

***Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-2641) BAKTERİSİ
KULLANILARAK LİPAZ ÜRETİMİ**

Yük. Müh. Mehtap TANYOL

**Doktora Tezi
Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gülşad USLU
MART-2011**

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Pseudomonas fluorencens* (NRRL B-2641) BAKTERİSİ**
KULLANILARAK LİPAZ ÜRETİMİ

DOKTORA TEZİ

Yük. Müh. Mehtap TANYOL

(04112201)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 10 Mart 2011
Tezin Savunulduğu Tarih : 28 Mart 2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülşad USLU (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Murat ELİBOL (E.Ü)

Prof. Dr. Gülbeyi DÜRSUN (F.Ü)

Prof. Dr. Halil HASAR (F.Ü)

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer (NACAR) KOÇER (F.Ü)

MART-2011

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Gülşad USLU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Özlem TEPE'ye teşekkür ederim.

Çalışmamın ve hayatımın her aşamasında desteğini gördüğüm aileme teşekkür ederim.

Çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan FÜBAP'a şükranlarımı sunarım.

Mehtap TANYOL
ELAZIĞ – 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
TABLolar LİSTESİ	XIV
SİMGELER	XVI
1. GİRİŞ	1
2. ENZİMLER	3
2.1. Genel	3
2.2. Enzimlerin Kimyasal Yapısı	5
2.3. Enzimlerin Aktif Merkezi	6
2.4. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması	7
2.5. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	8
2.5.1. pH	8
2.5.2. Sıcaklık	10
2.5.3. Zaman	10
2.5.4. Enzim Konsantrasyonu	10
2.5.5. Substrat Konsantrasyonu	11
2.5.6. Reaksiyon Ürünleri	11
2.5.7. Aktivatörler ve İnhibitörler	11
2.6. Enzim Kaynakları	12
2.7. Enzim Kinetiği	13
3. LİPAZ ENZİMİ	16
3.1. Genel	15
3.2. Lipazların Substrat Spesifikliği	18
3.3. Lipazların Katalitik Özellikleri	19
3.3.1. Hidroliz	20
3.3.2. Esterifikasyon	21

3.3.3. Transesterifikasyon	21
3.3.4. Doğal Olmayan Substratların Katalizi.....	22
3.4. Bakteriyel Lipazlar	22
3.5. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemleri.....	23
3.6. Lipaz Üretimi ve Ortam Bileşimi.....	25
3.6.1. Karbon Kaynaklarının Etkisi	25
3.6.2. Azot Kaynaklarının Etkisi	27
3.6.3. İyonların Etkisi.....	28
3.6.4. Fiziksel Faktörlerin Etkisi.....	29
3.7. Lipazların Kullanım Alanları.....	30
3.7.1. Yağ ve Oleokimya Endüstrisinde Lipazların Kullanımı	30
3.7.2. Biyolojik Olarak Bozunabilir Polimerlerin Üretiminde Lipazların Kullanımı.....	31
3.7.3. Tekstil Endüstrisinde Lipazların Kullanımı.....	31
3.7.4. Deterjan Endüstrisinde Lipazların Kullanımı	32
3.7.5. Gıda Endüstrisinde Lipazların Kullanımı.....	32
3.7.6. Rasemik Karışımların Ayrıştırılmasında Lipazların Kullanımı.....	33
3.7.7. Tanı Aracı Olarak Lipazların Kullanımı	34
3.7.8. Unlu Mamüller, Şekerleme ve Peynir Lezzetlendirmede Lipazların Kullanımı ...	34
3.7.9. Kozmetikte Lipazların Kullanımı.....	35
3.7.10. Medikal Uygulamalarda Lipazların Kullanımı.....	35
3.7.11. Biyosensör Olarak Lipazların Kullanımı.....	35
3.7.12. Deri Temizlemede (Yağ Alma) Lipazların Kullanımı	36
3.7.13. Atık / Atıksu / Kanalizasyon Arıtımında Lipazların Kullanımı.....	36
3.7.14. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Lipazların Kullanımı	37
3.7.15. Biodizel Üretiminde Lipazların Kullanımı.....	38
3.8. Mikrobiyal Enzim Üretimi.....	38
3.8.1. Mikroorganizma Seçimi	38
3.8.2. Enzim Üretimi İçin Ortam Gereksinimleri.....	39
3.8.2.1. Karbon Kaynağı	40
3.8.2.2. Azot Kaynağı	40
3.8.2.3. Enerji Kaynağı	41
3.8.2.4. Mineraller.....	41
3.8.2.5. Diğer Nütrientler	41

3.8.3. Fermantasyon Yöntemleri.....	42
3.8.3.1.Daldırmalı Fermantasyon	42
3.8.3.2.Katı Hal Fermantasyonu	43
3.8.5.3.Kesikli Kùltürlerde Mikrobiyal Büyüme.....	46
3.9. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	48
3.10. Biyoreaktörde Oksijen Transferi.....	49
4. MATERYAL VE METOD.....	52
4.1. Mikroorganizma Üretimi	52
4.2. Enzim Üretim Ortamı	53
4.3. Analitik Yöntemler.....	54
4.3.1. Mikroorganizma Derişimi Tayini.....	54
4.3.2. Lipaz Aktivite Tayini	54
4.3.3. Protein Derişimi Tayini	55
4.3.4. Glikoz Tayini	56
4.3.5. Yağ Asidi Analizi.....	56
4.3.5.1.Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması	57
4.3.5.2.Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi.....	57
4.4. Biyoreaktörde Sıvı Faz Hacimsel Kùtle Transfer Katsayısı ve Oksijen Birikim Hızının Hesaplanması.....	58
5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	60
5.1. Başlangıç pH' ının Etkisi.....	60
5.2. Karbon Kaynaklarının Etkisi	63
5.2.1. Glukoz Konsantrasyonunun Etkisi.....	64
5.2.2. Ayçiçeğı Yağı Konsantrasyonunun Etkisi.....	67
5.2.3. Soya Yağı Konsantrasyonunun Etkisi	70
5.2.4. Mısır Yağı Konsantrasyonunun Etkisi	73
5.2.5. Zeytinyağı Konsantrasyonunun Etkisi	76
5.2.6. Tribütirin Konsantrasyonunun Etkisi	78
5.3. Azot Kaynaklarının Etkisi	81
5.3.1. Maya Özüü Konsantrasyonunun Etkisi.....	82
5.3.2. Pepton Konsantrasyonunun Etkisi	85
5.3.3. Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi.....	87
5.3.4. Amonyum Dihidrojen Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi	90

5.4.	Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi.....	93
5.5.	İyonların Etkisi.....	95
5.5.1.	Ca ⁺⁺ İyonunun Etkisi.....	96
5.5.2.	Na ⁺ İyonunun Etkisi	98
5.6.	Atık Yağlar Kullanılarak Lipaz Üretimi.....	101
5.6.1.	Tatlı ve Patates Kızartılmış Atık Yağların Enzim Üretimi Üzerine Etkisi.....	102
5.7.	Katı Substrat Kullanılarak Lipaz Üretimi.....	107
5.7.1.	Ortam Seçimi	107
5.7.2.	Partikül Boyutunun Etkisi.....	108
5.7.3.	Azot Kaynağının Etkisi	109
5.7.4.	Ayçekirdeği Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi.....	111
5.7.5.	Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi.....	112
5.7.6.	Ca ⁺⁺ İlavesinin Etkisi.....	113
5.8.	Biyoreaktörde Lipaz Üretimi ve Oksijen Tüketim Hızı ve Sıvı Faz Hacimsel ... Kütle Transfer Katsayısının Belirlenmesi	115
5.8.1.	Karıştırma Hızının Enzim Üretimine Etkisi	115
5.8.1.1.	Oksijen Transfer Parametreleri	117
5.8.2.	Hava Akış Hızının Enzim Üretimine Etkisi	119
5.8.2.1.	Oksijen Transfer Parametreleri	121
5.9.	Lipaz Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi.....	123
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	125
7.	KAYNAKLAR	127
8.	EKLER	137
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Bu çalışmada, bir gram (-) bakteri olan *Pseudomonas fluorescens* kullanılarak kesikli fermantasyon ile hücre dışı lipaz enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve enzim üretimi üzerine ortam parametrelerinin etkisi incelenmiştir.

Araştırmanın ilk bölümünde; sentetik fermantasyon ortamında kullanılan karbon ve azot kaynakları ile iz elementler değiştirilmiş ve optimum enzim üretim ortamı belirlenmiştir. Fermantasyon ortamına eklenen farklı karbon kaynakları içerisinde en yüksek aktivite %1 mısır yağı konsantrasyonunda elde edilmiştir. Farklı azot kaynağı konsantrasyonlarında *P.fluorescens*, organik azot kaynaklarında hem daha iyi büyüme hem de daha yüksek aktivite göstermiştir. Azot kaynakları içerisinde en yüksek aktivite % 0.4 pepton içeren fermantasyon ortamında bulunmuştur. Daha sonra fermantasyon ortamında bulunan fosfat konsantrasyonu değiştirilmiş ve en yüksek aktivite % 0.1 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 içeren ortamda elde edilmiştir. İyonlarının etkisini incelemek için Ca^{2+} ve Na^+ iyonları kullanılmış ve % 0.03 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ içeren fermantasyon ortamında enzim aktivitesi yükselmiştir. Optimize edilen fermantasyon ortamında (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, % 0.1 KH_2PO_4 , % 0.1 K_2HPO_4 , % 0.0005 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, % 0.03 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en yüksek aktivite 3.425 U/mL olarak bulunmuştur.

Optimize edilen fermantasyon ortamında ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kullanılmadan); karbon kaynağı olarak atık kızartma yağların kullanıldığı ortamda, en yüksek enzim aktiviteleri patates ve tatlı kızartılmış atık yağlar için sırasıyla, 3.850 ve 3.975 U/mL olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, atık kızartma yağlarının enzim üretimi için daha etkin bir substrat olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca fermantasyon ortamında bulunan yağ asitleri analiz edilmiş ve yağ asitlerinin *P.fluorescens*'in kullanımı sonucu zamanla azaldığı gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde; karbon kaynağı olarak bir katı substrat olan ayçekirdeği küspesi kullanılmış ve *P.fluorescens*'in lipaz enzimi üretilebilirliği araştırılmıştır. Mikroorganizmanın fermantasyon ortamı; musluk suyu, % 10 ayçekirdeği küspesi ve % 1 pepton içerdiği zaman maksimum 6.100 U/mL lipaz enzimi ürettiği belirlenmiştir. Doğal bir substrat olan ayçekirdeği küspesi kullanıldığında enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür.

Çalışmanın son aşamasında, laboratuvar ölçekli 6 L hacmindeki biyoreaktör kullanılarak, farklı karıştırma ve hava akış hızlarında; enzim aktivitesi, sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayıları (k_{La}) ve oksijen tüketim hızları (r_o) hesaplanmış, en yüksek aktivite 0.32 vvm hava akış hızı ve 350 rpm karıştırma hızında, 2.350 U/mL olarak bulunmuştur. Bu ortamda en yüksek k_{La} ve r_o değerleri ise sırasıyla 0.0423 s^{-1} , 0.0273 mg/L/s olarak elde edilmiştir. Biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerde hava ve karıştırma hızları ile enzim miktarının arttığı, dolayısıyla da lipaz üretim prosesinde oksijen transferlerinin önemli olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *P.fluorescens*, daldırmalı fermantasyon, katı substrat, oksijen tüketim hızı, hacimsel kütle transfer katsayısı.

SUMMARY

Lipase Production by *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-2641)

In this study, the production of extracellular lipase by a gram (-) bacterium *Pseudomonas fluorescens* was studied in a batch system and the effects of system parameters on the production of lipase were investigated.

In the first stage of the research; carbon and nitrogen sources and phosphate concentration used in synthetic fermentation medium were changed and the composition of the optimum enzyme production medium was determined. The highest activity was obtained at concentration of 1 % corn oil used as carbon sources. *P. fluorescens* showed better growth and higher activity in organic nitrogen sources. The highest activity was obtained in the fermentation medium containing 4 % peptone. Then, KH_2PO_4 and K_2HPO_4 concentrations in the fermentation medium were changed and the highest activity was obtained at 0.1 % KH_2PO_4 and K_2HPO_4 . The effect of Ca^{2+} and Na^+ ions were investigated. The enzyme activity increased in the fermentation medium containing 0.03 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Maximum activity was determined as 3.425 U/mL in the optimized fermentation medium (corn oil 1 %, peptone 0.4 %, KH_2PO_4 0.1 %, K_2HPO_4 0.1 %, 0.0005 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ % 0.03).

Waste oils such as fried potato oil and fried sweet oil were also used as carbon sources. The highest enzyme activities were obtained as 3.850 and 3.975 U/mL, for fried potato oil and fried sweet oil, respectively. This result indicates that waste fried oils are more effective substrates for lipase production than synthetic fermentation medium. Fatty acids in fermentation medium were also analyzed and it was observed that, fatty oil acids were consumed by *P. fluorescens*.

In the second stage, sunflower seed meal was used as a solid state carbon source and lipase producibility of *P. fluorescens* was investigated. Maximum enzyme production (6.100 U/mL) was produced in the fermentation medium containing tap water, 10 % sunflower seed meal and 1 % peptone. The enzyme activity increased when sunflower seed meal was used as a natural substrate.

In the last stage; enzyme activity, liquid phase volumetric mass transfer coefficients (k_{LA}) and oxygen consumption rates (r_o) at the different mixing and air flow rates were determined in 6 L laboratory-scale bioreactor. The highest activity was obtained as 2.350 U/mL in agitation speed of 350 rpm and air flow rate of 0.32 vvm. In this medium, the highest values of k_{LA} and r_o were found as 0.0423 s^{-1} , 0.0273 mg/L/s, respectively. Enzyme production increased with increasing air flow and stirred rates and transfer of oxygen were therefore found to be an important parameter of lipase production.

Key words: Lipase, *P. fluorescens*, submerged fermentation, solid substrate, oxygen consumption rate, volumetric mass transfer coefficient.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyma modeli	7
Şekil 2.2.	Michaelis – Menten Eğrisi ve Lineweaver-Burk eğrisi	15
Şekil 3.1.	Lipazın üç boyutlu protein yapısı.....	17
Şekil 3.2.	Kesikli kültürde mikrobiyal büyüme eğrisi	46
Şekil 3.3.	Dinamik metoda göre çözünmüş oksijen konsantrasyonunun değişimi	50
Şekil 4.1.	6 L hacimli biyoreaktör	59
Şekil 5.1.	Farklı pH değerlerinde enzim aktivitesinin zamanla değişimi	61
Şekil 5.2.	Farklı pH değerlerinde elde edilen maksimum aktivite değerleri.....	61
Şekil 5.3.	Farklı başlangıç pH değerlerinde ortam pH'ının zamanla değişimi	62
Şekil 5.4.	Farklı pH değerlerinde mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi.....	62
Şekil 5.5.	Farklı pH değerlerinde toplam protein derişiminin zamanla değişimi.....	63
Şekil 5.6.	Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi.....	64
Şekil 5.7.	Farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	65
Şekil 5.8.	Farklı glikoz konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	66
Şekil 5.9.	Farklı konsantrasyonlarda glikoz içeren fermantasyon ortamlarında glikoz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	66
Şekil 5.10.	Farklı glikoz konsantrasyonlarında toplam protein derişiminin zamanla değişimi	67
Şekil 5.11.	Farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	68
Şekil 5.12.	Farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	68
Şekil 5.13.	Farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	69
Şekil 5.14.	Farklı konsantrasyonlarda ayçiçeği yağı içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi	70
Şekil 5.15.	Farklı soya yağı konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	71
Şekil 5.16.	Farklı soya yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	71

Şekil 5.17. Farklı soya yağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	72
Şekil 5.18. Farklı konsantrasyonlarda soya yağı içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	72
Şekil 5.19. Farklı mısır yağı konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	73
Şekil 5.20. Farklı mısır yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	74
Şekil 5.21. Farklı mısır yağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	74
Şekil 5.22. Farklı konsantrasyonlarda mısır yağı içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	75
Şekil 5.23. Farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	76
Şekil 5.24. Farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi.....	77
Şekil 5.25. Farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	77
Şekil 5.26. Farklı konsantrasyonlarda zeytinyağı içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	78
Şekil 5.27. Farklı tribütirin konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	79
Şekil 5.28. Farklı tribütirin konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	79
Şekil 5.29. Farklı tribütirin konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	80
Şekil 5.30. Farklı konsantrasyonlarda tribütirin içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	81
Şekil 5.31. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	82
Şekil 5.32. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi....	83
Şekil 5.33. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	83
Şekil 5.34. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	84
Şekil 5.35. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi....	85
Şekil 5.36. Farklı pepton konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	85
Şekil 5.37. Farklı pepton konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	86
Şekil 5.38. Farklı konsantrasyonlarda pepton içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	87

Şekil 5.39. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	88
Şekil 5.40. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	88
Şekil 5.41. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi.....	89
Şekil 5.42. Farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi	89
Şekil 5.43. Farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	90
Şekil 5.44. Farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	91
Şekil 5.45. Farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi.....	91
Şekil 5.46. Farklı konsantrasyonlarda amonyum dihidrojen fosfat içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi	92
Şekil 5.47. Farklı fosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi.....	93
Şekil 5.48. Farklı fosfat konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi	94
Şekil 5.49. Farklı fosfat konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	95
Şekil 5.50. Farklı konsantrasyonlarda fosfat içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	95
Şekil 5.51. Farklı Ca^{++} konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	96
Şekil 5.52. Farklı Ca^{++} konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi.....	97
Şekil 5.53. Farklı Ca^{++} konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	97
Şekil 5.54. Farklı konsantrasyonlarda Ca^{++} içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	98
Şekil 5.55. Farklı NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	99
Şekil 5.56. Farklı NaCl konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi.....	99
Şekil 5.57. Farklı NaCl konsantrasyonlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi.....	100
Şekil 5.58. Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren fermantasyon ortamlarında protein derişiminin zamanla değişimi.....	100
Şekil 5.59. %1 konsantrasyonunda atık kızartma yağları için enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	103
Şekil 5.60. %1 konsantrasyonunda atık kızartma yağları için ortam pH'larının zamanla değişimi	103

Şekil 5.61. %1 konsantrasyonunda atık kızartma yağı içeren fermantasyon ortamında mikroorganizma derişimlerinin zamanla değişimi	104
Şekil 5.62. %1 konsantrasyonunda atık kızartma yağı içeren fermantasyon ortamlarında protein derişimlerinin zamanla değişimi.....	105
Şekil 5.63. Farklı ortam bileşimlerinde enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi	108
Şekil 5.64. Farklı ayęeęirdeęi kúşpesi boyutlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi	109
Şekil 5.65. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi	110
Şekil 5.66. Farklı ayęeęirdeęi kúşpesi konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi	111
Şekil 5.67. Farklı fosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi	113
Şekil 5.68. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi	114
Şekil 5.69. Farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	116
Şekil 5.70. Farklı karıştırma hızlarında ortam pH'ının zamanla değişimi.....	116
Şekil 5.71. Farklı karıştırma hızlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi	117
Şekil 5.72. Farklı hava akış hızlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi	120
Şekil 5.73. Farklı hava akış hızlarında ortam pH'ının zamanla değişimi.....	120
Şekil 5.74. Farklı hava akış hızlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi	121
Şekil 5.75. Enzim aktivitesi úzerine pH'ın etkisi	124
Şekil 5.76. Enzim aktivitesi úzerine sıcaklığın etkisi.....	124
Ek Şekil 1.1. Yaş mikroorganizma kalibrasyon doğrusu	137
Ek Şekil 1.2. Yaş-kuru ağırlık kalibrasyon doğrusu	138
Ek Şekil 2.1. Protein kalibrasyon grafiği.....	139
Ek Şekil 3.1. Glikoz kalibrasyon grafiği	140
Ek Şekil 4.1. Tatlı kızartılmış yağ için 30. saatte alınan numunedeki gaz kromatogramı	141
Ek Şekil 4.2. Tatlı kızartılmış yağ için 96. saatte alınan numunedeki gaz kromatogramı	141
Ek Şekil 5.1. Çözünmüş oksijen derişiminin zamanla değişimi.....	142
Ek Şekil 5.2. Mikroorganizma oksijen tüketim hızı eğrisi.....	142
Ek Şekil 5.3. Sıvı faz hacimsel kútle aktarım katsayısının ($k_L a$) belirlenmesi	143

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	Enzimin holoenzim, apoenzim ve koenzim özellikleri.....	6
Tablo 2.2.	Enzimlerin sınıflandırılması.....	9
Tablo 3.1.	Sulu ve susuz çözeltilerde lipazların katalize ettiği reaksiyonlar.....	20
Tablo 3.2.	Lipaz aktivitesinin araştırılması ve ölçümünde kullanılan yöntemler.....	24
Tablo 3.3.	Lipaz üretimi için fermantasyon şartları.....	26
Tablo 3.4.	Daldırmalı ve katı hal fermantasyonu arasındaki farklar.....	46
Tablo 4.1.	<i>P. fluorescens</i> 'in üretiminde kullanılan zengin sıvı besiyerinin bileşimi.....	52
Tablo 4.2.	Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı	53
Tablo 5.1.	Farklı glikoz konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	67
Tablo 5.2.	Farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	70
Tablo 5.3.	Farklı soya yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	73
Tablo 5.4.	Farklı mısır yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	75
Tablo 5.5.	Farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	78
Tablo 5.6.	Farklı tribütirin konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	81
Tablo 5.7.	Farklı maya özütü konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	84
Tablo 5.8.	Farklı pepton konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	86
Tablo 5.9.	Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	90
Tablo 5.10.	Farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	92
Tablo 5.11.	Farklı fosfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi	94
Tablo 5.12.	Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde	

edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi.....	98
Tablo 5.13. Farklı NaCl konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi.....	101
Tablo 5.14. Mikrobiyal büyüme ve lipaz üretimi için substrat olarak kullanılan atık yağların yağ asiti bileşimi.....	101
Tablo 5.15. Atık patates ve tatlı kızartma yağı içeren ortamlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi.....	104
Tablo 5.16. Fermantasyon ortamında yağ asiti konsantrasyonlarının zamanla değişimi.....	106
Tablo 5.17. Farklı karıştırma hızlarında $k_L a$ ve r_o değerlerinin değişimi.....	118
Tablo 5.18. Farklı hava akış hızlarında $k_L a$ ve r_o değerlerinin değişimi	122

SİMGELER

- KH : Karıştırma hızı, rpm
- k_La : Hacimsel oksijen transfer katsayısı, s^{-1}
- r_o : Oksijen tüketim hızı, mg/L/s
- T : Sıcaklık, °C
- U : 1 dakikada zeytinyağından enzim tarafından açığa çıkarılmış yağ asitlerinin μmol miktarı (aktivite birimi)

1. GİRİŞ

Dünya genelinde çevre duyarlılığı ve buna bağlı olarak yasal yaptırımlar sürekli artmakta, insanoğlu daha temiz teknolojilere yönelmektedir. Çevreye zararlı atık miktarını azaltan veya yok eden teknolojilerle üretim yapan kuruluşların tasarımı ve geliştirilmesi sürdürülebilir kalkınmanın gereğidir. Gelişmiş ülkelerde kirliliğin azaltılmasında ve dünyadaki kaynakların yeniden kullanılabilir duruma getirilmesinde katalitik süreçlerin kullanılması çok yaygındır ve ekonomik açıdan önemlidir.

İnsanlar; küresel ısınma, ekosistemlerdeki türlerin yok olması, gıda yetersizliği, su ve diğer doğal kaynakların kıtlığı gibi önemli bir dizi sosyo-ekonomik ve çevresel değişiklikler ile karşı karşıyadır. Bunların tamamı insan kaynaklı sorunlardır ve yeni çözümler gerektirmektedir. Değerli doğal kaynaklar azalmaya devam ederken, tüketici ve kirleticiler miktarları büyümektedir. Geleceğin önemli bir sorunu da daha az tehlikeli, daha az kirleticiler ve daha az enerji gerektiren ürünlerin geliştirilmesidir. Bu konuda enzimler de toplumların geleceği üzerine önemli etkiler yapmaktadır.

Yaşayan bütün hücreler, kimyasal reaksiyonları kolaylaştırmak için protein formunda olan enzimlere, yani biyolojik katalizörlere ihtiyaç duyarlar (Ratledge ve Kristiansen, 2006). Enzimler canlı hücrelerde oluşmasına rağmen, çoğu hücrelerden ayrılabilir ve işlevlerini hücre dışında devam ettirebilirler. Enzimlerin bu özgün yeteneği onların endüstriyel ve gıda proseslerinde, biyolojik iyileştirmelerde ve tıpta kullanımının artmasını sağlamaktadır (Eisenberg, 2002). Nispeten ılımlı ve çevre dostu şartlar altında gerçekleşen enzim katalizli reaksiyonlar oldukça özgüdür ve katıldığı reaksiyonların hızlarını fazlasıyla artırır. Çoğu kimyasal prosesin aksine enzimler ham maddenin daha iyi kullanımını, su ve enerji tasarrufunu sağlamaktadır.

Enzim üretimi, çeşitli endüstriyel proseslerde doğal uygulamalar için beyaz biyoteknoloji olarak isimlendirilen sınıfta yer alır. Beyaz biyoteknoloji, kırmızı (medikal) ve yeşil (tarımsal) biyoteknoloji uygulamalarından farklıdır. Bu teknoloji hem çevre hem de ekonomide iyi imkanlar sağlar. Beyaz biyoteknolojinin enerji verimliliği yüksek, ham materyal tüketimi az, CO₂ emisyonları önemli derecede azaltılmış ve üretim maliyeti de genellikle düşüktür (Ratledge ve Kristiansen, 2006).

Endüstriyel enzimlerin yıllık pazarı 2000 yılında 1.6 milyar dolar olup, 2008 yılında 3 milyar dolara ulaşmıştır. Başlıca hidrolitik enzimler olan proteaz, karbohidraz ve lipazları içeren endüstriyel enzimlerin % 60'ı Avrupa'da üretilmektedir (Pandey vd., 2008). Bu enzimlerden lipazlar, gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden esterlerin hidroliz ve sentezini katalize eden hidrolazlardır. Lipazların önemi; kofaktöre ihtiyaç duymamaları, organik solventlerde aktif kalmaları, geniş bir aralıktaki substratlarla kullanılabilimleri ve yüksek enantiyo- ve regio- seçicilik göstermeleridir (Hernandez-Rodriguez vd., 2009).

Enzim teknolojisinin hızla gelişmesi ile lipazlar deterjan endüstrisi, yiyecek endüstrisi, kağıt imalat endüstrisi, biyosüpfaktant sentezi, kozmetiklerin ve farmakolojik ürünlerin organik sentezi gibi birçok yeni biyoteknolojik uygulamada kullanılmıştır (Sekhon vd., 2006). Lipazların ana ticari uygulaması, toplam lipaz satışının yaklaşık %32'sine karşılık gelen çamaşır deterjanlarında kullanılmasıdır (Esakiraj vd., 2010).

Lipazlar hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan üretilmesine rağmen, biyoteknolojik özellikleri için kullanılan lipazlar, büyük ölçüde bakteri ve funguslardan izole edilmektedir (Lin vd., 2006). Ticari olarak ilk başarılı lipaz enzimi, fungus *Humicola lanuginosa*'dan elde edilen "Lipolaz" ticari adı altında 1988 yılında Nova Nordisk tarafından üretilmiştir. 1995'de Genencor International firması *Pseudomonas mendocina*'dan "Lumafast" ve *Pseudomonas alcaligenes*'den "Lipomaks" olmak üzere iki bakteriyel lipaz üretmiştir. Günümüzde endüstriyel enzimlerin büyük bir kısmı Danimarka'da Novozymes, Amerika'da Genencor International, Hollanda'da DSM NV olmak üzere üç büyük firma tarafından üretilmektedir. Lipaz; Lipopan, Lipozyme, Novozyme, Patalase, Greasex, Lipolase ve Lipoprime gibi çeşitli markalar ile pazarlanmaktadır (Krastanov vd., 2008).

Bu çalışmanın amacı; *P. fluorescens* (NRRL B-2641) bakterisi kullanılarak daldırmalı kültürde optimize edilen şartlarda lipaz enziminin üretimini incelemek ve elde edilen verilere göre, karbon kaynağı olarak atık kızartma yağı ve bir katı substrat olan ay çekirdeği küspesi ile lipaz üretilebilirliğini araştırmaktır. Ayrıca enzim üretimi üzerine karıştırma hızı ve hava akış hızının etkisini belirlemek için, laboratuvar ölçekli biyoreaktör kullanılarak, oksijen tüketim hızları ve sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayılarının değişimini incelemektir.

2. ENZİMLER

2.1. Genel

Enzimler, bütün canlı organizmalar tarafından üretilen; bitki, hayvan, insan ve mikroorganizmalarda normalde çok yavaş ilerleyen biyokimyasal süreçlerin reaksiyon hızını arttırmada etkin katalizörler olarak rol alan doğal protein molekülleridir. Canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentezlenmektedir. Ayrıca enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmemektedir.

Biyoteknolojinin gelişimine paralel olarak önem kazanmış olan mikrobiyal enzimler tıpta, bira ve ekmek sanayinde, dekstroz üretiminde, meyve sularının berraklaştırılmasında, tekstil endüstrisinde, diş macunu ve deterjana katılarak kullanılmaktadır. 19. yüzyıla kadar sütün ekşimesi, şekerin alkole fermantasyonu gibi reaksiyonların sadece canlı organizmalar tarafından meydana getirilebileceğine inanılırdı (Kalaycıoğlu vd., 2000). Enzim alanında yapılan ilk çalışmalar sindirim enzimleri ile ilgili olup, 1760 ile 1825 yılları arasına rastlamaktadır. 1825 yılında Berzelius, buğdaygillerden elde edilen enzim karışımının, nişastayı sülfürik asitten daha hızlı parçaladığını, canlı organizmadaki bütün maddelerin, katalizörlerin etkisi altında sentezlendiğini ve biyolojik reaksiyonları kimyasal reaksiyonlar arasına katması, enzimler üzerindeki sistematik çalışmaların başlangıcı olmuştur (Gözükara, 2001).

1833 yılında şekeri parçalayan aktif etken, kısmen izole edilmiş ve bugün amilaz olarak isimlendirilen bu enzime diastaz ismi verilmiştir. Bundan kısa bir süre sonra mide suyundan proteinleri sindiren bir madde elde edilmiş ve bu madde pepsin olarak isimlendirilmiştir. Bu tip aktif preparatlara genel bir isim olarak “ferment” denilmiştir. Liebig, bu fermentlerin canlı organizmalardan elde edilen cansız materyaller olabileceğini ileri sürerken, Pastör ve arkadaşları halen fermentlerin canlı organizma ihtiva etmeleri gerektiğini savunmuştur. Bu sırada ferment terimi yerini tedrici olarak enzime bırakmaya başlamıştır. İlk olarak 1878 yılında Kühne tarafından teklif edilen enzim kelimesi Yunanca’da “maya içinde” anlamına gelmektedir. 1897 yılında Büchner şekerin fermantasyonunun canlı hücre ihtiva etmeyen maya hücreleri ekstraktı ile meydana geldiğini göstermiştir (Kalaycıoğlu vd., 2000).

1904 yılında Harden ve Young düşük moleköl ağırlığına sahip, ısıya dayanıklı bir moleköl olan ve o zamanlar kozimaz adı verilen Koenzim I veya diğeri adı ile nikotinamid adenin dinökleotiti (NAD^+) fermantasyon enzimlerinin aktivite gösterebilmeleri için gerekli bir faktör olarak keşfetmişlerdir. Enzimoloji tarihinde böylece ilk koenzim de keşfedilmiştir (Gözükara, 2001). 1926 yılında Sumner dokuz yıllık bir çalışma sonunda soya fasulyesi ekstraktından üreazı izole etmiştir. Sumner'ın çalışmaları devam ederken, J. Northrop ve W. M. Stanley'de ayrı ayrı enzimler konusunda çalışmalar yapmışlar ve birçok enzimi izole etmişlerdir. Son elli yıl içinde 2500 kadar enzim, çeşitli organizmalardan izole edilmiş ve çoğu kristalize edilmiştir (Kalaycıoğlu vd., 2000).

II. Dünya Savaşından sonra enzim teknolojisinde hızlı bir gelişme başlamıştır. Bu gelişmede; metabolik işlemlerin araştırılması sırasında çok sayıda yeni enzimin keşfedilmesi, enzim özellikleri hakkında artan bilgi ve bunun sonucu endüstriyel katalistler olarak enzimlerden yararlanma potansiyelinin araştırılması, mikroorganizmalardan endüstriyel tüm enzimlerin elde edilebileceği bulgusu ve fermantasyon teknolojisindeki gelişmeler etkili olmuştur (Reed, 1981).

Bugün birçok enzim (ve özellikle yakın gelecekte), biyolojik esaslı materyallerin fermantasyonu ile üretilmektedir (Hasan, vd., 2006). Günümüzde yaklaşık 4000 enzim bilinmektedir ve bunları yaklaşık 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır. Dünyadaki enzim talebi, 12 temel üretici ve 400 küçük tedarikçi tarafından karşılanmaktadır. Endüstriyel enzimlerin toplam miktarının yaklaşık % 60'ı Avrupa'da üretilmektedir. Tüm endüstriyel enzimlerin % 75'i hidrolitiktir (Sharma vd., 2001). Ticari olarak kullanılan bu enzimlerin % 58'ini proteazlar, % 28'ini karbohidrazlar, % 3'ünü lipazlar ve % 10'unu ise diğeri enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren α -amilaz üretimi, % 13 ile önemli bir yer tutmaktadır. Mikrobiyal enzimler çeşitli bakteri, maya ve küflerden uygun yöntemlerle ekonomik olarak endüstriyel boyutlarda üretilmektedir. Mikroorganizmaların ürettiği enzimler, teknik ve ekonomik yönden hayvansal ve bitkisel hücrelerden elde edilen enzimlerden daha avantajlıdır. Çünkü hayvansal ve bitkisel kaynaklı dokulardan, enzim eldesi oldukça uzun bir süre ve maliyet gerektirdiği halde, mikrobiyal enzimler daha kısa süre ve maliyette elde edilmektedir (Elibol vd., 2008).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır (Kıran vd., 2006).

2.2. Enzimlerin Kimyasal Yapısı

Enzimler, canlı bir hücre tarafından üretilen protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Teorik olarak, bir katalizör tepkimede bulunan maddenin sınırsız miktarını değiştirebilir. Bütün katalizörler gibi enzimler de kimyasal reaksiyonların hızını etkiler, ancak meydana gelen kimyasal değişimlerin derecesini etkilemez. Enzimler, sadece termodinamik olarak mümkün olan reaksiyonları katalize ederken, tepkimelerin serbest enerji değişimini ya da denge sabitini etkilemezler. Bir enzim, reaksiyon için gerekli olan aktivasyon enerjisinin miktarını düşürür. Bu yüzden, enzim yokluğunda yüksek sıcaklık veya başka bir yüksek enerji kaynağı gibi zor şartları gerektiren reaksiyonları, enzimler oda ısısına yakın ılımlı şartlar altında gerçekleştirebilirler.

Birçok bakımdan enzimler diğer katalizörlerden farklılık göstermektedir. Protein oldukları için enzimler, uygun olmayan fizyolojik koşullara maruz kaldığında (ısı veya güçlü kimyasallar gibi) doğal özelliklerinden uzaklaşarak denatüre olup etkisiz hale gelmektedir. Bu nedenle enzimlerin iki belirgin özelliği; kendi termal eğilimleri ve asit ve bazlara karşı olan duyarlılıkları olmasına rağmen, enzimlerin en önemli farkı kendi hareket özgüllükleridir. Örneğin, asitler gibi kimyasal hidrolitik katalizörler; esterler, asetallar, glikosidler (şekerler) veya peptidleri (proteinler) içeren birçok farklı maddenin hidrolizini katalize ederken, bu birleşiklerin tiplerinin her birini ve hatta her sınıfın özgül üyelerinin hidrolize olması için özgül farklı enzimler gerekir. Bu yüzden sakkarozu hidrolize eden enzim olan sükrasin, laktoz ya da maltoz ve diğerleri üzerinde hiçbir etkisi yoktur.

Enzimlerde substrat özgüllüğü ve reaksiyon özgüllüğü gibi iki tip özellik göze çarpmaktadır. Substrat özgüllüğü için sükrasin ile sakkarozun hidrolizi ve glukoz oksidaz ile glukozun oksidasyonu örnek olarak verilebilir. Reaksiyon özgüllüğü için proteinlerin partiküler peptid bağlantılarını ayrıştırabilen proteinazların davranışı örnek olarak gösterilebilir (Miller ve Litsky, 1976).

Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından meydana gelen yan gruplarına “kofaktör” adı verilmektedir. Enzimlerin aktivite göstermek için ihtiyaç duyduğu kompleks organik moleküllere ise “koenzim” adı verilmektedir. Koenzimlerin yapısında genellikle vitaminler bulunmaktadır. Koenzimler, özgül atomların veya fonksiyonel grupların transfer edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bazı hallerde enzim, aktivite göstermek için hem kofaktöre hem de

koenzime ihtiyaç duymaktadır. Kofaktörler genellikle ısıya dayanıklıdır. Kofaktörler ve koenzimler enzime gevşek veya sıkı bağlıdır.

Enzim, koenzimi veya kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif durumda ise enzimin bu haline “holoenzim” adı verilmektedir. Koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelirse enzimin proteinden meydana gelen bu inaktif haline de “apoenzim” adı verilmektedir (holoenzim→ apoenzim+koenzim) (Gözükara, 2001). Tablo 2.1.’de holoenzim, apoenzim ve koenzimin özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Enzimin holoenzim, apoenzim ve koenzimin özellikleri (Gözükara, 2001).

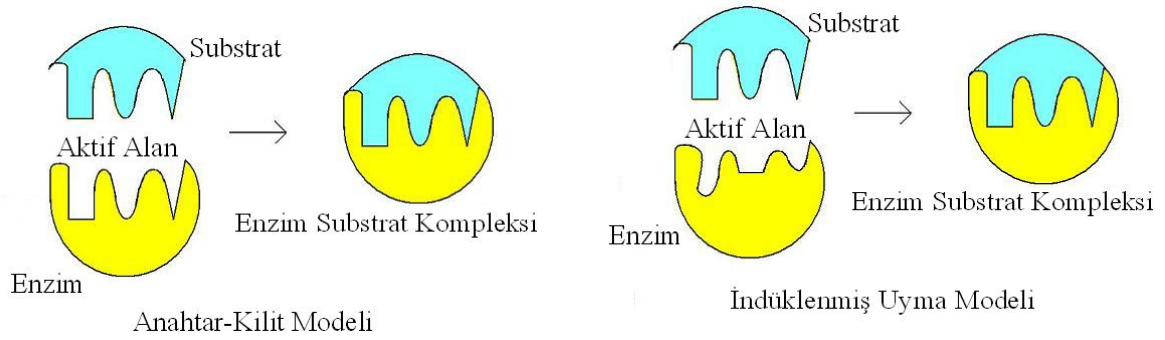
	Holoenzim	Apoenzim	Koenzim
Dializ	Enzim aktivitesini kaybeder	Diyaliz edilemez, yarı geçirgen zardan geçmez	Diyaliz edilir, yarı geçirgen zardan geçer
Isı	Enzim aktivitesi kaybolur	Isıya dayanıksız	Isıya dayanıklı
Enzim Aktivitesi	Var	Yok	Yok
Kimyasal Yapı	Konjuge protein	Protein	Protein olmayan organik bileşik
Moleküler Ağırlık	Yüksek	Yüksek	Düşük
Rolü	Enzim aktivitesi	Substrat özgüllüğü	Reaksiyon özgüllüğü

2.3. Enzimlerin Aktif Merkezi

Enzimlerde substratın ve koenzimlerin bağlanarak biyokimyasal reaksiyonların meydana geldiği yerler “aktif merkez” lerdir. Bunlar amino asit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometrisi olan yerlerdir. Aktif merkez, büyük enzim molekülünün sadece küçük bir kısmını kaplar. Enzim molekülünün büyük olması, aktif merkezin geometrik yapısının oluşması için gereklidir. Aktif merkezlerin gösterilişi, en az üç bağlama yeri olan girinti ve/veya çıkıntı şeklinde olabilir (Tüzün, 1997).

Substrat, enzim üzerindeki aktif merkeze bağlanarak, enzim-substrat kompleksi oluşmaktadır. Bu komplekslerin meydana geldiği; kinetik analizler, X-ışınları kristalografisi ve inhibisyon çalışmaları ile kanıtlanmıştır.

Enzimin aktif merkezde substrata bağlanması hakkında iki hipotez mevcuttur. Birinci model, 1894'te Fischer tarafından ileri sürülen anahtar-kilit modelidir. Bu modele göre enzimler hangi tepkimeyi katalizledikleri ve bu tepkimeye hangi substratın girdiğine çok büyük bir özgüllük gösterirler. Bunun nedeni ise enzim ve substratının birbirine tam uyan tamamlayıcı geometrik şekilleri olmasından kaynaklanmaktadır. 1958'de Koshland, anahtar ve kilit modelinin bir modifikasyonu olan indüklenmiş uyuma modelini öne sürmüştür. Bu modele göre; aktif merkez esnek bir durum göstermekte, ancak substrat, enzim yüzeyine bağlanınca belirli bir şekil almaktadır. Bu modellerden anahtar ve kilit modeli artık yetersiz sayılmaktadır. İndüklenmiş uyum modeli halen en yaygın kabul gören enzim-substrat-koenzim şeklidir (Kalaycıoğlu vd., 2000). Şekil 2.1.'de anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyuma modeli şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyuma modeli (Kalaycıoğlu, 2000).

2.4. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Enzimler önceleri genellikle “az” eki ile biten (katalaz gibi) isimlerle ve bazı proteolitik enzimlerde “in” eki ile biten (tripsin gibi) isimlerle adlandırılmıştır. Katalize ettikleri reaksiyonu (transkarboksilaz gibi) veya etki ettikleri substratı (üreaz gibi) belirleyici olabilen isimlendirme şekli, aynı özelliklerde çok sayıda enzimin izole edilmesi ile yetersiz kalmıştır.

1964 yılında, Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) Enzim Komitesi (EC) sistematik bir isimlendirme ve sınıflandırma yapmıştır. 1972 ve 1978 yıllarında yapılan düzenlemelerle enzimlere kod numaraları verilmiş ve enzimler 6 ana gruba ayrılmıştır (Tablo 2.2.). Enzim kod numaraları noktalarla ayrılmış 4 rakamdan ibaret olup; ilk rakam enzimin 6 ana enzim

grubundan hangisine girdiğini, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam akseptörü, dördüncü rakam ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını göstermektedir (Kalaycıoğlu vd., 2000).

Sistematik adlandırmaya örnek olarak ATP-kreatin fosfotransferaz (EC 2.7.3.2) verilebilir. Burada EC harfleri enzim komisyonunu ifade eder. Enzimin adı, ATP ile kreatin arasında fosfat transferi yapan bir enzimi belirtir. Numaralandırmada yer alan ilk sayı (2) enzim sınıfını (transferaz), ikinci sayı (7) alt sınıfı (fosfat), üçüncü sayı (3) alıcı grubun azotlu olduğunu, dördüncü sayı (2) enzime ait bir seri numarasını gösterir (Pamuk, 2000). Sistematik isimler çok uzun olduğundan çoğu kez geleneksel isimler tercih edilmektedir.

2.5. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimlerin etkinliğini (aktivitesini) yani enzimle katalize edilen reaksiyonların hızını etkileyen pek çok faktör vardır. Bu faktörler; pH, sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, reaksiyon ürünleri, inhibitörler ve aktivatörler olarak sıralanmaktadır.

2.5.1. pH

Enzimlerin faaliyet gösterdiği sistemin pH'ının enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Enzimler; asidik, bazik veya nötral gruplar içeren aminoasitlerden oluşurlar. Bu gruplar çoğu kez enzimin aktif konumunun önemli bir parçasıdır ve katalitik aktivite için belli bir iyonlaşma durumunda olmaları gereklidir. Bu nedenle, her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir pH değeri vardır ve bu pH değerine enzimin optimum pH değeri denir. Bazı enzimler için optimum pH oldukça keskin, bazı enzimler oldukça geniş bir optimum pH aralığı gösterebilir. Enzim-substrat sisteminin pH'ı değiştiği zaman, enzim aktivitesi, enzim tamamen inaktif oluncaya kadar optimum pH aralığının her iki tarafında oldukça hızlı bir şekilde azalmaktadır. Genellikle pH'ın optimuma doğru değişimi enzimi yeniden harekete geçirmektedir. Ancak, geçici inaktivite seviyelerinin altında veya üstünde tutulan pH değerleri enzimin giderek denatüre olmasına ve sürekli inaktif hale gelmesine neden olmaktadır. En iyi enzim stabilitesi için pH aralığının

optimum aktivite için seçilen pH ile aynı olması gerekmemektedir. Asit ve alkali ortam enzimatik reaksiyonun hızını etkilediğinden enzim analizlerinde tampon çözeltiler ile stabil ve uygun bir pH temin edilmektedir (Miller ve Litsky, 1976).

Tablo 2.2. Enzimlerin sınıflandırılması (Telefoncu, 1986).

EC 1 oksidoredüktazlar	redox reaksiyonlarını katalizlerler, örneğin; dehidrogenaz, oksidaz $(AH + B \rightarrow A + BH \text{ (redüksiyon)}) \quad A + O \rightarrow AO \text{ (oksidasyon)}$
1.1.	CH – OH grubuna etkileyenler
1.2.	C – O grubuna etkileyenler
1.3.	C – CH grubuna etkileyenler
1.4.	CH – NH ₂ grubuna etkileyenler
1.5.	CH – NH grubuna etkileyenler
EC 2 transferazlar	fonksiyonel grupların transferinden görev alırlar örneğin; transaminaz, kinaz $AB + C \rightarrow A + BC$
2.1.	C ₁ ⁻ gruplarını transfer edenler
2.2.	karbonil gruplarını transfer edenler
2.3.	açıl gruplarını transfer edenler
2.4.	glukozil gruplarını transfer edenler
2.5.	N ⁻ içeren grupları transfer edenler
2.6.	fosfat gruplarını transfer edenler
2.7.	S ⁻ içeren grupları transfer edenler
EC 3 hidrolazlar	hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler örneğin; lipaz, amilaz, peptidaz $AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$
3.1.	esterleri hidrolizleyenler
3.2.	glukozid bağlarını hidrolizleyenler
3.3.	peptid bağlarını hidrolizleyenler
3.4.	diğer C – N bağlarını hidrolizleyenler
3.5.	asit anhidritlerini hidrolizleyenler
EC 4 liyazlar	çift bağa katılma ve çift bağ oluşturma reaksiyonları katalizlerler örneğin; dekarboksilaz $RCOCOOH \rightarrow RCOH + CO_2 \text{ or } [x-A-B-Y] \rightarrow [A=B + X-Y]$
4.1.	C – C liyazlar
4.2.	C – O liyazlar
4.3.	C – N liyazlar
EC 5 izomerazlar	izomerleşme reaksiyonlarını katalizlerler örneğin; izomeraz, mutaz $AB \rightarrow BA$
5.1.	resamezlar
5.2.	intramoleküler oksidoredüktazlar
5.3.	intramoleküler transferazlar
EC 6 ligazlar	sentez reaksiyonlarını katalizlerler $X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + Pi$ örneğin; sentetaz
6.1.	C – O bağını oluşturanlar
6.2.	C – S bağını oluşturanlar
6.3.	C – N bağını oluşturanlar
6.4.	C – C bağını oluşturanlar

2.5.2. Sıcaklık

Sıcaklık, enzimlerin hem hızını hem de stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Enzimler, sıcaklıktan iki şekilde etkilenmektedir. Birinci etki inaktivasyondur. Yüksek sıcaklıklar, enzim proteininin doğal yapısının bozularak denatüre olmasına neden olmaktadır. Bu da katalitik özelliklerin azalmasına yol açmaktadır. Birçok enzim için termal inaktivasyon 50 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda hızlıyken, bazı enzimler ise yüksek sıcaklıklara daha dayanıklıdır. Enzimatik reaksiyonlarda sıcaklığın ikinci etkisi enzimlerin hızları üzerinedir. Çoğu kimyasal reaksiyonda olduğu gibi ısıyı yükseltmek enzim katalizli reaksiyonların hızını artırır. Kabaca sıcaklığın her 10 °C artışında çoğu kimyasal reaksiyonun hızı yaklaşık iki kat artar. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa da optimum sıcaklık denir. Ancak sıcaklık, enzimin kararlı ve tam olarak aktif olduğu değere kadar yükseltilmelidir. Enzim aktivitesi, belirli bir optimum sıcaklığa kadar artmaktadır. Belirli bir sıcaklıktan sonra enzimler, yapısal değişmeye ve denatüre olmaya başlamakta ve bunun sonucu olarakta enzim aktivitesi azalmaktadır (Miller ve Litsky, 1976).

2.5.3. Zaman

Enzim reaksiyonlarının başlangıç hızları genellikle çok hızlıdır ve reaksiyon ilerledikçe hız azalır. Reaksiyon hızının azalmasının en önemli nedenleri, substratın tükenmesi ve oluşan son ürünlerle reaksiyonun engellenmesidir. Birçok enzim kullanımları için, reaksiyonun tamamlanması gerekli olmayabilir hatta istenmeyebilir. Örneğin α -amilaz ile yoğun nişasta macununun sıvılaşması ve yapışkanlığının azalması için birkaç dakika yeterlidir. Bununla birlikte reaksiyonun tamamlanmasının istendiği durumlarda enzim reaksiyonlarının tamamlanması için birkaç saat hatta günler gerekebilir (Miller ve Litsky, 1976).

2.5.4. Enzim Konsantrasyonu

Bir enzimatik reaksiyonda ortamda fazla miktarda substrat bulunması halinde reaksiyonun hızı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar. Yani enzim ne

kadar fazla ise reaksiyon hızı da o kadar yüksek olur. Bunun nedeni her enzim molekülünün diğerlerinden bağımsız olarak çalışmasıdır (Atasagünil, 1965).

2.5.5. Substrat Konsantrasyonu

Ortamda bulunan enzim konsantrasyonunun sabit kalması ve diğer koşulların değişmemesi halinde, substrat konsantrasyonunun artırılması enzimatik reaksiyonun hızında değişikliklere neden olur. Substrat miktarının artırılması ile reaksiyon hızında önce hızlı bir artış görülür, fakat substrat ilavesine devam edildikçe bu hızlı artış gittikçe yavaşlayarak sonuçta belirli bir düzeyde sabit kalır. Bu olay ortamda bulunan enzim moleküllerinin düşük substrat konsantrasyonunda tam olarak substratla birleşmesinden ve enzim molekülleri yüzeyinde birçok aktif yerin boş kalmasından kaynaklanmaktadır. Yüksek konsantrasyonda substratın ilavesi ise bütün boş yerlerin substratla dolması ile yani enzimin tam kapasite ile çalışması sonucu, enzim reaksiyon hızına artık katkıda bulunamamaktadır. Bu suretle bir enzimatik reaksiyonda substrat miktarının artırılması ile değişik reaksiyon basamakları meydana gelmektedir (Gözükara, 2001).

2.5.6. Reaksiyon Ürünleri

Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin ortamda çoğalması, reaksiyonun hızını azaltır. Enzimatik reaksiyonlar tersinir olduğundan reaksiyon sonucu oluşan ürünler hızlı bir şekilde ortadan kalktığı takdirde reaksiyon tek taraflıdır. Aksi halde ürünler ortamda birikince reaksiyon hızı azalır ve reaksiyon ters yönde devam edebilir. Bu olayın bir diğer sebebi ise reaksiyon ürünlerinin yapı bakımından substrata benzemeleri ve enzimler ile substrat gibi birleşerek enzimleri inhibe etmeleridir (Atasagünil, 1965).

2.5.7. Aktivatörler ve İnhibitörler

Bazı enzimler aktivitelerini artırmak için aktivatör adı verilen iyonlar veya küçük moleküllere ihtiyaç duymaktadırlar. Aktivatörler genellikle metal iyonlarıdır. Aktivatörlerin bir kısmı yalnızca substratla, diğer kısmı ise enzimle birleşerek aktivatör rolü oynamaktadır. Bazı enzimlerin aktivitesi tuzların varlığı veya yokluğundan ileri

derecede etkilenir. Örneğin, klorür iyonu hayvansal α -amilazın doğal aktivitesini 2 kat artırmaktadır ve sodyum klorürün varlığı, pankreantinde amilazın iyi aktivitesi göstermesi için zorunludur. Bir veya daha fazla enzimi aktivite edici 15 farklı metal katyon bulunmuştur. Bu metal iyonları Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} , Cr^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Ni^{++} ve Al^{++} 'dur.

Enzim inhibisyonuna neden olan maddeler enzimatik katalizleri azaltan veya engelleyen maddelerdir. Pratik uygulamalarda engelleyicilerin varlığı çoğunlukla istenmeyen bir durumdur. Bazen enzimatik reaksiyonları durdurmada, kontrol etmede veya yavaşlatmada faydalıdır. Bu maddeler, istenmeyen enzim aktivitesinin önlenmesi veya kontrol altında tutulmasında aracı olarak kullanılmaktadırlar. Özgül olan ve özgül olmayan, tersinir ve tersinmez enzim inhibitörlerinin birçok örneği vardır. Örneğin bazı ağır metal iyonları enzimin yapısının bozulmasına ya da denatürasyon sonucu tersine dönüşemez bir inhibisyona neden olmaktadır (Miller ve Litsky, 1976).

2.6. Enzim Kaynakları

Ticari öneme sahip enzimlerin çoğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Miller, 1976).

Endüstriyel enzimler bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan üretilmesine rağmen, bitki ve hayvanlardan enzim üretimi bazı nedenlerden dolayı kısıtlıdır. Bitki yetiştirilmesi iklimin uygun olduğu alanlarla sınırlıdır. Genel olarak mevsimseldir ve bu sabit enzim üretimini engeller. Bitki dokularındaki enzimlerin konsantrasyonu genelde düşük olduğundan bitki materyalinin büyük miktarlarda işlenmesi gerekmektedir. Örneğin, bir ağaçtan papatya lateks enzimi üretimi için yıllık verim 0.45 kg'dır. Diğer taraftan, hayvan orijinli enzimler de et endüstrinin yan ürünleridir ve bu nedenle temin edilmesi sınırlıdır (Reed, 1981).

Mikrobiyal enzimler, sınırsız bir kaynak olması, elde edilen katalitik aktivite çeşitliliği, yüksek verim, genetik değişikliğin kolaylığı, mevsimsel değişimlerin olmaması, düzenli kullanım ve pahalı olmayan ortamlarda mikroorganizmaların hızlı büyümesi, katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi sebeplerle bitki veya hayvanlardan elde edilen enzimlere göre kullanımı daha fazla tercih edilmektedir. Mikrobiyal enzimler, karşılık gelen bitki ve hayvan enzimlerinden daha stabil olup, üretimi daha elverişli ve

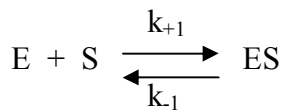
emniyetlidir. Bununla birlikte dünyadaki mikroorganizmaların sadece % 2'si enzim kaynağı olarak test edilmiştir. Bakteriyel türler, mayalarla karşılaştırıldığında daha yüksek aktiviteler sağladığından enzim üretiminde daha fazla tercih edilirler ve doğal ve alkali pH'ya sahiptirler ve genellikle termostabil enzim üretirler (Hasan 2006; Miller, 1976; Wiseman, 1987).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimleri üreten mikroorganizmalar, yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim, mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin üretiminde mikroorganizma kullanımı artmıştır. Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır. Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır. Buralarda yaşayan termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden elde edilen enzimler, ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kıran vd; 2006).

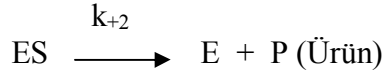
2.7. Enzim Kinetiği

Enzimatik reaksiyonlar için kinetik modeller 1903'de Henri ve 1913'de Michaelis ve Menten tarafından geliştirilmiştir. 1925 yılında Michaelis ve Menten denklemi Briggs ve Haldane tarafından modifiye edilmiştir.

Her enzimatik reaksiyon substratın enzime bağlanmasıyla başlar. Michaelis ve Menten varsayımına göre enzim (E) ile substratı (S) arasında ara ürün olarak en basit halde enzim-substrat kompleksi (ES) oluşmaktadır.



Gerçek enzimatik dönüşüm aktif ara kompleksin parçalanmasıyla ortaya çıkar.



Burada; k_{+1} , k_{-1} ve k_{+2} ileri ve geri reaksiyonların hız sabitleridir.

Bu adım, ürün oluşumunu doğrudan etkilediğinden aynı zamanda hız belirleyici adımdır ve reaksiyon hızı şu ifade ile verilebilir:

$$V = k_{+2} (ES) \quad (2.1)$$

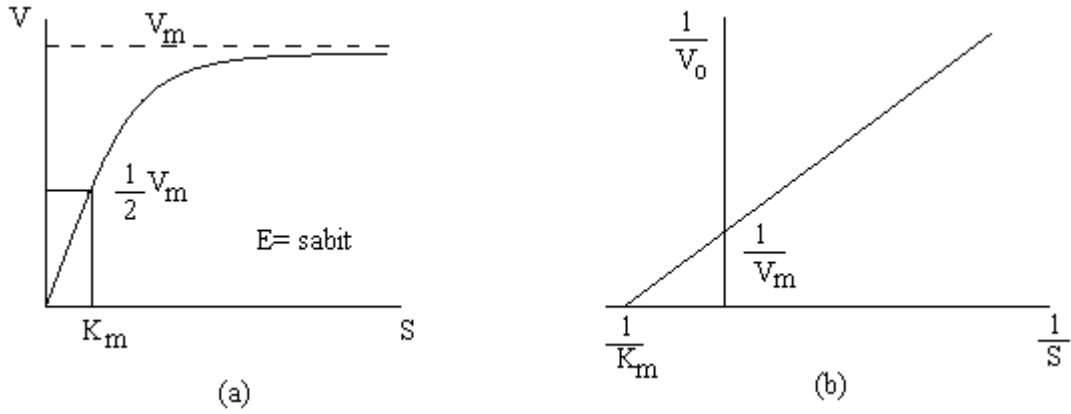
Eşitlik (2.1)'de görüldüğü gibi reaksiyon hızı, ES konsantrasyonu ile orantılıdır. Enzim konsantrasyonu sabit tutulup, substrat konsantrasyonu sürekli artırılırsa enzimin substrata doyduğu, yani ortamdaki enzim moleküllerinin pratikçe tamamının substrat ile kompleks oluşturduğu değere ulaşır. Böylece reaksiyon hızı maksimum değerine (V_m) ulaşır (Şekil (2.2.)). Eşitlik (2.1)'de, (ES) yerine sürekli haller kuralına göre V_m , (S) ve K_m cinsinden değeri yazılırsa reaksiyon hızı için Michaelis ve Menten eşitliği olarak bilinen denklem bulunur.

$$V = \frac{V_m (S)}{K_m + (S)} \quad (2.2)$$

Burada;

- V : Reaksiyon hızı
- V_m : Reaksiyonun maksimum hızı ($k_{+2} (E_o)$)
- E_o : Başlangıçtaki enzim konsantrasyonu
- (S) : Başlangıçtaki substrat konsantrasyonu
- K_m : Michaelis sabiti' dir.

Michaelis sabiti (K_m), enzimatik reaksiyon hızının maksimum hızın yarısına ulaştığı andaki substrat konsantrasyonudur. Bu sabit enzimin substrata ilgisinin ölçüsüdür ve bu ilgi K_m ile ters orantılıdır.



Şekil 2.2. (a) Michaelis – Menten Eğrisi ve (b) Lineweaver-Burk eğrisi (Tüzün,1997).

Michaelis-Menten denklemi, hiperbolik bir eğrinin denklemi olduğundan ve hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarının belirlenmesinin zorluğu nedeniyle, bir enzime ait V_m ve K_m 'yi deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan başka denklemler de önerilmiştir. Bunlardan Michaelis-Menten denklemini tersine çevirip çarpanlarına ayırmakla elde edilen Lineweaver-Burk denklemi (Eşitlik 2.3), en sık kullanılanıdır (Tüzün,1997). Şekil 2.2'de Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri verilmiştir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \quad (2.3)$$

3. LİPAZ ENZİMİ

3.1. Genel

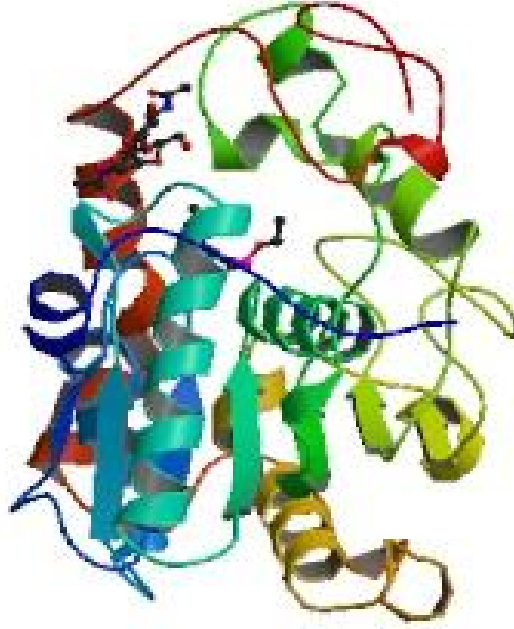
Lipazlar (trیاçilgliserol açilhidrolazlar, EC 3.1.1.3), su ve yağ ara fazında uzun zincirli yağ asitlerinin (trیاçilgliseroller); diaçilgliserol, monoaçilgliserol, yağ asitleri ve gliserole hidrolizini katalize eden enzimlerdir (Sharma, 2001; Fang, 2009). Lipazlar, gliserol ve yağ asitlerinden açilgliserollerin oluşumunu da katalizlediği için bu reaksiyonlar tersinirdir (Ellaiah, 2004). Açık bir ayırım olmamasına rağmen esterazlar, çözünebilir esterler için özgül olan karboksilik ester hidrolazlar iken, lipazlar sadece yağ-su arafazında ester bağlarını hidrolize eden ve çözünmez yağ asidi esterleri ile daha fazla aktif olan karboksilik ester hidrolazlardır (Schuepp, 1997). Esterazların aksine lipazlar, sadece yağ-su arafazına karboksilik ester adsorplandığı zaman aktivite gösterebilirler (Silva vd., 2005). Bu olay arayüzey aktivasyonu olarak adlandırılır (Rotticci, 2000). Esterazlar kısa zincirli açil gruplara (C₈) sahip suda çözülebilir yağ asidi esterlerinin ester bağlarını hidrolize ederken, lipazlar uzun zincirli açil grupları (C₁₀) hidrolize ederler (Kambiranda vd., 2009).

Lipazların varlığı *B. prodigiosus*, *B. pyocyaneus* ve *B. fluorescens* mikroorganizmaları kullanarak, 1901 yılında incelenmiş ve bu mikroorganizmalar günümüzde sırasıyla *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak adlandırılmışlardır. 300 yıldan fazla trigliseridleri hidrolize eden enzimler ile ilgili çalışılmış olup, lipazların hidroliz olayını katalize etmek için uygunluğu ve ayrıca esterlerin sentezi yaklaşık 70 yıl önce anlaşılabilmektedir.

İlk defa 1856'da Claude Bernard, çözünmemiş yağ damlacıklarını hidrolize eden ve onları çözünmüş ürünlere dönüştüren enzim olarak pankreas öz suyundan lipazı keşfetmiştir (Hasan, 2006).

Lipazlar, üç boyutlu yapı göstermektedir (Şekil 3.1.). Bir protein molekülünün üç boyutlu yapısı, yerel olmayan etkileşimler ile (yani iyonik (tuz) bağlar, hidrojen bağları, disülfid bağları) stabilize olmaktadır. Tüm kaynaklardan elde edilen lipazların üç boyutlu yapıları hemen hemen birbirine benzemektedir. 1990 ile 1995 yılları arasında 11 değişik lipaz türünün yüksek çözünürlükteki yapısı çözülmüştür. Burada boyut, sıralama benzerliği, substratlar ve aktivatörler dışında çoğunluğunun benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Lipazlar genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptit

zincirinden oluşmaktadır. Bunlardan N kısmı katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır.



Şekil. 3.1. Lipazın üç boyutlu protein yapısı (URL-1).

Son yıllarda lipaz araştırmalarına olan ilgi artmıştır. Bunun ilk nedeni, enzimin katalitik fonksiyonunun moleküler temelleri ile ilgilidir. Lipazlar, suda çözülebilir olmalarına rağmen, yağ-su ara fazında çözülmeyen lipid substratları katalize ederler. Bu yetenekleri lipazların kendilerine özgü yapısal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Lipazlar, genellikle aktif bölgeye girişi kaplayan sarmal oligopeptit bir birim içerir. Bu içerdiği yapı bir lipid damlacığı gibi sadece hidrofobik yüzeye doğru hareket eder. Bu nedenle, fosfolipazlar kadar lipazlarda yıllardır enzim katalizli reaksiyonlarda ara yüzey ile ilgili çalışmalarda kullanılmıştır. İkinci neden, enzimin medikal uygunluğuna ve serbest yağ asitleri ve diaçilgliseroller gibi lipoliz ürünler özellikle hücre aktivasyonu ve sinyal iletiminde aracı olarak rol oynadığından, düzenleme ve metabolizmadaki önemine bağlıdır. Son olarak, lipazların sadece hidrolizleri katalize eden güçlü araçlar olmadığı, aynı zamanda organik çözücülerde esterifikasyon, transesterifikasyon ve aminoliz gibi farklı tersine çevrilebilir reaksiyonları da katalize edici özelliklerinin keşfedilmesi nedeniyle lipaz araştırmalarına olan ilgi artmıştır (Villeneuve vd., 2000).

Lipazlar hayvan, bitki ve mikroorganizma kökenli olabilirler (Saad vd., 2005; Kamimura vd.; 2001). Klasik olarak hayvan pankreasından da elde edilmektedir. Lipazlar diğer hidrolazlar (pankreatin) ile ham karışım halinde ya da saf olarak insanlar tarafından sindirim yardımcısı olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal lipazlara başlangıçtaki ilgi, pankreas sıkıntısı ve toplanan materyaldeki farklılıklardan dolayıdır (Hasan, 2006).

Mikrobiyal lipazlar; termostabilite, substrat özgüllüğü, organik çözücülerde kalan aktivite yeteneği ve diğer farklı enzimatik özelliklerinden dolayı potansiyel endüstriyel öneme sahiptirler (Sharon vd., 1998). Mantar ve bakterilerden elde edilen mikrobiyal lipazlar, yaygın olarak kullanılan ticari lipazların ana kaynağıdır (Shu vd., 2006). Mikrobiyal lipazlar, hücre dışı ürünlerdir ve sulu ve susuz fazda geniş bir aralıkta reaksiyonları katalize etme yeteneğine sahiptirler (Liu vd., 2009). Mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar; yiyecek, deterjan, farmakoloji, kimya endüstrisi gibi birçok endüstride potansiyel uygulamalara sahiptir (Elibol ve Özer, 2000).

Lipazlar hem orijinleri (bakteri, fungus, memeli gibi) hem de özelliklerine bağlı olarak, hidroliz olayını katalizleme, pozisyonel spesifiklik, optimum pH, geniş bir aralıkta bulunan farklı karboksilik esterlerin sentezi, yağ asiti spesifikliği, termostabilite, organik asitler ve gliserolün açığa çıkması olaylarında büyük farklılıklar göstermektedir (Hasan vd., 2006).

Birçok diğer enzimin aksine lipazlar, susuz alanlarda da önemli derecede aktivite ve kararlılık göstermektedir. Bu özgün özelliği lipazları organik kimyasal proseslerde kullanım için etkin kılmaktadır. Lipazlar kemo-, regio- ve enantiyo seçici reaksiyonlarını çok iyi sağlayabilmeleri, genellikle kofaktörlere ihtiyaç duymamaları ve mikroorganizmalardan (özellikle bakteri ve mantarlar) yüksek verimde üretilebilmeleri nedeniyle başka kullanım alanlarına da sahiptir (Mateos Diaz, 2006). Lipazlar transesterifikasyon ve ester sentezinde kullanımlarından başka peptid sentezi, biyolojik yüzey aktif madde üretimi ve optik olarak aktif bileşikler üretmek için rasemik karışımların ayrılmasında da kullanılabilirler (Ellaiah, 2004).

3.2. Lipazların Substrat Spesifikliğı

Mikrobiyal lipazlar substrat spesifikliklerine göre; spesifik olmayan lipazlar, regiospesifik lipazlar ve yağ asiti spesifik lipazlar olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Spesifik olmayan lipazlar, triaçilgliserid molekülünde rastgele hareket eder ve triaçilgliseridi tamamen yağ asitleri ve gliserole parçalarlar. Bu grup lipazlara; *S. aureus*, *S.*

hyicus, *Corynebacterium acnes* ve *Chromobacterium visconum* tarafından üretilen lipazlar örnek olarak verilebilir.

Regiospesifik lipazlar, sadece ester bağlantılarını (yani gliserolün C1 ve C3 atomlarındaki ester bağlarını) hidrolize eden 1,3- spesifik lipazlardır ve hidroliz sonucu triaçilgliseridlerden 1,2(2,3)-diaçilgliserid ve 2-monoaçilgliserid olmak üzere serbest yağ asitleri oluşur. Hücre dışı bakteriyel lipazlar regiospesifiklerdir. Örneğin; *Bacillus* sp., *B. subtilis* 168, *Bacillus* sp. THL 027, *Pseudomonas* sp. F-B-24, *P. aeruginosa* EF2, *P. alcaligenes* 24 lipazları regiospesifik lipazlardır.

Yağ asiti spesifik lipazlar, belirli bir yağ asidine spesifik olup, sadece bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalamaktadırlar. *Achromobacterium lipolyticum*, yağ asiti spesifik lipazın bilinen bakteriyel kaynağıdır. Bununla birlikte, *Bacillus* sp., *P. alcaligenes* EF2 ve *Palcaligens* 24 lipazları uzun zincirli yağ asitlerine sahip triaçilgliseridler için spesifikken; *B. subtilis* 168, *Bacillus* sp. THL027, *P. aeruginosa* 10145, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. ATCC 21808, *C. vicosum* ve *Aeromonas hydrophila* lipazları kısa veya orta zincirli yağ asitlerine karşı spesifiktir. *S. aureus* 226 lipazı doymamış yağ asitlerine spesifiktir.

Lipazların bir diğer önemli özelliği de enantiyo/stereo seçicilik yapılarıdır. Yani lipazlar rasemik çiftin enantiyomerleri arasındaki farklılığı seçme yeteneğine sahiptirler. Bu enantiyomerik olarak saf veya zenginleştirilmiş organik bileşikler; ilaç, zirai, sentetik organik ve doğal ürünlerin kimyasında giderek önem kazanmaktadır. *Pseudomonas* ailesinden gelen lipazlar çoğunlukla bu kategoride yer alırlar. Bir lipazın stereospesifikliği genellikle substratın yapısına, aktif alandaki etkileşimlere ve reaksiyon koşullarına bağlıdır. Örneğin, *P. cepacia* lipazı; hidroliz, esterifikasyon ve transesterifikasyon ile ikincil alkollerin rasemik karışımının kinetik ayrışması gibi organik sentezlerde kullanılan bir katalizdir.

Bazı lipazlar aynı zamanda karbon halkası uzunluğuna bağlı asit spesifikliğine sahiptirler. Bu özelliklerin yanında lipazların enantiyo seçici yapıları onlara özellikle organik kimya ve farmakolojide diğer hidrolazlara göre üstünlük sağlar (Gupta vd; 2004).

3.3. Lipazların Katalitik Özellikleri

Lipazların biyolojik fonksiyonu, özellikle uzun zincirli triaçilgliserollerini serbest yağ asitleri, di- ve mono- açilgliserol ve gliserole hidrolizini katalize etmektir. Lipazlar aynı

zamanda susuz organik solventlerde, iki fazlı sistemlerde ve kiral spesifikliğe sahip misel çözeltilerde esterifikasyon, transesterifikasyon (asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz), aminoliz ve tiyotransesterifikasyonu içeren tersinir reaksiyonları da katalize etme yeteneğine sahiptir. Lipazların katalize ettikleri reaksiyonlar Tablo 2.1’de gösterilmiştir (Villeneuve vd., 2000).

Tablo 3.1. Sulu ve susuz çözeltilerde lipazların katalize ettiği reaksiyonlar (Villeneuve vd., 2000).

Hidroliz	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{H}_2\text{O}$	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{R}_2\text{-OH}$
Ester sentezi	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{R}_2\text{-OH}$	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{H}_2\text{O}$
Asidoliz	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{R}_3\text{-C-OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_3\text{-C-OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$
İnteresterifikasyon	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{R}_3\text{-C-OR}_4 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_3\text{-C-OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OR}_4 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$
Alkoliz	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{R}_3\text{-OH}$	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OR}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{R}_2\text{-OH}$
Aminoliz	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-OR}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{R}_3\text{-NH}_2$	$\longrightarrow$	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-C-NHR}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{R}_2\text{-OH}$

3.3.1. Hidroliz

Triaçilgliserollerdeki ester bağlarının toplam hidrolizi, buharın var olduğu yüksek sıcaklık ve basınçta elde edilmektedir. Alternatif olarak yağ asitleri, basınçlı ortamda sabunlaşma ya da kimyasal olarak katalize edilmiş hidrolizle üretilmektedir. Bununla birlikte aşırı su bulunması durumunda yağların enzimatik olarak ayrılması için lipazların

kullanımı reaksiyon, spesifiklik ve atık azalması nedeniyle normal sıcaklık ve basınç altında ilerlediği için daha ilgi çekicidir. Bu teknoloji halihazırda yağ asitleri, digliserid, monogliserid, süt ürünleri tatlandırıcısı ve ev ve işyerleri için deterjanların üretiminde kullanılmaktadır (Villeneuve vd., 2000).

3.3.2 Esterifikasyon

Polihidrik alkoller ve serbest yağ asitleri arasındaki esterifikasyon reaksiyonları, düşük su aktivitesi veya serbest solvent sistemleri şartlarında, suyu az organik solventlerde lipazlar tarafından katalize edilirler. Ester sentezi kimyasal olarak asit veya baz katalistlerle yapılabilmesine rağmen, enzim teknolojisinin kullanımı; normal şartların avantajlarını, yan etkilerin azalmasını ve spesifikliği sağlamaktadır. Lipaz katalizli ester senteziyle elde edilen yüksek değerli kimyasallara örnek olarak primer ve sekonder alifatik ve terpenik alkollerin oleik asit esterlerinin üretimi, bütirik asit ve geranolden ya da laurik asit ve mentolden geranil ve metil esterlerin üretimi verilebilir (Villeneuve vd., 2000).

3.3.2. Transesterifikasyon

Transesterifikasyon ifadesi; bir esterle bir asitin (asidoliz), bir esterle başka bir esterin (interesterifikasyon) ya da bir esterle bir alkolün (alkoliz) açıl radikallerinin değişmesi anlamına gelmektedir. Transesterifikasyon, endüstriyel olarak oldukça yüksek sıcaklıklarda susuz esteri ve başka bir başka tepkeni içeren karışımın ısıtılmasıyla elde edilmektedir. Alternatif olarak, daha düşük sıcaklıklarda alkali metaller veya alkali alkilleştiriciler kullanılabilir. Transesterifikasyonla katı ve sıvı yağların modifikasyonu için lipazların kullanılması, esterifikasyonda olduğu gibi normal şartların avantajlarını, yan etkilerin azalmasını ve spesifikliği sağlamaktadır. Örnek olarak kakao yağının üretimi verilebilir. Bu reaksiyon, palmiye yağı ve stearik asit veya palmiye yağı ve tristearolgliserol içeren lipaz katalizli transesterifikasyon reaksiyonları aracılığıyla elde edilmektedir (Villeneuve vd., 2000).

3.3.4. Doğal Olmayan Substratların Katalizi

Lipazların etkinliği karboksilik asit esterlerinin hidroliz ve sentez reaksiyonları katalize etmekle sınırlı değildir. Nükleofiller olarak su ve alkollerden başka diğer bileşikler de kullanabilirler. Bu yüzden lipazların organik solventlerde seçici olarak aminoliz, tiyotransesterifikasyon ve oksimoliz gibi farklı reaksiyonları katalize etme gücü vardır. Susuz ortamdaki esterlerin aminolizinde lipazın seçiciliği başarılı bir şekilde peptid ve yağ amid sentezleri için kullanılmıştır. Bu sonuçlar, optik olarak aktif peptidlerin, polimerlerin, yüzey aktif maddelerin sentezinde ve yeni deterjanların düşük maliyetle üretiminde lipaz teknolojisinin kullanımı için ümit vericidir (Villeneuve vd., 2000).

3.4. Bakteriyel Lipazlar

Bakteriyel lipazların bir kısmı glikoprotein, bir kısım hücre dışı bakteriyel lipazlarda lipoprotein yapısındadırlar. Bakteriyel enzim üretimi bazı polisakkaritler tarafından etkilenmektedir (Wintler vd., 1979).

Çalışılmış olan bakteriyel lipazlar arasında *Bacillus*, biyoteknolojik uygulamalar için uygun özellikleri nedeniyle önem taşımaktadır. *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus* ve *B. alcalophilus* en genel bakteriyel lipaz üreticileridir. Ayrıca; *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cepacia* ve *Stafilokok caseolyticus* bakteriyel lipaz üreticileri olarak çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir (Treichel vd., 2010).

Genel olarak bakteriyel lipazlar, nötr ya da alkali pH optimumuna sahiptirler, pH 4.8'de asidik optimuma sahip olan *P. fluorescens* SIK WI bunların dışındadır. *B. stearothermophilus* SB-1, *B. atropahaeus* SB2 ve *B. licheniformis* SB-3'den gelen lipazlar geniş bir pH aralığında aktiftirler (pH 3-12). Bakteriyel lipazlar, pH 4'ten pH 11'e kadar geniş bir aralıkta stabiliteye sahiptirler. Bu lipazlar, genellikle 30-60 °C aralığında sıcaklık optimumu göstermektedir. Bununla beraber, hem daha düşük hem de daha yüksek aralıklarda sıcaklık optimumuna sahip, bakteriyel lipazlar da çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Sadece *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* sp., türleri için termal stabilite verileri belirlenmiştir. Organik solventlerde stabilite sentez reaksiyonlarında istenilen bir olaydır. Var olan literatürden, birkaç teşvik edici veya engelleyicinin haricinde, lipazların genel olarak organik solventlerde stabil olduğu

sonucuna varılabilir. Aseton, *P. aeruginosa* YS-7 lipazı ve hekzan, *Bacillus* sp. lipazı için inhibitör etkisi yaparken; aseton, etanol ve metanolün *B. thermocatenulatus*'un lipaz aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Gupta vd., 2004).

3.5. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemleri

Günümüzde tüm enzimler için uluslararası standart enzim birimi kullanılmaktadır. Bu birime göre; bir birim (U) enzim, standart koşullar altında 1 dakikada 1 μ mol substratı dönüştürebilen miktar olarak tanımlanmaktadır. Enzimlerle katalize edilen tüm reaksiyonlarda olduğu gibi aktivite ölçümleri, farklı fizikokimyasal metotlar kullanılarak yapılabilir (substratın dönüşümünü veya ürünün oluşumunu gözlemleyerek). Ham veya saflaştırılmış lipaz örneklerinde lipaz aktivitesinin ölçümü için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Lipaz reaksiyonunun hızı; ya substratın, trigliseridin yok olma hızı, yağ asitlerin üretim hızı ya da emülsiyonun berraklaşma hızı saptanarak ölçülebilir.

Lipaz analizinin tek bir evrensel metodu yoktur. Belirli bir metodun seçimi kullanıcının kendi spesifik taleplerine bağlıdır. Tablo 3.2.'de lipaz aktivitesinin araştırılması ve ölçümünde kullanılan yöntemler gösterilmiş ve yöntemlerin içerikleri kısaca açıklanmıştır.

Tablo 3.2.'de gösterilen yöntemler dışında; bazı yazarlar tarafından lipaz aktivitesinin varlığının belirlenmesinde ve ölçümünde; triağılglicerolden serbest kalan gliserol, elektriksel iletkenlik, Wilhelmy plaka metodu, akustik dalga iletkenliği, florimetrik metotlar, kütle spektrometresi, arayüzey gerilimi izleme, lipoprotein lipaz ELİSA kitleri, immünolojik metotlar, NMR metodu, infrared spektroskopi gibi yöntemler de geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Lipaz aktivite analizinde kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları şöyle sıralanabilir (Hasan vd., 2009):

- Kromatografik, titrimetrik ve tek katmanlı analizlerde doğal trigliseridler kullanılmaktadır, fakat kromojenik ve florojenik sentetik substratlarla daha yüksek hassasiyet elde edilmektedir.
- Floresan araştırmaları kullanılan analizler yorucu ve zaman alıcıdır.
- Radyometrik analizler en hassas olanlarıdır, ama sürekli değildir, pahalı radyoaktif olarak etiketlenmiş substratların kullanımını gerektirir ve etiketlenmiş üründen radyoaktif substratın ayrılmasına ve emniyet konusuna dikkat edilmesi gerekir.

- Titrimetrik tahliller sürekli olarak yapılır. Doğal veya sentetik substratlar kullanılabilir ama hassasiyeti düşüktür ve serbest kalan hidrojen iyonunun miktarını değiştiren koşullara tabidirler.

Tablo 3.2. Lipaz aktivitesinin araştırılması ve ölçümünde kullanılan yöntemler

Yöntem	Substrat	Yöntemin İçeriği
Katı ortamda tarama	tribütirin ve triolein gibi substratlar	Substratları içeren katı ortamda büyüyen koloniler etrafında ışık halkası oluşumuyla belirtilir.
	Floresan boya Rhodamine B	UV ışığında bakteriyel koloniler etrafında turuncu floresan ışık oluşumuyla belirtilir.
Titrimetrik metodlar		Lipaz aktivitesi, bir sabit uç nokta değerinde pH elde etmek amacıyla NaOH ekleyerek titrasyon sonunda zamanla serbest kalan serbest yağ asitlerine göre belirlenir.
pH-stat metodu	Doğal veya sentetik triaçilgliseridler	
Zeytinyağı emülsiyon metodu	Zeytinyağı	İndikatör varlığında NaOH ile yapılan titrasyon sonunda serbest kalan serbest yağ asitlerine göre belirlenir.
Nefolometri ve turbidimetri		Bu metod, standart bir referans süspansiyonda dağılan ışığın yoğunluğuyla tanımlanmış koşullar altındaki örnekte dağılan ışığın yoğunluğunun karşılaştırılmasına dayanır.
Kolorometrik Metodlar	<i>p</i> -nitrofenil esterleri	Farklı zincir uzunluğundaki (>C-10) yağ asitlerin <i>p</i> -nitrofenil esterlerinin hidrolizi sonucu oluşan sarı renkli <i>p</i> -nitrophenolün spektrofotometrik olarak 405 nm veya 410 nm’de okunan absorbanşıyla belirlenir.
Kromatografik Metodlar	<i>p</i> -nitrophenol’ün β -naftil laurat, palmitik ve laurik esterleri	Örneğin; β -naftil laurat, enzimle inkübasyonu sonunda naftolun oluşum miktarı ters faz HPLC ile ölçülür.
HPLC metodları		
Gaz kromatografisi	vinil butirat	Hekzanda 1-oktanollu vinil butiratın lipaz katalizli transesterifikasyonu ile 1-oktil bütirat üretimi gaz kromatografisi ile izlenir.
Test Kitleri	1,2-dioleoyl-3-pyrenyldecanoyl-rac-glycerol gibi	Farklı substratları içeren test kitleri spektrofotometrik olarak lipaz aktivitesinin hızlı ve kolay şekilde ölçülmesini sağlar.

3.6. Lipaz Üretimi ve Ortam Bileşimi

Lipazlar, bitkisel kaynaklardan, hayvansal dokulardan ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir ve pekçok mikroorganizma türlerinin bünyelerinde doğal olarak bulunmaktadır. Lipitler, suda çözünmezler ve hücre içi daha polar parçalarına hücre dışında yıkılmaları gerekmektedir. Bu nedenle lipazların çoğu hücre dışına salgılanırlar.

Mikrobiyal lipazlar, genellikle daldırmalı kültürle üretilmektedir, fakat katı hal fermentasyon metotları da kullanılabilir. Daldırmalı kültür ve katı hal fermentasyonu metotları ile lipaz üretimi için optimal kültürü ve ihtiyaçlarını tanımlamak amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. Lipaz üretimi; karbon ve azot kaynağının tipi ve konsantrasyonu, kültür pH'ı, büyüme ısı ve çözünmemiş oksijen konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenir. Tablo 3.3'de bazı mikroorganizmalar ile lipaz üretimi için optimum fermentasyon şartları verilmiştir.

3.6.1 Karbon Kaynaklarının Etkisi

Karbon ve azot, mikroorganizmaların büyümesi için temel maddeler olup, normal olarak doğal kaynaklardan temin edilirler (Hasan, 2009). Lipazlar, büyük ölçüde indüklenebilir enzimler olduğu için, karbon kaynağı lipaz aktivitesini etkileyen başlıca faktördür. Bu nedenle lipazlar genellikle yağ veya triağılgliceroller, yağ asitleri, hidrolize edilebilir esterler, tweenler, safra tuzları ve gliserol gibi herhangi bir indükleyici lipit kaynağının mevcudiyetinde üretilirler. Bununla birlikte şekerler, şeker alkol, polisakkaridler ve diğer kompleks kaynaklar gibi diğer karbon kaynakları da lipaz aktivitesini önemli derecede etkileyebilmektedir (Gupta vd., 2004). Mikrobiyal lipazların üretimi için ne çeşit lipitlerin etkili olduğu hakkında genel bir kural yoktur.

Chander vd., (1979), *Streptococcus faecalis* ile lipaz üretiminde, kısa zincirli yağ asitlerinin lipaz üretimini arttırdığını, fakat oleik asit gibi daha uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin lipaz üretimini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini rapor etmiştir (Hasan vd., 2009).

Sugihara vd., (1991), *Bacillus* sp. kullanarak, kültür ortamında % 1'lik zeytinyağı mevcudiyetinde lipaz üretimini rapor etmiştir. Uzatılmış kültürasyondan sonra bile zeytinyağının olmadığı durumda az bir enzim aktivitesi gözlemlenmiştir. Papaparaskevas vd., (1992), *Rhodotorula glutinis* ile hücre dışı lipaz üretimi için, fruktoz ve palm yağının en iyi karbonhidrat ve lipit kaynakları olduğunu rapor etmiştir. İki karbon kaynağı

Tablo 3.3. Lipaz üretimi için fermantasyon şartları

Mikroorganizma	pH	S ¹ °C	KH ² rpm	İS ³ saat	Karbon Kaynağı	Azot Kaynağı	Referans
<i>P. fragi</i> CRDA 037	6.5	11	100	72	Bütirik asit		Schuepp vd., (1997)
<i>P. aeruginosa</i> PseA	6.5	25	100	72	Glukoz	Maya özütü, tripton	Ruchi vd., (2008)
<i>P. fluorescens</i> HU380	7.0	28	500	16	Gliserol	Et özütü, maya özütü	Kojima vd., (2003)
<i>P. fluorescens</i> 2D		20	120	24	Aminoasitler	Amonyum klorid	Makhzoum vd.,(1995)
<i>Pseudomonas</i> sp.	9.0	30	150	72	Soya fasulyesi, mısır sıvısı, nişasta		Dong vd., (1999)
<i>Pseudomonas</i> sp.ATTC 21808	7.0	20	250	70	Zeytinyağı	Maya özütü, pepton	Kordel vd., (1991)
<i>P. luteola</i>	7.0	30	160	72	Glukoz, tween 80		Litthauer vd., (2002)
<i>P. aeruginosa</i> KKA-5	6.9	30	121	5 gün	Hint yağı	Polipepton, maya özütü	Sharon vd., (1998)
<i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	7.0	30	200	48	Glukoz, zeytinyağı	Pepton, maya özütü	Meghwanshi vd., (1998)
<i>Pseudomonas</i> sp. KWI-56	7.0	27	300	34	Oleik asit	Pepton, maya özütü	Izumu vd., (1990)
<i>Pseudomonas</i> sp. MSI057	7.0	37	250	72	Glukoz, tribütirin	Pepton, maya özütü, tripton	Kiran vd., (2008)
<i>A. calcoaceticus</i> LP009	7.0	15	200		tween 80	Tripton, maya özütü	Pratuangdejkul; (2000)
<i>B. alcalophilus</i>	10.6	60	100	20	Maltoz, soya unu	Pepton, maya özütü,	Ghanem vd., (2000)
<i>P. putida</i> ATCC 795	7.5	27	150	72	Soya unu, tuzsuz tereyağı	Pepton	Pabai vd., (1995)
<i>Burkholderia</i> sp.	7.0	45	250	24	Glukoz, hardal yağı	NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ HPO ₄	Rathi vd., (2001)
<i>S. haemolyticus</i> L62	7.0	37		20		Tripton, maya özütü	Oh vd., (1999)
<i>B. licheniformis</i> H1	9.0	50	200	10	Glukoz	Pepton, maya özütü, et özütü	KhyamiveHorani (1996)
<i>Bacillus</i> sp. THL027	7.0	65	200	48	Glukoz, pirinç kepeği yağı	(NH ₄) ₂ SO ₄	Dharmsthiti vd., (1999)
<i>P. aeruginosa</i>	7.0	37	150		Hint yağı	Maya özütü	Amara ve Salem (2009)

¹: S: sıcaklık; ²: KH: karıştırma hızı; ³: İ.S.: inkübasyon süresi

karşılaştırıldığında % 2'lik palm yağı konsantrasyonunda fruktoz ortamından 12 kat daha fazla verim elde edilmiştir.

Lee vd., (1993), karbon kaynağı olarak emülsiyeye edilmiş zeytin yağı içeren ortamdaki *P. fluorescens* SIK tarafından üretilen alkaline lipaz için 7395 U/mg protein spesifik aktivite belirlemiştir. Araştırılan diğer triaçilgliserollerle karşılaştırıldığında enzim, trikaproik (C6) ve trikaprilin (C8) doğru yüksek bir lipolitik aktivite göstermiştir ve trioleini 1 ve 3 pozisyonlarında ester bağlarını tercihen hidrolize etmiştir. Benzer şekilde, Sztajer vd., (1993); *Penicillium expansum* kullanarak, pH 8.3'te yağ içeren ortamda (% 1 zeytinyağı) maksimum alkali lipaz aktivitesi elde etmiştir. Tween 20 ve lubrol PX ilavesiyle enzimin stabilitesi artmıştır.

Espinoza vd., (1990), tweenlerin enzimin serbest kalmasını artıran sürfaktanlar olduğu kadar, kimyasal yapılarının bazı doğal substratlara benzer olması nedeniyle indükleyici olarak da görev yapabildiğini belirtmiştir.

Gordillo vd., (1995), kesikli kültürde *C. rugosa* ile lipaz üretiminin oleik asitin (lipaz indükleyicilerinin (yağlar, tween 80 gibi) hidrolizi sonucu oluşan başlıca ürünlerden biri) başlangıç konsantrasyonundan etkilendiğini belirtmişlerdir. 2 g/L'lik başlangıç oleik asit konsantrasyonunda maksimum lipaz/substrat verimi elde edilmiştir ve bu verim daha yüksek oleik asit konsantrasyonlarında azalmıştır. Song vd., (2001), sürfaktanların lipaz üretimine yardımcı olabileceğini bulmuşlardır.

3.6.2 Azot Kaynaklarının Etkisi

Karbon kaynağı yanında ortamdaki azot kaynağının tipi de lipaz üretimini etkilemektedir. Genel olarak pepton ve maya özütü gibi organik azot kaynakları tercih edilmektedir ve bunlar farklı *Bacillus* sp. (*Bacillus* A30-1, *B. alcalophilus*, *B. licheniformis* H1 gibi) ve farklı *pseudomonas* (*Pseudomonas* sp., *P. fragi*, *P. fluorescens* BW 96CC gibi) türleri ile lipaz üretimi için birçok araştırmada azot kaynağı olarak kullanılmıştır. Amonyum klorür ve diamonyum hidrojen fosfat gibi inorganik azot kaynaklarının da bazı mikroorganizmalarla lipaz üretiminde etkili olduğu rapor edilmiştir (Gupta, 2004).

Sztajer ve Maliszewska (1989), *Pe. citrinum* kullanarak hücre dışı lipaz üretimi için % 5 pepton (w/v) (pH 7.2) içeren ortamda maksimum verim elde etmiştir. Mısır likörü ve soya unu gibi azot kaynakları lipaz üretimini artırmıştır, fakat peptondan daha az verim elde

edilmiştir. Üre ve amonyum sülfat lipaz sentezini inhibe etmiştir. Lipolitik aktivite (1120 U/L) zeytinyağından serbest kalan yağ asitlerin titrasyonu ile belirlenmiştir.

Izumi vd., (1990), *Pseudomonas* sp. KW1-56 ile termostabil lipazı azot kaynağı olarak pepton (% 2 w/v) ve maya özütü (% 1 w/v) içeren ortamda üretmiştir. Okeke ve Okolo (1990), azot kaynağı olarak % 35 soya fasulyesi (w/v) içeren sabit koşullar altında *Acremonium strictum* kullanarak yüksek miktarda lipaz üretmişlerdir. Genellikle organik azot kaynakları kullanıldığı zaman mikroorganizmalar yüksek verimde lipaz üretirler. Fakat bir istisna olarak, Papaparaskevas vd., (1992), *Rho. glutinis* kullanarak lipaz üretimini araştırmışlar ve organik azot kaynaklarında (maya özütü ve tripton gibi) *Rho. glutinis* iyi büyümesine rağmen, inorganik azot kaynağı olarak amonyum fosfat kullanıldığında lipaz üretiminin arttığını tespit etmişlerdir. Üretilen bu enzim pH 7.5'da optimum aktiviteye sahiptir.

Ohnishi vd., (1994), *A. oryzae* ile azot kaynağı olarak maya özütü (% 1), polipepton (% 2) ve soya unu (% 3) içeren bir ortamda maksimum alkali lipaz üretmiştir. Bu enzim, substrat olarak zeytinyağı ve tribütirinde sırasıyla pH 7.5 ve 10'da optimum aktiviteye sahiptir. Pimentel vd., (1994), *Pe. citrinum*'un bir suyu ile azot kaynağı olarak maya özütü (% 0.5) içeren ortamda 409 IU/mL maksimum lipaz aktivitesi elde etmişlerdir.

3.6.3. İyonların Etkisi

Na^+ , PO_4^{3-} , Ca^{++} gibi inorganik iyonlar bakterilerin büyümesi için gereklidir. Ohkuro vd., (1978), *Bacillus natto* kültürlerine NaCl ilavesinin lipaz üretimini artırