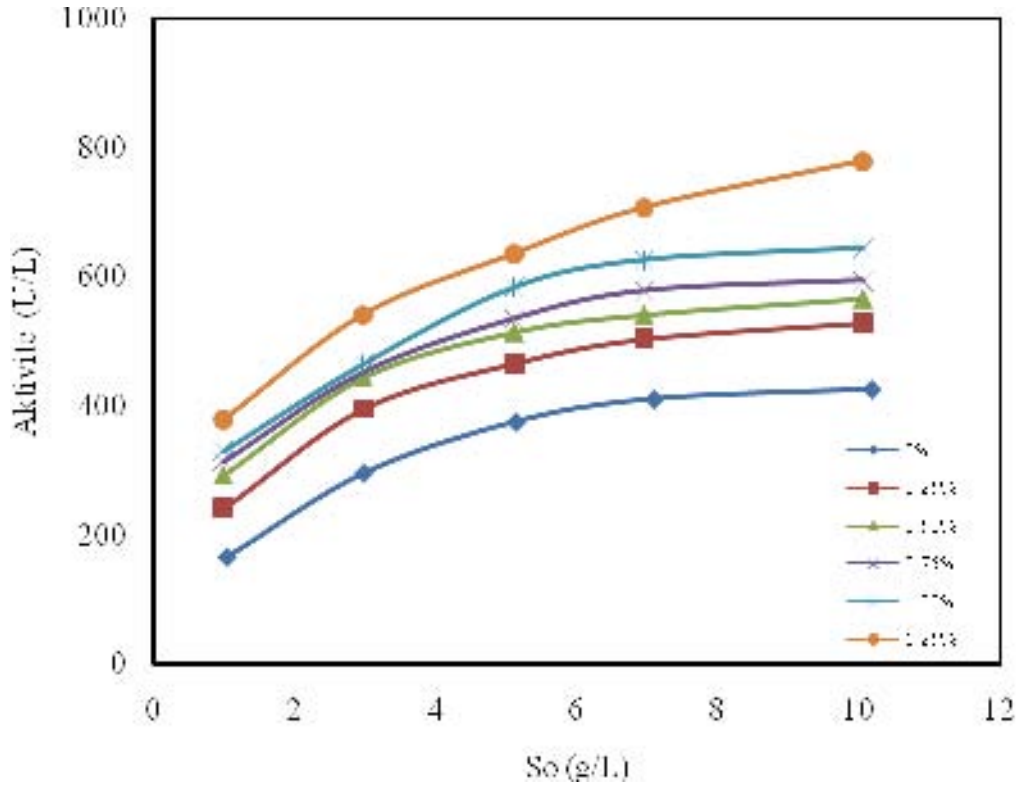
Çizelge 3.2. Farklı oranlarda mısır yağı ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doyumluk sabiti değerleri

% Mısır Yağı Miktarı	μ_{max} (1/sa)	K_s (g/L)
0.00	0,417223	6,282961
0.25	0,443066	5,424457
0.50	0,465268	4,959289
0.75	0,464922	4,330745
1.00	0,499351	4,633726
1.25	0,508932	4,162756

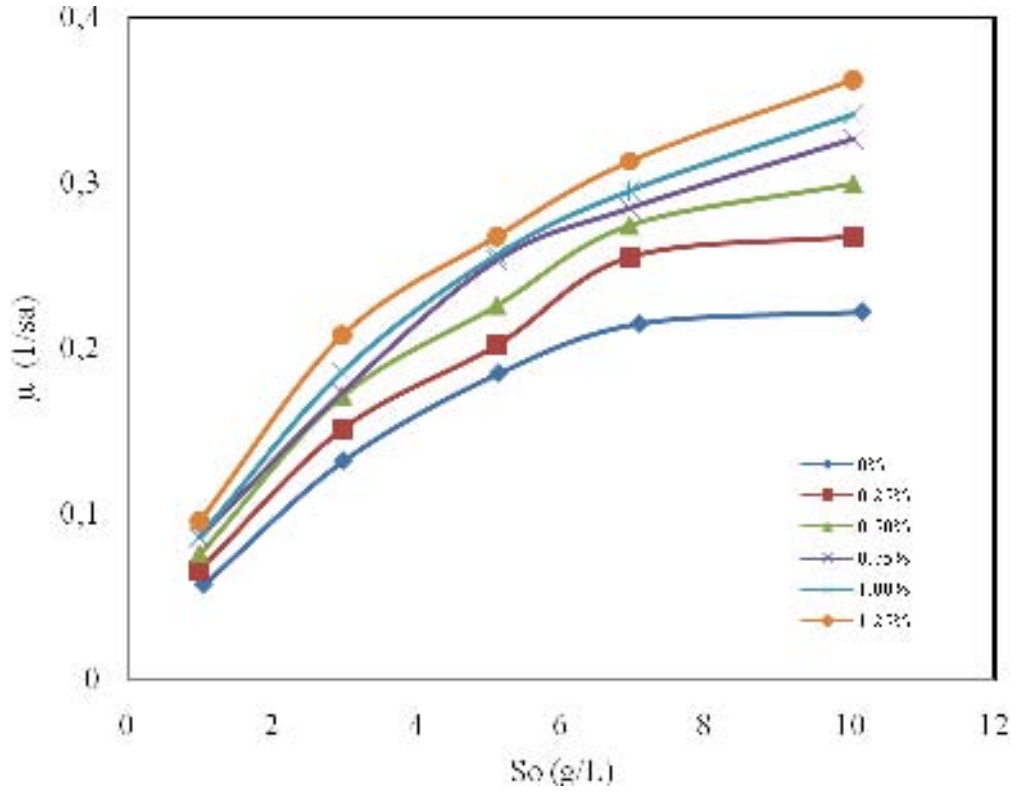
Çizelge 3.2.'den başlangıç sakkaroz ve eklenen mısır yağı miktarındaki artışla mikroorganizma maksimum özgül üreme hızının arttığı, doyumluk sabiti değerlerinin ise azaldığı görülmektedir.

3.1.3.1. Zeytin yağı etkisi

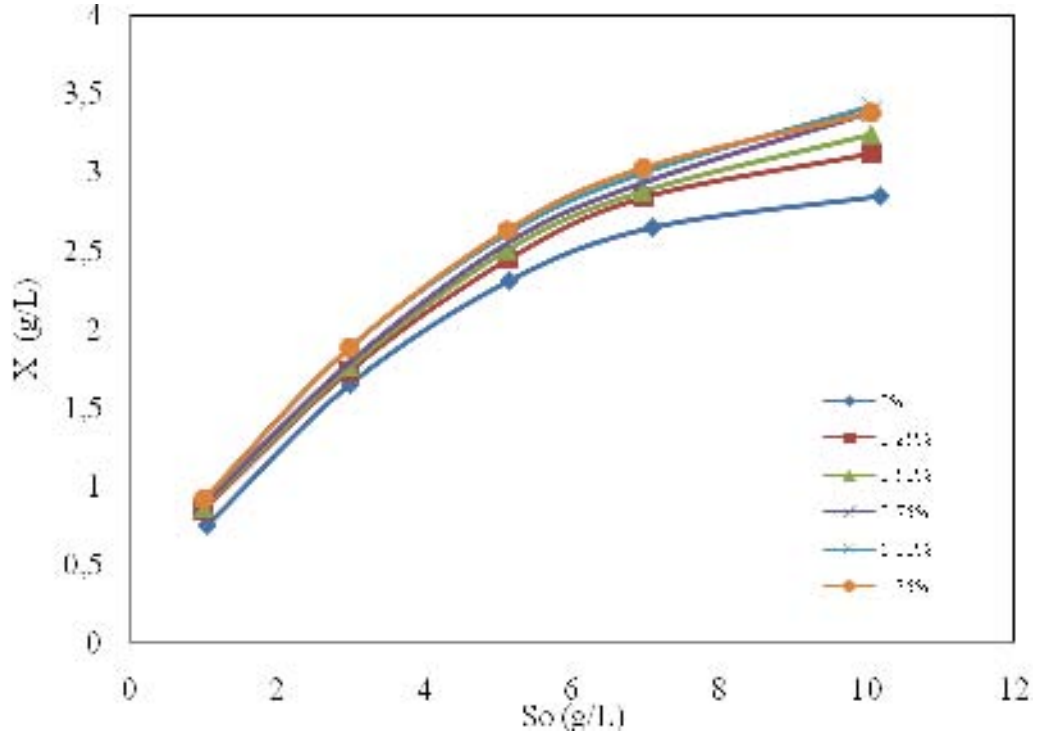
Ortama %0.25-1.25 zeytin yağı eklenirken başlangıç sakkaroz derişimi de 1-10 g/L aralığında değiştirilmiş, aktivatör yağ ve sakkarozun lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgöl üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Değişen başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizmanın gösterdiği lipaz aktivitesi Şekil 3.11., mikroorganizma özgöl üreme hızı Şekil 3.12. ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi ise Şekil 3.13. de sunulmuştur. Şekillerden ortama eklenen zeytin yağı miktarı ve başlangıç sakkaroz derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesini, mikroorganizma özgöl üreme hızını ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarını önemli ölçüde artırdığı görölmektedir. Enzim aktivitesindeki artışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi arttıka üreyen mikroorganizmaların daha fazla enzim ürettiği anlaşılmaktadır.



Şekil 3.11. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki zeytin yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

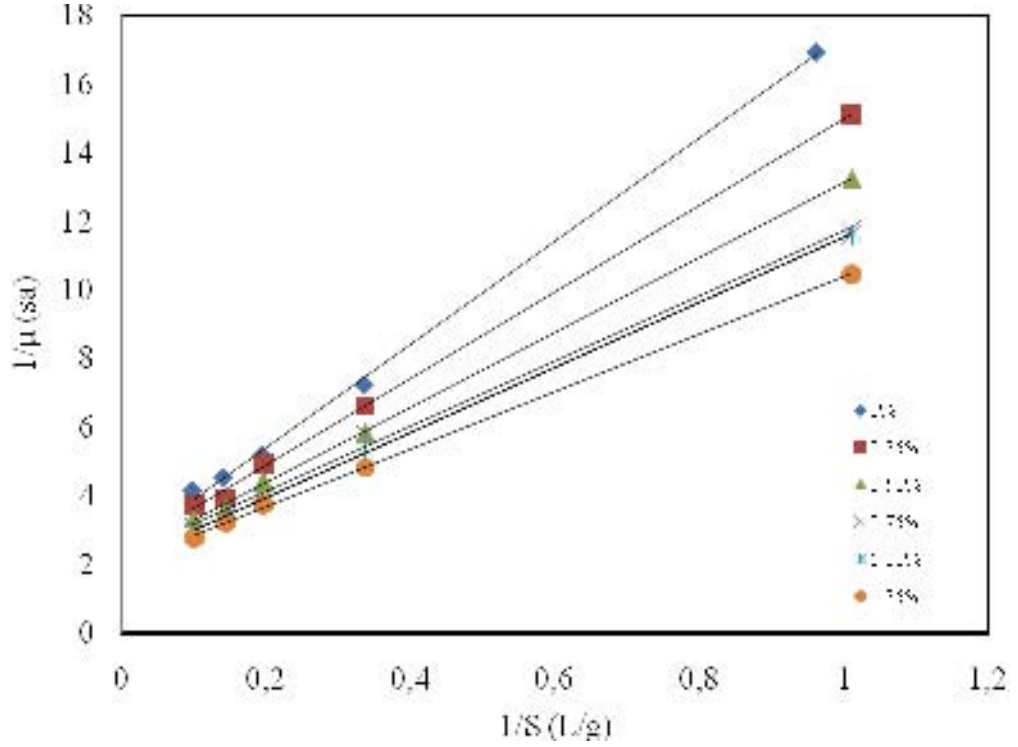


Şekil 3.12. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı miktarlardaki zeytin yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)



Şekil 3.13. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki zeytin yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

Monod eşitliğine göre çizilen $1/\mu-1/S$ (Şekil 3.14.) izotermlerden bulunan kinetik sabitler olan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri Çizelge 3.3.'de sunulmuştur.



Şekil 3.14. *Candida utilis* için zeytin yağı içeren ortamda $1/\mu-1/S$ grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

Çizelge 3.3. Farklı oranlarda zeytin yağı ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri

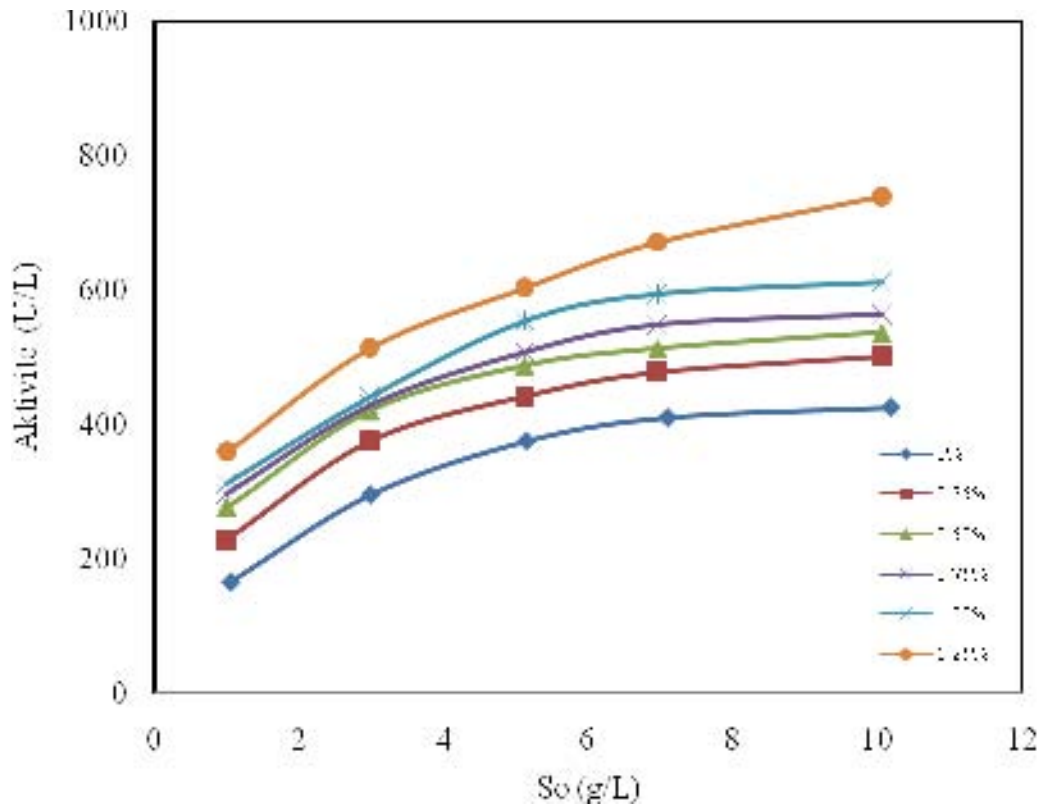
% Zeytin Yağı Miktarı	μ_{max} (1/sa)	K_s (g/L)
0.00	0,417223	6,282961
0.25	0,425152	5,373071
0.50	0,454463	4,959553
0.75	0,453001	4,317418
1.00	0,487757	4,633938
1.25	0,501077	4,205091

Çizelge 3.3.'den başlangıç sakkaroz ve eklenen zeytin yağı miktarındaki artışla mikroorganizma maksimum özgül üreme hızının arttığı, doygunluk sabiti değerlerinin ise azaldığı görülmektedir.

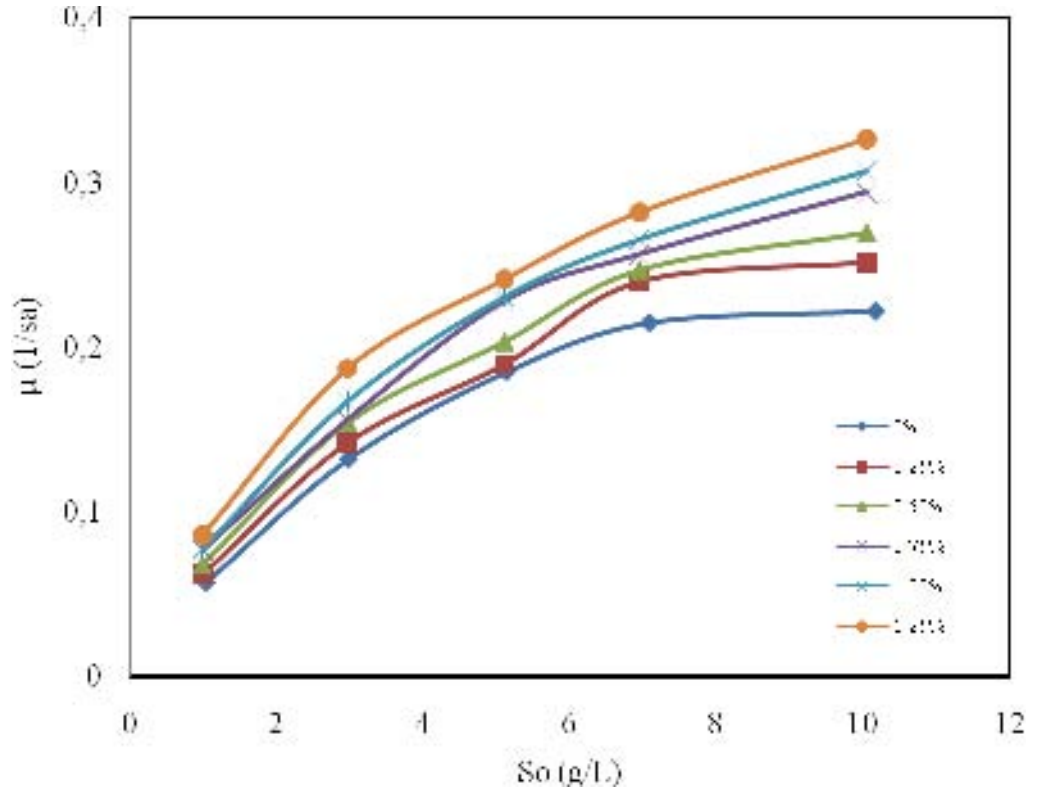
3.1.3.1. Ayçiçeği yağı etkisi

Ortama %0.25-1.25 ayçiçeği yağı eklenirken başlangıç sakkaroz derişimi de 1-10 g/L aralığında değiştirilmiş, aktivatör yağ ve sakkarozun lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme

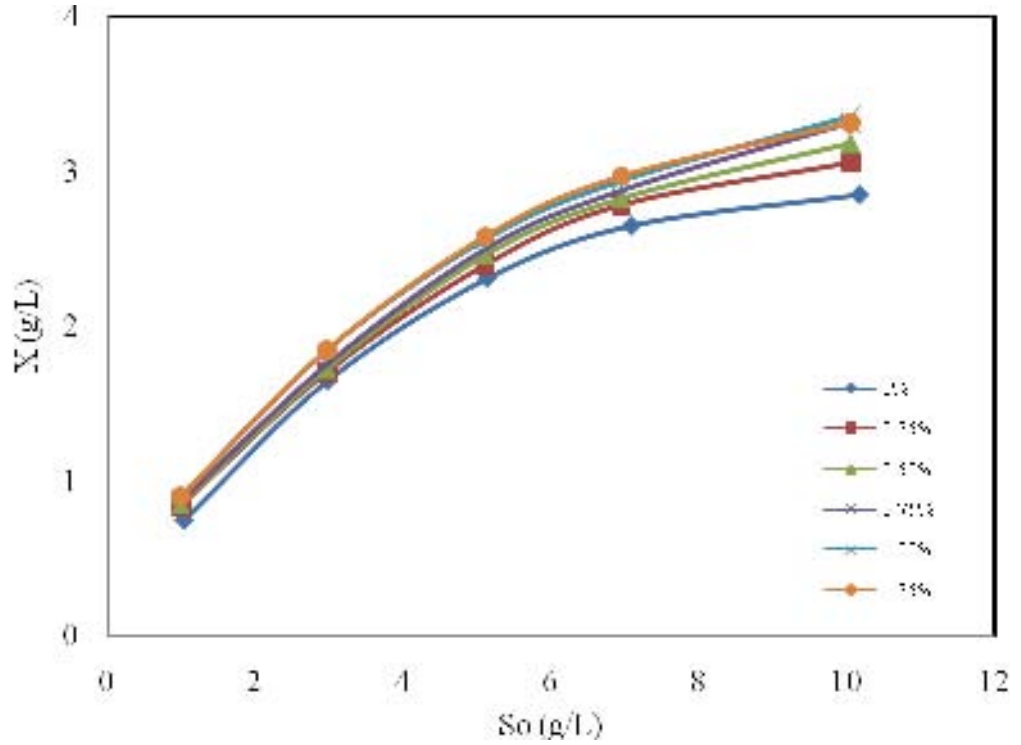
hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Değişen başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizmanın gösterdiği lipaz aktivitesi Şekil 3.15., mikroorganizma özgül üreme hızı Şekil 3.16. ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi ise Şekil 3.17. de sunulmuştur. Şekillerden ortama eklenen ayçiçeği yağı miktarı ve başlangıç sakkaroz derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesini, mikroorganizma özgül üreme hızını ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarını önemli ölçüde artırdığı görülmektedir. Enzim aktivitesindeki artışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi arttıkça üreyen mikroorganizmaların daha fazla enzim ürettiği anlaşılmaktadır.



Şekil 3.15. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki ayçiçeği yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

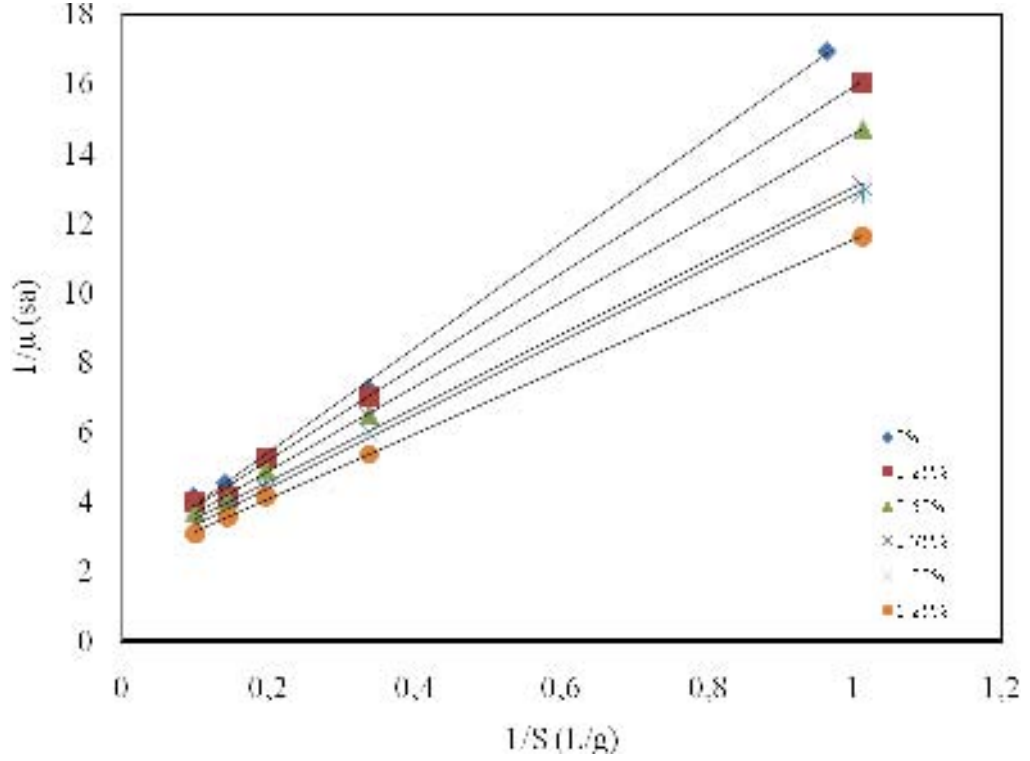


Şekil 3.16. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı miktarlardaki ayçiçeği yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)



Şekil 3.17. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki ayçiçeği yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

Monod eşitliğine göre çizilen $1/\mu-1/S$ (Şekil 3.18.) izotermlerden bulunan kinetik sabitler olan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri Çizelge 3.4.'de sunulmuştur.



Şekil 3.18. *Candida utilis* için ayçiçeği yağı içeren ortamda $1/\mu-1/S$ grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

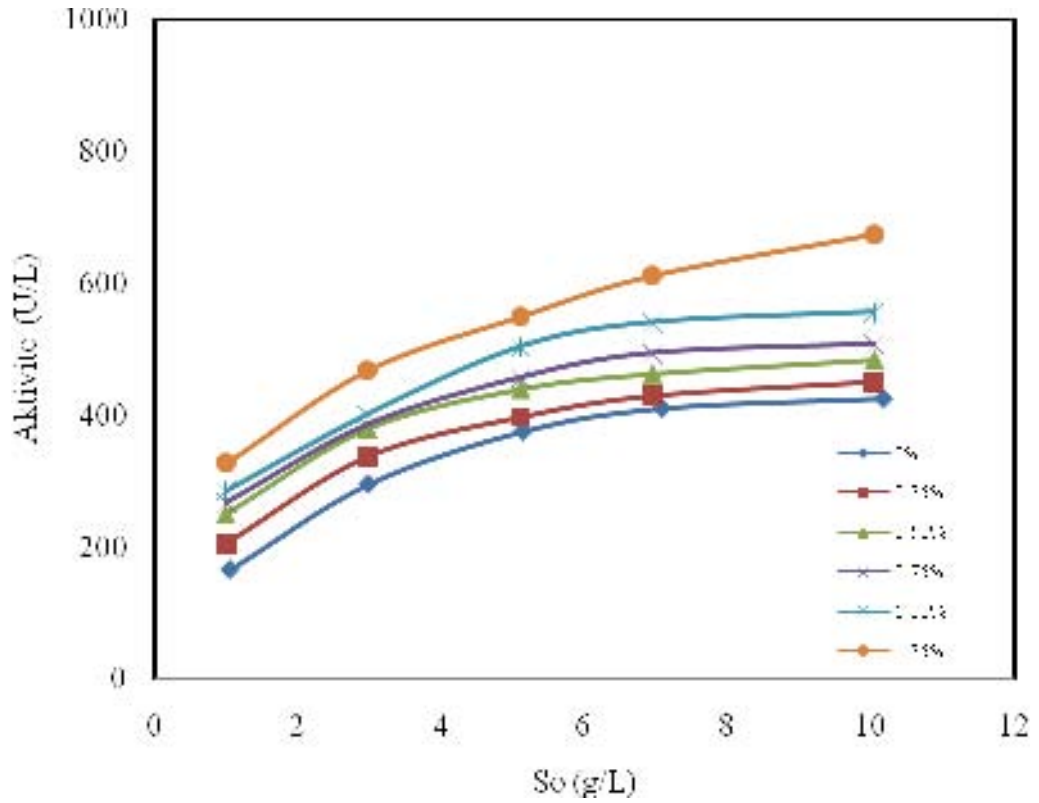
Çizelge 3.4. Farklı oranlarda ayçiçeği yağı ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri

% Ayçiçeği Yağı Miktarı	μ_{max} (1/sa)	K_s (g/L)
0.00	0,417223	6,282961
0.25	0,399632	5,373057
0.50	0,445792	5,405225
0.75	0,444365	4,70583
1.00	0,478446	4,633702
1.25	0,474924	4,022606

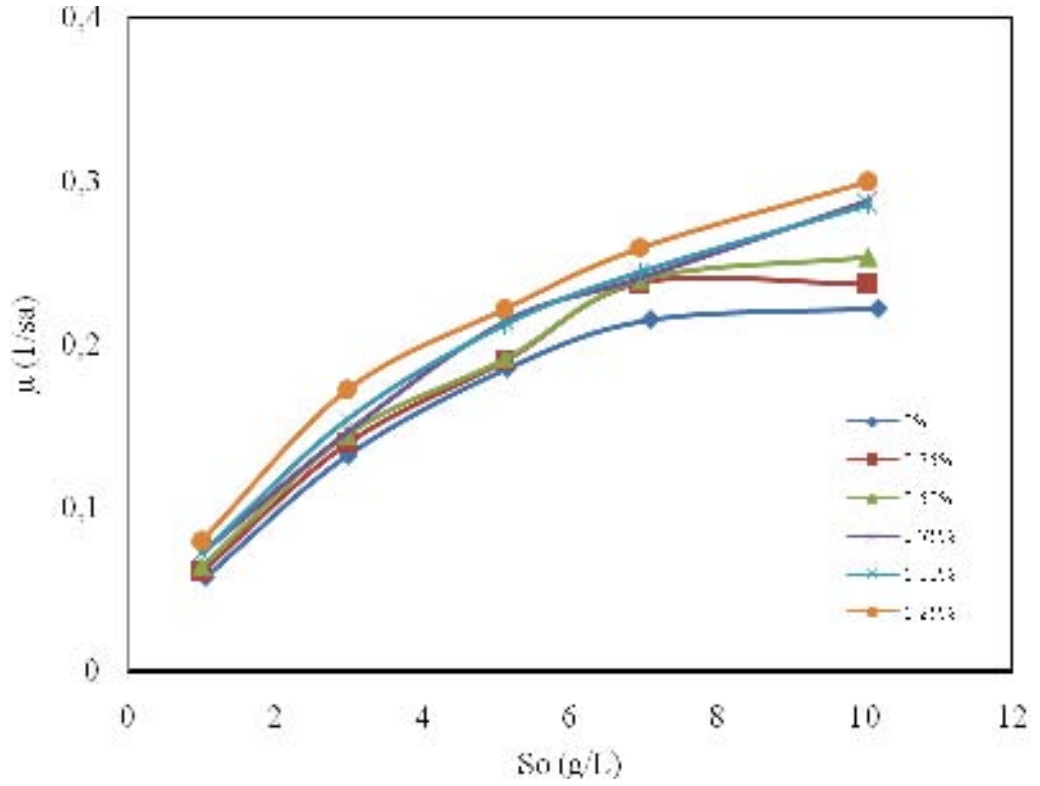
Çizelge 3.1.'den başlangıç sakkaroz ve eklene ayçiçeği yağı miktarındaki artışla mikroorganizma maksimum özgül üreme hızının arttığı, doygunluk sabiti değerlerinin ise azaldığı görülmektedir.

3.1.3.1. Kanola yağı etkisi

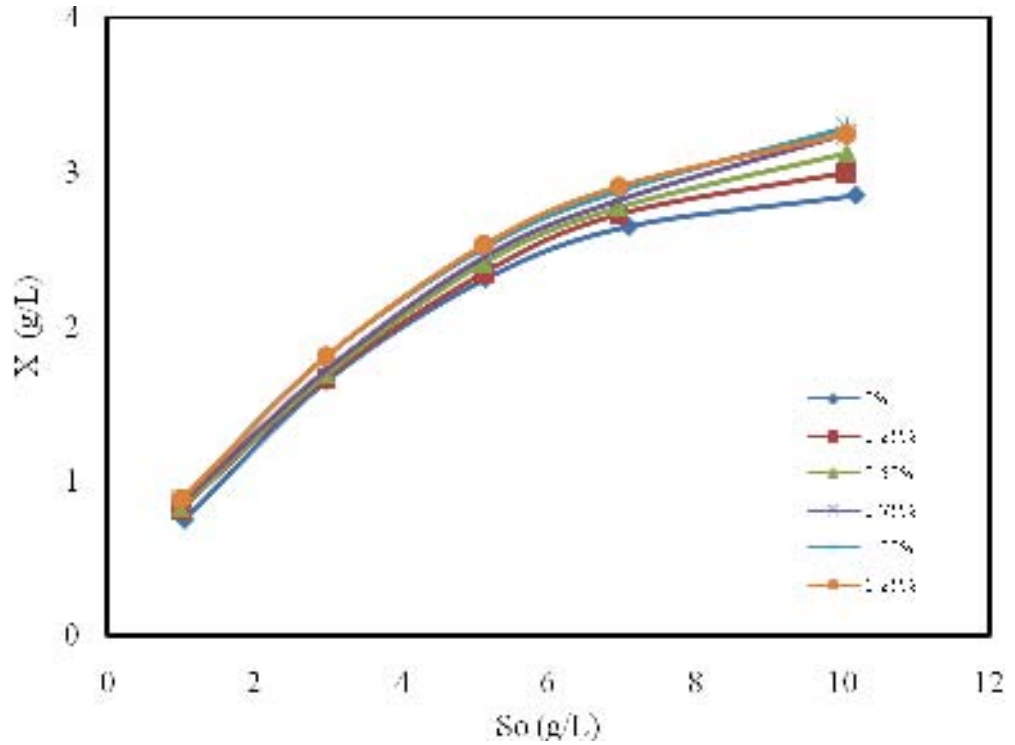
Ortama %0.25-1.25 kanola yağı eklenirken başlangıç sakkaroz derişimi de 1-10 g/L aralığında değiştirilmiş, aktivatör yağ ve sakkarozun lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Değişen başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizmanın gösterdiği lipaz aktivitesi Şekil 3.19., mikroorganizma özgül üreme hızı Şekil 3.20. ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi ise Şekil 3.21. de sunulmuştur. Şekillerden ortama eklenen kanola yağı miktarı ve başlangıç sakkaroz derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesini, mikroorganizma özgül üreme hızını ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarını önemli ölçüde artırdığı görölmektedir. Enzim aktivitesindeki artışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi arttıkça üreyen mikroorganizmaların daha fazla enzim ürettiği anlaşılmaktadır.



Şekil 3.19. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki kanola yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)



Şekil 3.20. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı miktarlardaki kanola yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

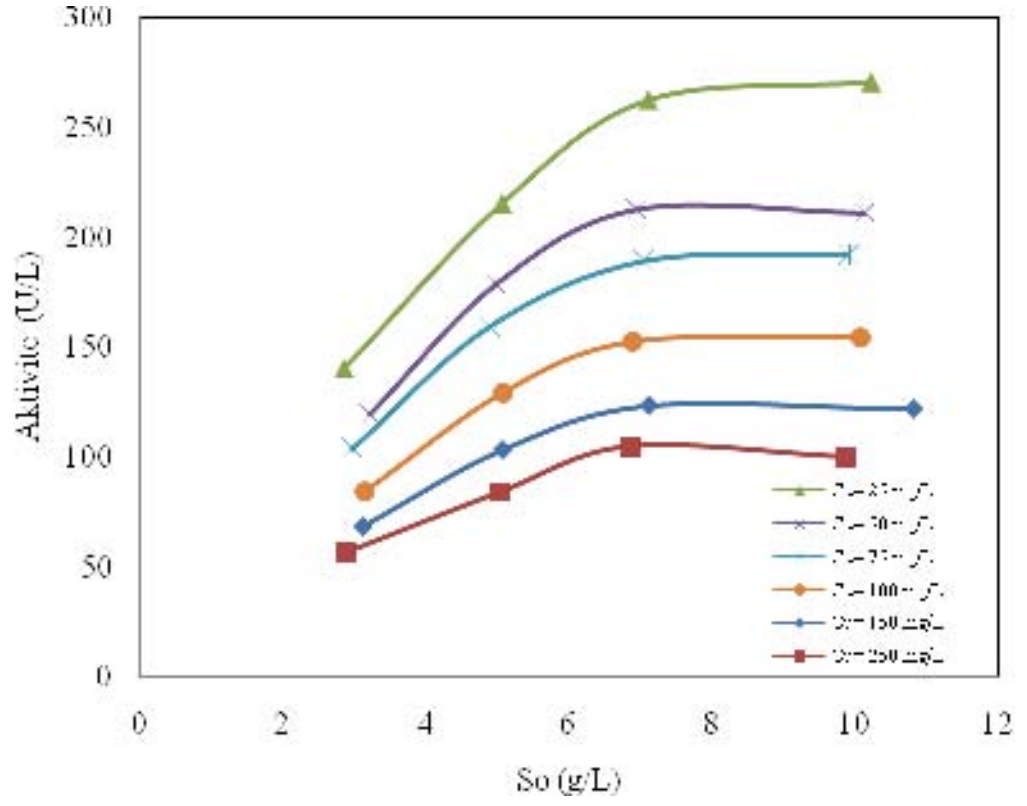


Şekil 3.21. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı miktarlardaki kanola yağı ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

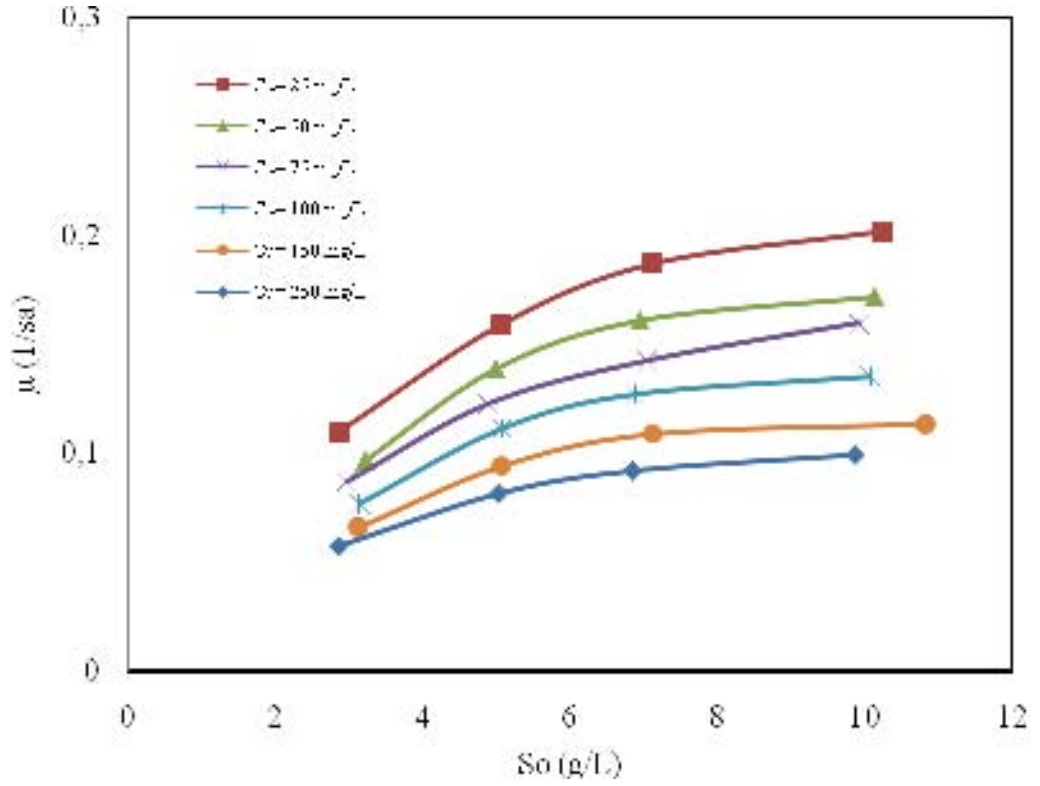
aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Tekli olarak ortama eklenen bakır(II) ve nikel(II) iyonlarının başlangıç derişimleri arttıkça enzim aktivitesinin, mikroorganizma özgül üreme hızının ve üreyen mikroorganizma derişiminin önemli oranda azaldığı, nikel(II) iyonlarının bu azaltıcı etkisinin bakır(II) iyonlarına göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Ortamlarda başlangıç sakkaroz derişimi de 3-10 g/L aralığında değiştirilerek sonuçlar birbirleriyle karşılaştırmalı incelenmiştir.

3.1.3.1. Bakır(II) iyonu etkisi

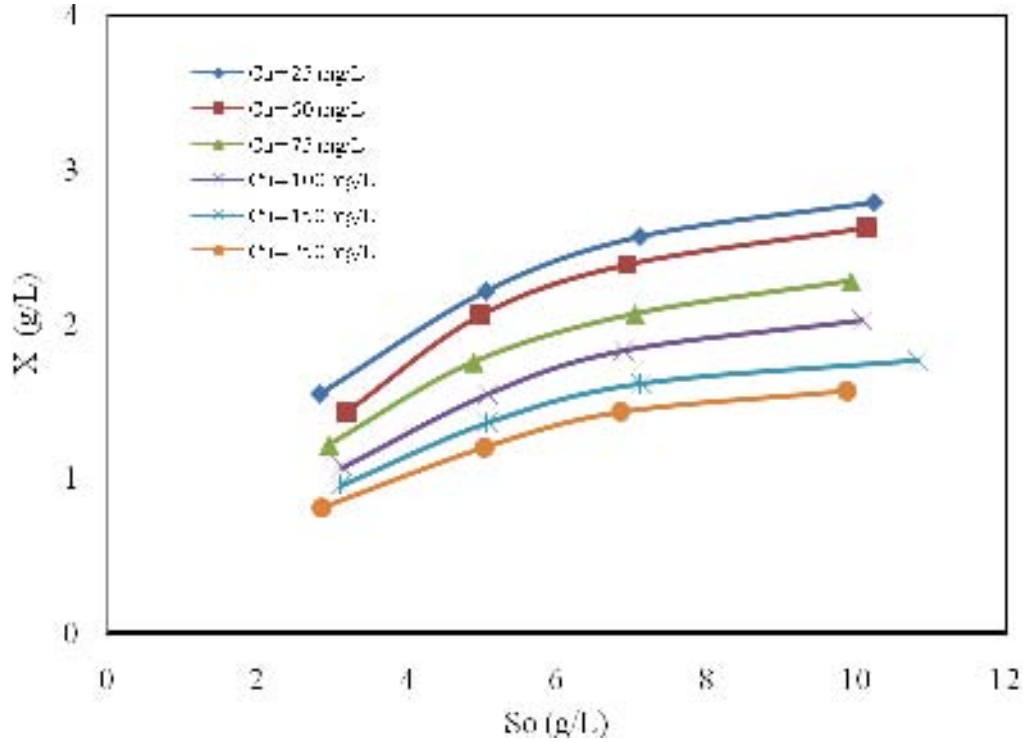
Ortama 25-250 mg/L derişim aralığında bakır(II) iyonu eklenirken başlangıç sakkaroz derişimi de 3-10 g/L aralığında değiştirilmiş, bakır(II) iyonları ve sakkarozun lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. 25-250 mg/L derişim aralığında bakır(II) içeren ortamlarda değişen başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizmanın gösterdiği lipaz aktivitesi Şekil 3.23., mikroorganizma özgül üreme hızı Şekil 3.24. ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi ise Şekil 3.25. de sunulmuştur. Şekillerden ortamdaki başlangıç sakkaroz derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesini, mikroorganizma özgül üreme hızını ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarını artırdığı ancak ortamdaki bakır(II) iyonları derişimi artışının ise lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve üreyen mikroorganizma miktarını önemli oranda azalttığı görülmektedir. Enzim aktivitesindeki bakır(II) iyonları varlığıyla azalışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi azaldıkça üreyen mikroorganizmaların daha az enzim ürettiği anlaşılmaktadır.



Şekil 3.23. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı derişimlerdeki bakır(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

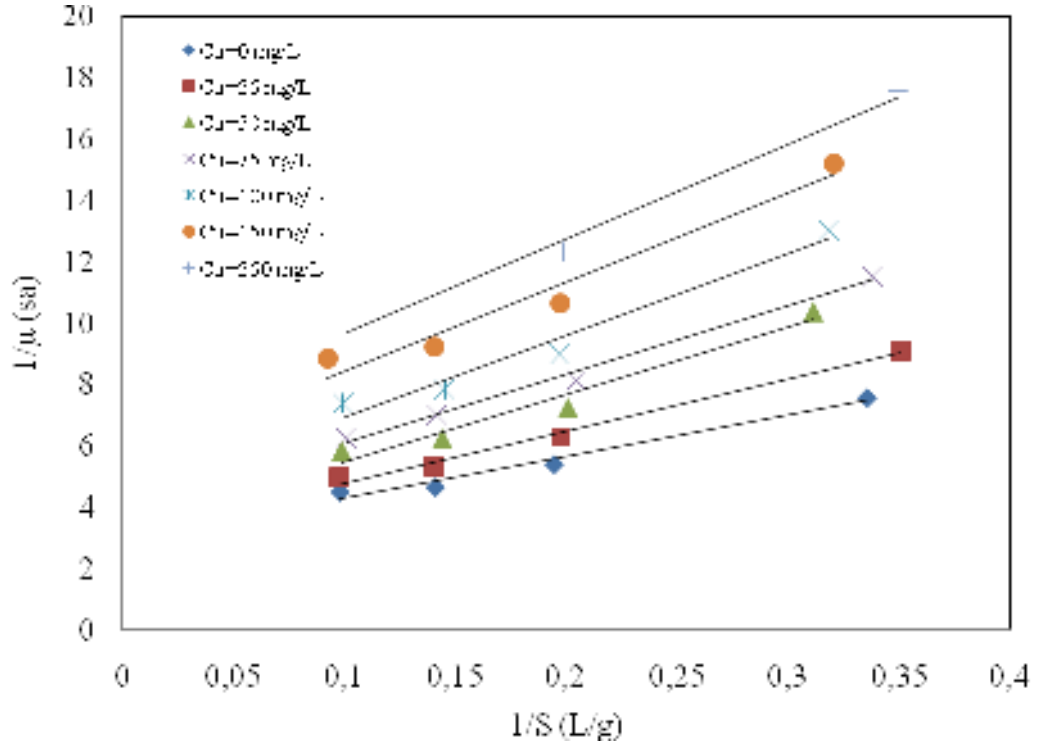


Şekil 3.24. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı derişimlerdeki bakır(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)



Şekil 3.25. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı derişimlerdeki bakır(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

Farklı derişimlerde bakır(II) içeren ortamda Monod eşitliğine göre çizilen $1/\mu-1/S$ (Şekil 3.26.) izotermelerden bulunan kinetik sabitler olan maksimum özgül üreme hızı ve doyunluk sabiti değerleri Çizelge 3.6.'de sunulmuştur.



Şekil 3.26. *Candida utilis* için bakır(II) içeren ortamda $1/\mu-1/S$ grafiği (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

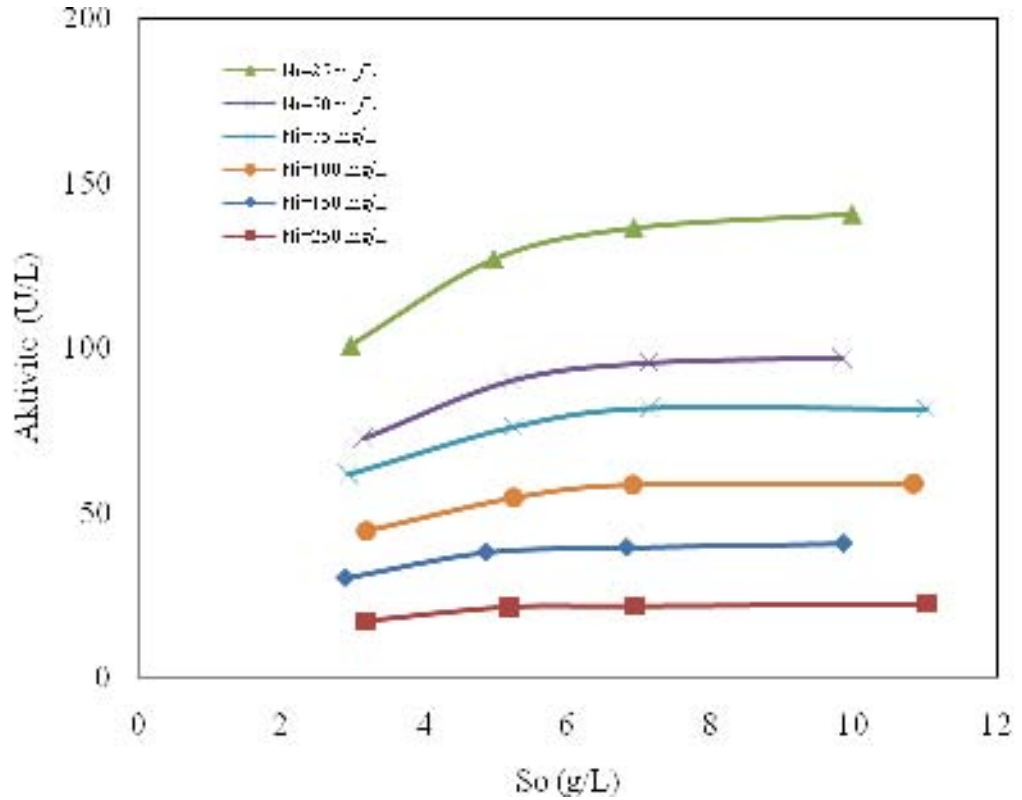
Çizelge 3.6. Farklı derişimlerde bakır(II) iyonu ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doyunluk sabiti değerleri

Cu(II) (mg/L)	μ_{max} (1/sa)	K_s (g/L)
0.00	0,417223	6,282961
25.0	0,323792	5,495402
50.0	0,307513	6,771733
75.0	0,260024	5,839617
100.0	0,235699	6,297641
150.0	0,181409	5,286264
250.0	0,151669	4,672774

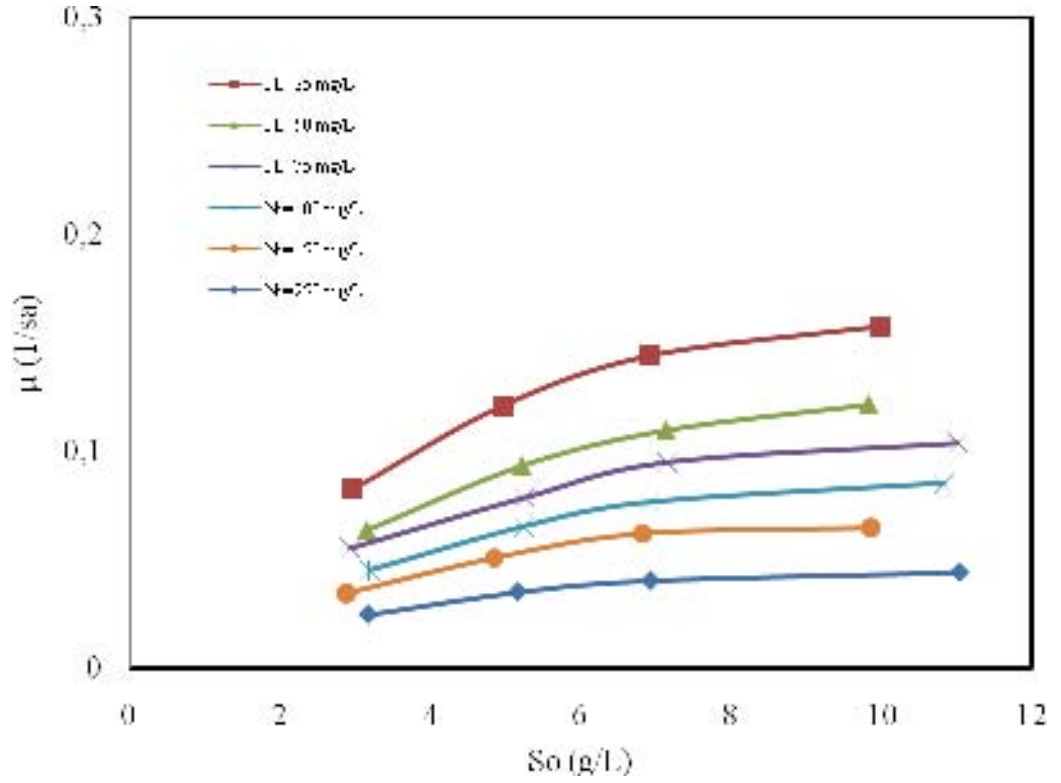
Çizelge 3.6.'dan başlangıç bakır(II) ve sakkaroz derişimindeki artışla mikroorganizma maksimum özgül üreme hızının önemli oranda azaldığı, doyunluk sabiti değerlerinin ise kısmen azaldığı görülmektedir.

3.1.3.2. Nikel(II) iyonu etkisi

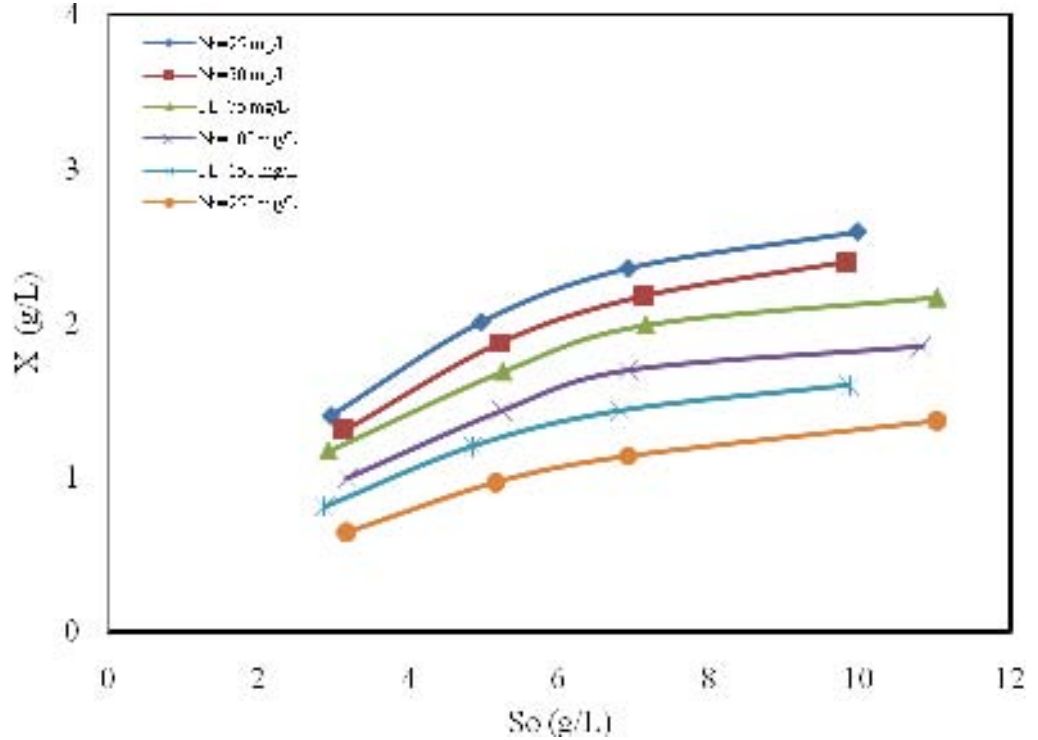
Ortama 25-250 mg/L derişim aralıında nikel(II) iyonu eklenirken başlangıç sakkaroz derişimi de 3-10 g/L aralıında değiştirilmiş, nikel(II) iyonları ve sakkarozun lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgöl üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. 25-250 mg/L derişim aralıında nikel(II) ieren ortamlarda değişen başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizmanın gösterdiği lipaz aktivitesi şekil 3.27., mikroorganizma özgöl üreme hızı şekil 3.28. ve maksimum üreyen mikroorganizma derişimi ise şekil 3.29. de sunulmuştur. şekillerden ortamdaki başlangıç sakkaroz derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesini, mikroorganizma özgöl üreme hızını ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarını artırdığı ancak ortamdaki nikel(II) iyonları derişimi artışının ise lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgöl üreme hızı ve üreyen mikroorganizma miktarını önemli oranda azalttığı görölmektedir. Enzim aktivitesindeki nikel(II) iyonları varlığıyla azalışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi azaldıkça üreyen mikroorganizmaların daha az enzim ürettiği anlaşılmaktadır.



şekil 3.27. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı derişimlerdeki nikel(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

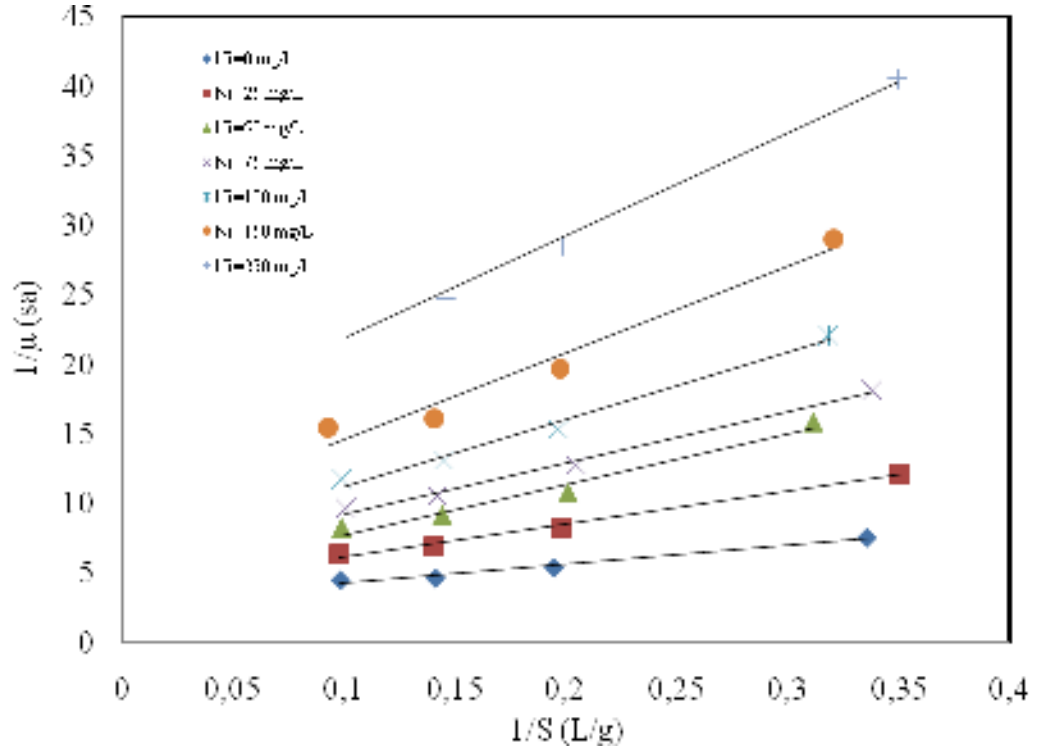


Şekil 3.28. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı derişimlerdeki nikel(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)



Şekil 3.29. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde maksimum üreyen mikroorganizma derişiminin farklı derişimlerdeki nikel(II) ile değişimi (pH: 4.0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

Farklı derişimlerde nikel(II) içeren ortamda Monod eşitliğine göre çizilen $1/\mu-1/S$ (Şekil 3.30.) izotermelerden bulunan kinetik sabitler olan maksimum özgül üreme hızı ve doyunluk sabiti değerleri Çizelge 3.6.'de sunulmuştur.



Şekil 3.30. *Candida utilis* için nikel(II) içeren $1/\mu-1/S$ grafiği (pH: 4,0, T: 25°C; KH: 150 rpm)

Çizelge 3.7. Farklı derişimlerde nikel(II) iyonu ve 1-10 g/L aralığında başlangıç sakkaroz derişimi içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doyunluk sabiti değerleri

Ni(II) (mg/L)	μ_{max} (1/sa)	K_s (g/L)
0.00	0,417223	6,282961
25.0	0,263797	6,224016
50.0	0,241955	8,776434
75.0	0,181334	6,68885
100.0	0,156801	7,59263
150.0	0,118645	7,362283
250.0	0,069118	5,09642

Çizelge 3.7.'den başlangıç nikel(II) ve sakkaroz derişimindeki artışla mikroorganizma maksimum özgül üreme hızının önemli oranda azaldığı, doyunluk sabiti değerlerinin ise değişkenlik gösterdiği görülmektedir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan tez çalışmasında bir maya türü olan *Candida utilis* mikroorganizması tarafından lipaz enzimi aktivitesi kesikli düzende çalışan karıştırmalı kapta başlangıç pH'nın, başlangıç melas sakarozu derişiminin, ortama eklenen aktivite artırıcı yağların ve metal iyonu derişiminin fonksiyonu olarak incelenmiştir. Lipaz enzimi aktivite deneylerinde sıcaklık 25°C olarak seçilmiştir.

Deneysel çalışmaların ilk kısmında aktivite artırıcı yağlar ile lipaz enzimi aktivitesi deneyleri yapılmış ve sonuçlar lipaz enzimi aktivitesi, v (U/L), mikroorganizma özgül üreme hızı, μ (1/sa) ve maksimum mikroorganizma derişimi, X (g/L) cinsinden hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır.

Deneysel çalışmaların ilk kısmında enzim üretimi için ortam optimum pH'nın ve başlangıç sakaroz derişiminin etkileri araştırılmış enzim üretimi ve mikroorganizma üremesi için kinetik sabitler tayin edilmiştir. Başlangıç pH'nın ve mikroorganizmanın ana karbon kaynağı olan sakarozun enzim üretimi ve mikroorganizma üremesini doğrudan etkileyen bir parametre olduğu görülmektedir. pH 4.0 değerinde maksimum lipaz aktivitesi gözlenirken, başlangıç sakkaroz derişiminin de artmasıyla aktivitenin arttığı bulunmuştur.

Mikroorganizma besin ortamına enzim aktivitesini artırıcı olarak katılan bazı ticari yağların kullanılmasıyla enzim aktivitesini önemli oranda arttığı bulunmuştur. Aktivatör olarak soya, mısır, zeytin, ayçiçeği ve kanola yağları kullanılmıştır. Ortama %0.25-1.25 oranında eklenen yağların hepsinin enzim aktivitesini belli oranda artırdığı gözlenirken en yüksek aktivite artışı ortama %1.25 oranında soya yağı eklendiğinde, en düşük aktivite artışı ise %0.25 oranında kanola yağı eklendiğinde bulunmuştur. Yağların enzim aktivitesini artırmasının çeşitli nedenleri olabilir. Genel olarak bütün yağların mikroorganizma üremesini de artırdığı deneysel sonuçlardan gözükmektedir. Mikroorganizma bu yağları besin olarak da tüketmektedir çünkü protein bakımından çok zengin olan bu yağlar genelde doymuş yağ oranı düşük yağlardır, dolayısıyla daha fazla üreyen mikroorganizma daha fazla enzim üretmektedir. Ayrıca faydalı asitler diyebileceğimiz ve yapılarında bol miktarda bulunan oleik, linoleik, linolenik asitler, gliseridler ve lipidler enzim üretimini indüklemekte (tetiklemekte) yani artırmaktadır. Çizelge 4.1. de ortamda 10 g/L sakkaroz ile, %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken bu yağların normal besin ortamına göre gösterdikleri enzim aktivitesi artış oranları görülmektedir.

Çizelge 4.1. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken elde edilen lipaz aktivitesinin yağ içermeyen ortam aktivitesiyle karşılaştırılması

Yağ Oranı	Yağ	Aktivite (U/L)	Aktivite Artış Oranı %'si
% 0	-	425,0	-
%0.25	Soya	585,6	37,8
	Mısır	556,3	30,9
	Zeytinyağı	527,0	24,0
	Ayçiçeği	500,7	17,8
	Kanola	450,6	6,0
%1.25	Soya	788,5	85,5
	Mısır	783,9	84,4
	Zeytinyağı	779,2	83,3
	Ayçiçeği	740,2	74,1
	Kanola	673,6	58,5

Enzim aktivitesi artırıcı olarak kullanılan yağların enzim aktivitesini artırıcı etkisi yanında mikroorganizma üremesini, mikroorganizma özgül üreme hızı ve mikroorganizmanın maksimum üreyen derişiminin de arttığı görülmüştür. Çizelge 4.2 de ortamda 10 g/L sakkaroz ile, %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken bu yağların etkisiyle mikroorganizma özgül üreme hızı ve mikroorganizma maksimum üreme miktarlarındaki artış oranları görülmektedir.

Çizelge 4.2. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarının yağ içermeyen ortamdaki değerlerle karşılaştırılması

Yağ oranı	Yağ	μ (1/sa)	Özgül Üreme Hızı Artış Oranı %'si	X (g/L)	Üreme Miktarı Artış Oranı %'si
% 0	-	0,222	-	2,85	-
%0.25	Soya	0,281	26,6	3,18	11,6
	Mısır	0,274	23,4	3,15	10,5
	Zeytinyağı	0,268	20,7	3,12	9,4
	Ayçiçeği	0,251	13,1	3,06	7,3
	Kanola	0,236	6,3	3,00	5,2
%1.25	Soya	0,380	71,2	3,45	21,0
	Mısır	0,371	67,1	3,41	19,6
	Zeytinyağı	0,362	63,0	3,38	18,6
	Ayçiçeği	0,326	46,8	3,32	16,5
	Kanola	0,300	35,1	3,25	14,0

Bu sonuçlar genel olarak kullanılan yağların hepsinin mikroorganizmanın lipaz enzimi aktivitesini ve mikroorganizma büyüme değerlerini soya>mısır>zeytin>ayçiçeği>kanola sırasında artırdığını göstermektedir. Ayrıca Monod eşitliğine göre çizilen izotermlere göre bulunan maksimum özgül üreme hızları da aktivatör yağların kullanıldığı ortamlarda daha yüksek

bulunmuştur. Çizelge 4.3.'de ortamda 10 g/L sakkaroz ile, %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken Monod eşitliğine göre çizilen izotermlere göre bulunan maksimum enzim aktivitesi ve maksimum özgül üreme hızları değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.3. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda %0.25 ve %1.25 oranlarında yağ varken Monod eşitliğine göre çizilen izotermlere göre bulunan maksimum maksimum özgül üreme hızları değerlerinin yağ içermeyen ortamdaki değerlerle karşılaştırılması

Yağ oranı	Yağ	μ_{max} (1/sa)
% 0	-	0,417
%0.25	Soya	0,460
	Mısır	0,443
	Zeytinyağı	0,425
	Ayçiçeği	0,399
	Kanola	0,389
%1.25	Soya	0,517
	Mısır	0,509
	Zeytinyağı	0,501
	Ayçiçeği	0,474
	Kanola	0,414

Enzim aktivitesini artırıcı ortam deneyleri yapıldığı gibi deneysel çalışmaların ikinci kısmında mikroorganizma üremesini inhibe ettiği bilinen bakır(II) ve nikel(II) iyonlarının enzim aktivitesi ve mikroorganizma üremesine etkileri de incelenmiştir. Tekli olarak 25-250 mg/L aralığında ortama eklenen bakır(II) ve nikel(II) iyonlarının başlangıç derişimi arttıkça lipaz enzimi aktivitesinin önemli oranda düştüğü bulunmuştur. Çizelge 4.4. de ortamda 10 g/L sakkaroz ile, 25 mg/L ve 250 mg/L derişimlerinde bakır(II) ve nikel(II) iyonları varken bu iyonların normal besin ortamına göre enzim aktivitesini azaltma oranları görülmektedir. Çizelgeden nikel(II) içeren ortam sonuçlarının bakır(II) ye kıyasla daha düşük olduğu, nikel(II)'nin aktiviteyi azaltıcı etkisinin daha fazla olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.4. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda 25 ve 250 mg/L derişiminde bakır(II) ve nikel(II) varken elde edilen lipaz aktivitesinin normal ortam aktivitesiyle karşılaştırılması

Metal İyonu Derişimi (mg/L)	Metal İyonu	Aktivite (U/L)	Aktivite Düşüş Oranı %'si
0,0	-	425,0	-
25,0	Bakır(II)	270,6	-36,3
	Nikel(II)	140,7	-66,9
250,0	Bakır(II)	100,1	-76,4
	Nikel(II)	22,5	-94,7

Metal iyonlarının en bilinen özelliği mikroorganizma üremesini inhibe etmesidir. Başlangıç metal iyon derişimi arttıkça enzim aktivitesindeki azalma yanında mikroorganizma özgül üreme hızı ve mikroorganizmanın maksimum üreyen derişimi de azalmıştır. Çizelge 4.5 de

ortamda 10 g/L sakkaroz ile, 25 mg/L ve 250 mg/L derişimlerinde bakır(II) ve nikel(II) iyonları varken bu iyonların etkisiyle mikroorganizma özgül üreme hızı ve mikroorganizma maksimum üreme miktarlarındaki düşüş oranları görülmektedir.

Çizelge 4.5. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda 25 ve 250 mg/L derişiminde bakır(II) ve nikel(II) varken elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarının normal ortamdaki değerlerle karşılaştırılması

Metal İyonu Derişimi (mg/L)	Metal İyonu	μ (1/sa)	Özgül Üreme Hızı Düşüş Oranı %'si	X (g/L)	Üreme Miktarı Düşüş Oranı %'si
0,0	-	0,222	-	2,85	-
25,0	Bakır(II)	0,202	-9,0	2,79	-2,1
	Nikel(II)	0,157	-29,3	2,59	-9,1
250,0	Bakır(II)	0,098	-55,9	1,56	-45,3
	Nikel(II)	0,044	-80,2	1,37	-51,9

Bu sonuçlar ortamdaki bakır(II) ve nikel(II) iyonlarının lipaz enzimi aktivitesi ve mikroorganizma büyüme değerlerini önemli oranda düşürdüğünü, nikel(II)'nin etkisinin ise daha fazla olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.6.'da ortamda 10 g/L sakkaroz ile, 25 mg/L ve 250 mg/L derişimlerinde bakır(II) ve nikel(II) iyonları varlığında Monod eşitliğine göre çizilen izotermlere göre bulunan maksimum özgül üreme hız değerleri görülmektedir. Çizelgeden ortamdaki bakır(II) ve nikel(II) iyonlarının bu değerleri de önemli oranda azalttığı anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.6. 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda 25 ve 250 mg/L derişiminde bakır(II) ve nikel(II) varken Monod eşitliğine göre çizilen izotermlere göre bulunan maksimum özgül üreme hızları değerlerinin normal ortam değerleriyle karşılaştırılması

Metal İyonu Derişimi (mg/L)	Metal İyonu	μ_{max} (1/sa)
0,0	-	0,417
25,0	Bakır(II)	0,324
	Nikel(II)	0,263
250,0	Bakır(II)	0,151
	Nikel(II)	0,069

Candida utilis ile lipaz aktivitesi çalışması literatürde daha önce çalışılmadığı için özgündür ve genel olarak denilebilirki *Candida utilis* mayası kullanılarak ortam şartları uygun belirlenirse yüksek oranda lipaz enzimi aktivitesi elde etmek mümkündür.

5. KAYNAKLAR

Andreas, K., Annette, L., Leda, R., Denise, M.G., 1999, "Lipase production by *Penicillium resstrictum* in solid-state Fermentation using babassu oil cake as substrate", *Process Biochemistry*, 35,85-90

Bailey, j. E., and Ollis, D.F., 1977, "Biochemical Engineering Fundamentals", 371-376
232-241, 525-545, McGraw Hill Co.; London

Baillargeon, M.W., Bistline, R.G., Sonnet, P.E., 1989, Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 92-96.

Bhushan, B., Dosanjh, N. S., Kumar, K. And Hoondal, G.S., 1994, "Lipase Production From An Alkalophilic Yeast sp. By Solid State Fermentation", *Biotechnology, Letters*, Vol, 16No:8, 841-842

Chisti Y. Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*, vol. 5. New York: Wiley, 1999a. pp. 2446 - 62.

Cordova, J., Nemmaoui, M., İsmayli-Alaoui, M., Morin, A., Roussos, S., 1998 "Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5, 75-78

Costa MA, Peralta RM. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *J Basic Microbiol* 1999;39:11 - 5.

Erdal, E., 2004, Enzimatik tepkimeye ait kinetik parametrelerin tek kesikli çalışmada Lambert W fonksiyonu kullanılarak bulunması, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Essamri M, Valerie D, Louis C. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J Biotechnol* 1998;60:97 - 103.

Forouchi, E., and Gunn, d. J., 1983, Some effects on metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media, *Biotech. Bioeng.* 25, 1905-1911.

Gao Y, Breuil C. Extracellular lipase production by a sapwood-staining fungus *Ophiostoma piceae*. *World J Microbiol Biotechnol* 1995;11:638 - 42.

Gordillo MA, Obradors N, Montesinos JL, Valero F, Lafuente J, Sola C. Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995; 43:38 - 41.

Gerritse G, Hommes RW, Quax WJ. Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *J Appl Environ Microbiol* 1998;64:2644 - 51.

Gözükara, E., 1997, *Biyokimya* 2, Nobel Tıp Kitapevleri, 575-580

Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 763-781.

Haas, M.J., Cichowicz, D.J., Bailey, D.G., 1992, Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*, *Lipids*, 27, 571-576.

Hang, Y.D., 1989, "Direct Fermentation of Corn to L(+)-Lactik Acid By *Rhizopus oryzae*" *Biotechnology Letters*, 11, 4, 299-300

Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L, Comeau LC. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb Technol* 2000; 26:421 - 30.

Izumi T, Nakamura K, Fukase T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric Biol Chem* 1990;54:1253 - 8.

İnal, M. E. 1996. *Biyokimya*. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 489, 10, Eskişehir.

Jaeger, K-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 29-63.

Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews Microbiology*, 53 (1): 315-351.

Janssen PH, Monk CR, Morgan HW. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitro-phenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiol Lett* 1994;120:195 - 200.

Kamini, N.R., J.G.S. and Puvanakrishnan, R., 1998, "Lipase Production From *Aspergillus niger* By Solid State Fermentation Using Gingelly Oil Cake", *Process Biochem.*, Vol. 33, No:5, 5005-511

Kim HK, Park SY, Lee JK, Oh TK. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62:66 - 71.

Kok RG, Thor JJV, Roodzant IMN, Brouwer MBW, Egmond MR, Nudel CB, Vosman B, Hellingwer KJ. Characterization of the extracellular lipase lipA of *Acinetobacter colcoacetis* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Mol Microbiol* 1995;15:803 - 18.

Lee SY, Rhee JS. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb Technol* 1993;15:617 - 24.

Lin SF, Chiou CM, Yeh C, Tsai YC. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1093 - 5.

- Lotti M, Monticelli S, Montesinos JL, Brocca S, Valero F, Lafuente J. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem Phys Lipids* 1998;93:143 - 8.
- Munoz, G., Valecia, J. R., Sacher, S. and Farres, A., 1991, "Production of microbial lipases in a solid state fermentation system", *Biotechnology Letters*, Vol. 13, No 4, 277-280, Mexico.
- Özata, A., Kutlu, M., 2000, *Enzimoloji ders notları*, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları; no. 1254, Eskişehir, 30 – 38.
- Pekin, B., 1980, "Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)", E.Ü., Kimya Fak. Yayınları, No 3, İzmir
- Papaparaskevas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol Lett* 1992;14:397 - 402.
- Pimentel MC, Krieger N, Coelho LC, Fontana JO, Melo EH, Ledingham WM, Lima Filho JL. Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Appl Biochem Biotechnol* 1994;49:59 - 74.
- Pokorny D, Friedrich J, Cimerman A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* 1994;16:363 - 6.
- Samerra, M., Dufou, C., 1972, *Biochemica Biophysica Acta*, 260, 393
- Sandell, E.B., 1961, *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, 3rd ed., Interscience Publishers, USA., 388-409, 437-469, 522-553.
- Snell, F.D., and Snell, C.T., 1959, *Colorimetric Methods of Analysis*, 3rd ed. Vol. 2, D. Van Nostrand Company, Canada, 1-46, 78-139, 279-337.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.
- Sharon C, Furugoh S, Yamakido T, Ogawa H, Kato Y. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998; 20:304 - 7.
- Sugiura M, Isobe M., 1974. Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*. 3. Purification of a low molecular weight lipase and its enzymatic properties. *Biochim Biophys Acta*. 21;341 (1):195-200
- Smythe, C.V. and Drake, B. B., 1949, "Fungal Lipase", U.S. Patent.
- Soccol, C.R., Marin, B., Lebeault, J-M, Raimbault, M., 1994, "Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*", *Applied Microbiology*, Vol. 41, 3, 286-290
- Smythe, C.V. and Drake, B.B., 1949, "Fungal Lipase", U.S. Patent.
- Soccol, C.R., Marin, B., Lebeault, J-M, Raimbault, M., 1994, "Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*" *Applied*

- Sidhu P, Sharma R, Soni SK, Gupta JK. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp.. *Folia Microbiol* 1998a;43:51 - 4.
- Sidhu P, Sharma R, Soni SK, Gupta JK. Effect of cultural conditions on extracellular lipase production by *Bacillus* sp. RS-12 and its characterization. *Indian J Microbiol* 1998b;38:9 - 12.
- Shuler, M. L., Kargi, F., 2002, *Bioprocess Engineering*, 2nd ed. Prentice Hall PTR, USA.
- Sztajer H, Menge U, Schmid RD. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim Biophys Acta* 1993;1168:181 - 9.
- Sztajer H, Maliszewska I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett* 1989;11:895 - 8.
- Tao, S., Zuohu, Deming, L., "A Novel Design of Solid State Fermenter and Its Evaluation for Cellulase Production by *Trichoderma viride* SL-I", Vol., 10, No: 11, 889-894.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu*. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çeşme, İzmir-Türkiye, 326p.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., Çeltik, Ö., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turk J Biol*, 24: 79-93.
- Ul-Haq, I., Idress, S., Rajoka, M., I., 2002, "Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation", *Process Biochemistry*, 37, 637-641
- Venkateshwarlu N, Reddy SM. Production of lipase by five thermophilic fungi. *Indian J Microbiol* 1993;33: 119 - 24.
- Vorderwiihlbecke T, Kieslich K, Erdmann H. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb Technol* 1992;14:631 - 9.
- Walker, Graeme M., 2000, *Yeast Physiology and Biotechnology*, Wiley and Sons, England.
- Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). *J Ferment Bioeng* 1995;79:433 - 8.
- Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., Bol, J., 1994, "A Novel Solid State Fermentation System Using Polyurethane" Foam as Inert Carrier", *Nutrition and Food Research*, Vol. 16, No: 61, 643-648.
- Smythe, C.V. and Drake, B. B., 1949, "Fungal Lipase", U.S. Patent.
- Soccol, C.R., Marin, B., Lebealt, J-M, Raimbault, M., 1994, "Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*", *Applied Microbiology*, Vol. 41, 3, 286-290

- Smythe, C.V. and Drake, B.B., 1949, "Fungal Lipase", U.S.. Patent.
- Soccol, C.R., Marin, B., Lebeault, J-M, Raimbault, M., 1994, "Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*" Applied
- Sidhu P, Sharma R, Soni SK, Gupta JK. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp.. *Folia Microbiol* 1998a;43:51 - 4.
- Sidhu P, Sharma R, Soni SK, Gupta JK. Effect of cultural conditions on extracellular lipase production by *Bacillus* sp. RS-12 and its characterization. *Indian J Microbiol* 1998b;38:9 - 12.
- Shuler, M. L., Kargi, F., 2002, *Bioprocess Engineering*, 2nd ed. Prentice Hall PTR, USA.
- Sztajer H, Menge U, Schmid RD. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim Biophys Acta* 1993;1168:181 - 9.
- Sztajer H, Maliszewska I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett* 1989;11:895 - 8.
- Tao, S., Zuohu, Deming, L., "A Novel Design of Solid State Fermenter and Its Evaluation for Cellulase Production by *Trichoderma viride* SL-I", Vol., 10, No: 11, 889-894.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*. *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu*. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çeşme, İzmir-Türkiye, 326p.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., Çeltik, Ö., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turk J Biol*, 24: 79-93.
- Ul-Haq, I., Idress, S., Rajoka, M., I., 2002, "Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation", *Process Biochemistry*, 37, 637-641
- Venkateswarlu N, Reddy SM. Production of lipase by five thermophilic fungi. *Indian J Microbiol* 1993;33: 119 - 24.
- Vorderwülbecke T, Kieslich K, Erdmann H. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb Technol* 1992;14:631 - 9.
- Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). *J Ferment Bioeng* 1995;79:433 - 8.
- Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., Bol, J., 1994, "A Novel Solid State Fermentation System Using Polyurethane" Foam as Inert Carrier", *Nutrition and Food Research*, Vol. 16, No: 61, 643-648.

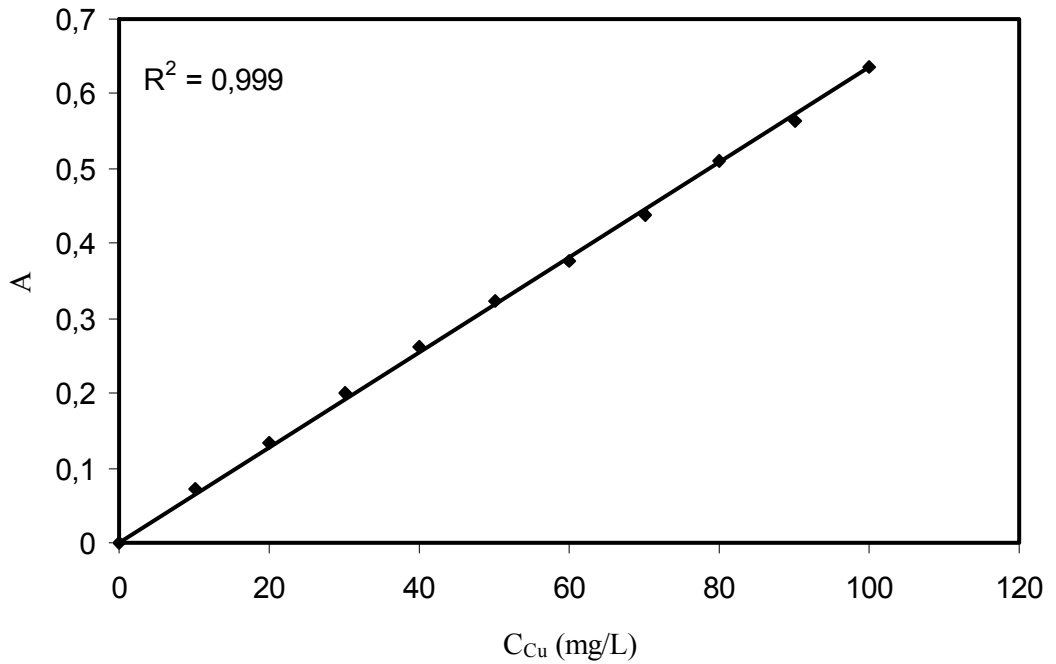
6. ÖZGEÇMİŞ

Neşe KEKLİKÇİOĞLU 01.03.1984 tarihinde Sivas'ta doğdu. İlk,orta ve lise öğrenimini Sivas'ta tamamladı. 2002 yılında başladığı Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden 2006 yılında derece ile mezun oldu. 2008 yılı Aralık ayından itibaren aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

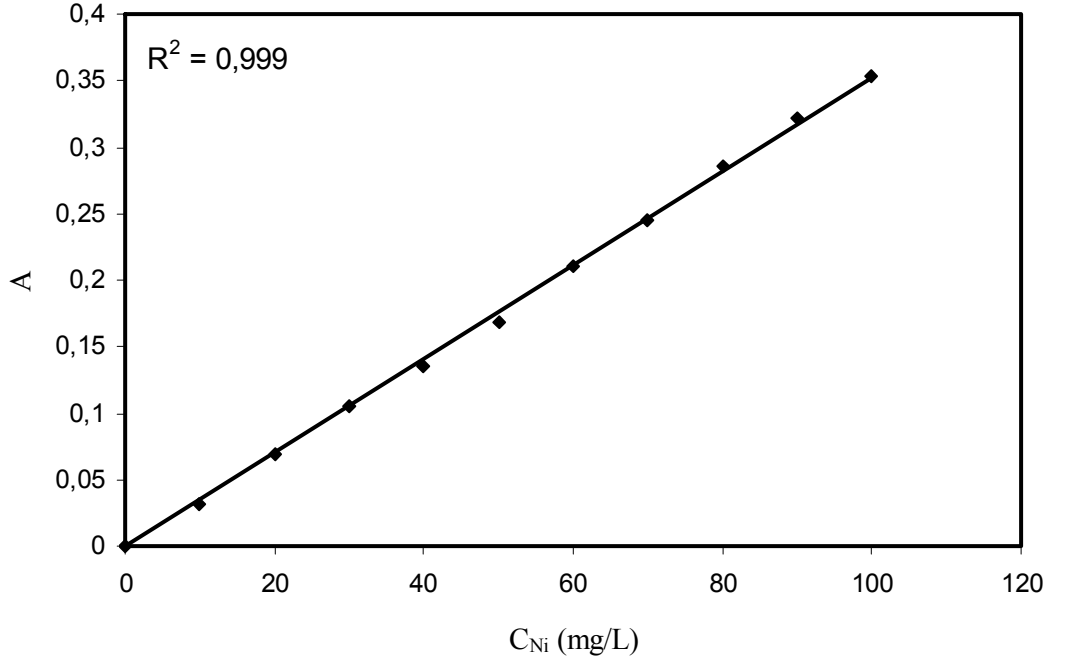
7. EKLER

Ek 1. Bakır (II) ve Nikel(II) İyon Derişimlerinin Tayini

Ortamdaki serbest bakır(II) veya nikel(II) iyon derişiminin bulunması için aynı yöntem kullanılmış olup, bakır(II)/nikel(II)'nin sodyum dietil ditiyokarbomatla yaptığı sarı-kahveregi renkli kompleks yardımı ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bakır(II) iyonunun sodyum dietil ditiyokarbomatla kompleks oluşturabilmesi ve kompleksin çökmemesi için ortam pH'nın 9.0'un üzerinde olması gerekmektedir. Çözelti 10.0-100.0 mg/L bakır(II) içerecek şekilde seyreltilir. Hazırlanmış örnekten 1 mL alınır ve sırasıyla 20 mL 1.5 N NH₃, 0.2 mL %1'lik sodyum dietil ditiyokarbomat eklenir, hacim damıtık su ile 25 mL'ye tamamlanır. Spektrofotometrede 460 nm'de absorbansı okunur, çalışma doğrusundan mg/L cinsinden bakır(II) derişimine geçilir (Snell and Snell, 1959; Sandell, 1961; Aksu, 1988). Bakır(II) ve nikel(II) iyon derişiminin tayini için kullanılan çalışma doğruları Şekil E.1 ve Şekil E.2'de verilmiştir.



Şekil E.1. Bakır(II) iyon derişiminin tayini için kullanılan çalışma doğrusu



Şekil E.2. Nikel(II) iyon derişiminin tayini için kullanılan çalışma doğrusu

Ek 2. Melas Sakkarozu Derişiminin Tayini

Besin ortamdaki melas sakkarozunun derişimi, sakkarozun dinitrosalisilik asit ile yaptığı koyu turuncu renkli kompleks yardımı ile tayin edilir (Miller yöntemi). Bu yöntemde kullanılan analiz çözeltileri, hazırlama şekilleri ve analiz yöntemi aşağıda verilmiştir.

Analiz Çözeltileri:

a-DNS Çözeltisi: 10 g dinitrosalisilik asit, 10 g sodyum hidroksit ve 1.6 g fenol 1 L damıtık suda çözülür (Bu çözeltiyi kullanmadan hemen önce 100 mL'sine 1 mL %10'luk sodyum sülfid ilave edilir).

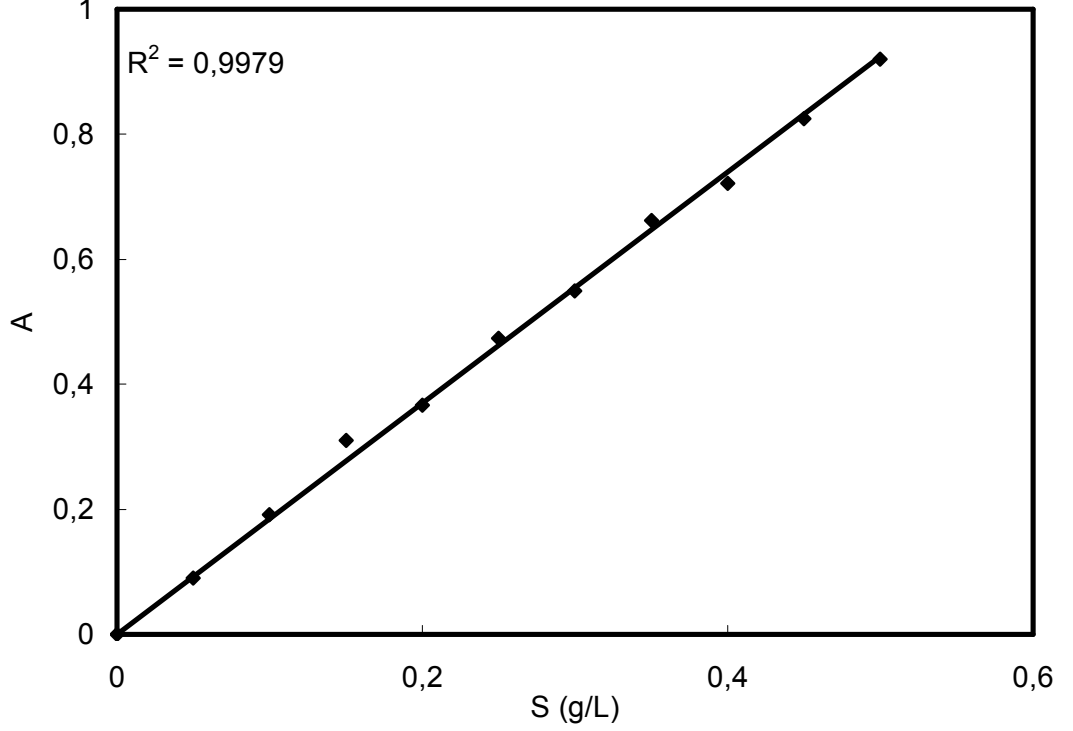
b-Rochella Tuzu Çözeltisi: 400 g potasyum sodyum tartarat 1 L damıtık suda çözülür.

c-Sodyum sülfid çözeltisi: 1 g sodyum sülfid 100 mL damıtık suda çözülür.

Yöntem:

Besin ortamından alınan örnek santrifüjlenerek mikroorganizmadan ayrılır. Çözelti içerisindeki şeker derişimi 0-0.5 g/L aralında olacak şekilde seyreltilir. Seyreltilen çözeltilerden alınan 2 mL örnek bir deney tüpüne konur ve üzerine 2 mL DNS çözeltisi eklenerek kaynar suda 15 dk bekletilir. Kaynar su banyosundan alınan örneğin üzerine 1 mL Rochella tuzu çözeltisi konularak musluk suyunda soğutulur. Üzerine 5 mL damıtık su ilave edilerek 575 nm'de

absorbansı ölçülür. Kör çözeltileri olarak 2 mL örnek yerine 2 mL damıtık su konulan ve aynı işlemlerden geçirilen çözeltiler kullanılır.



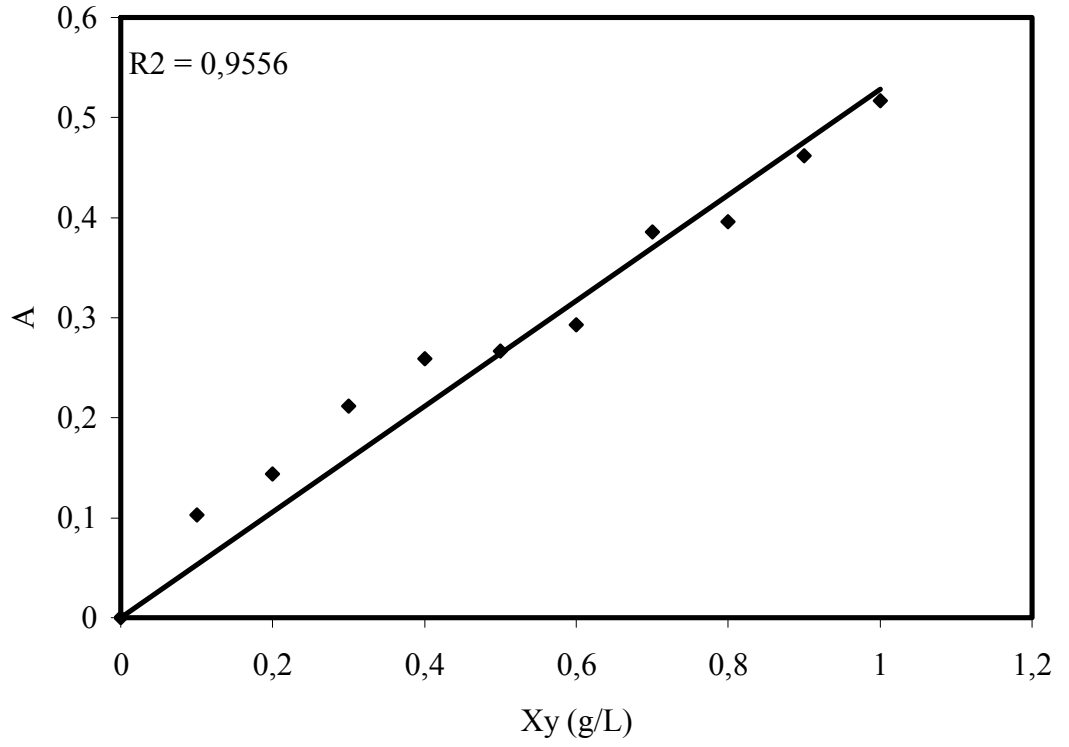
Şekil E.3. Melas sakkarozu derişiminin tayini için kullanılan çalışma doğrusu

Ek 3. Mikroorganizma Derişimi Tayini

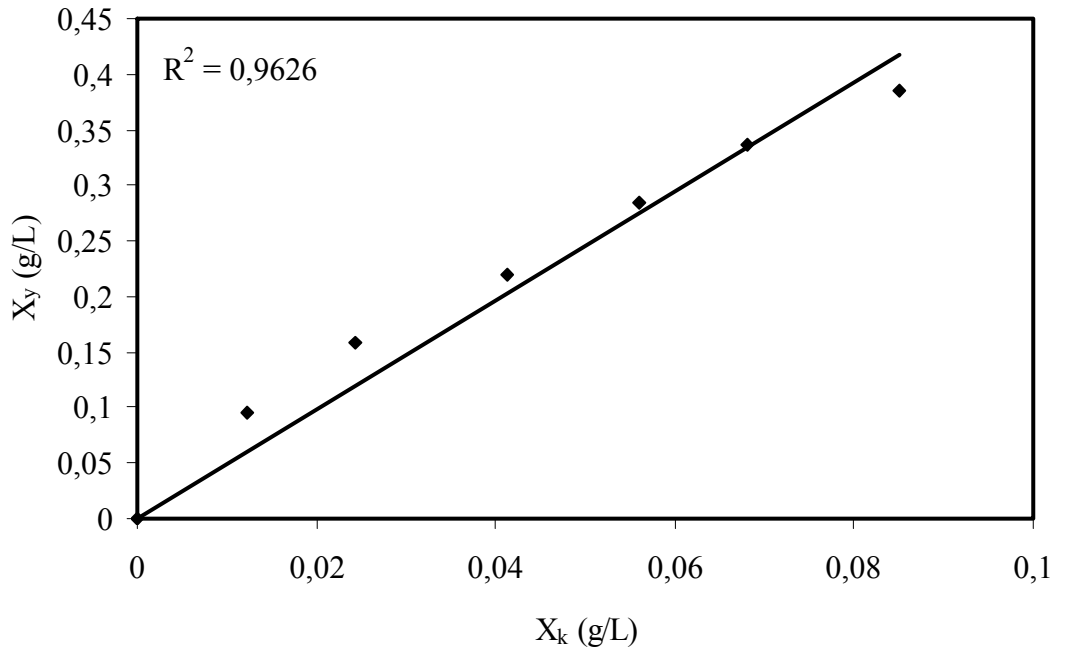
Mikroorganizma derişimi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bunun için öncelikle 1 g/L'ye kadar farklı derişimlerde mikroorganizma içeren çözeltilerin, uygun dalga boyu olarak seçilen 360 nm'de absorbanslarının okunmasıyla *C. utilis* için yaş mikroorganizma çalışma doğruları oluşturulmuştur (Şekil E.4, Şekil E.5).

Verilerin değerlendirilmesinde kuru mikroorganizma ağırlığı kullanıldığından, yaş ve kuru ağırlık arasındaki ilişkiyi belirlemek gerekmektedir. Bunun için mikroorganizma sıvı ortamda üretilip santrifüjlenerek ayrılmış, ayrılan mikroorganizmalar farklı ağırlıklarda tartılarak 50°C'deki etüvde sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Analiz için besin ortamından alınan 5 mL örnek 5000 devirde 10 dk santrifüjlenmiş, tüpte kalan mikroorganizma kütlesi saf su ile tekrar 5 mL'ye seyreltilerek 360 nm'de suya (kör çözeltileri) karşı absorbans okunmuş ve çalışma doğruları kullanılarak kuru mikroorganizma ağırlığı isaptanmıştır.



Şekil E.4. *C. utilis* için yaş mikroorganizma çalışma doğrusu



Şekil E.5. *C. utilis* için yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusu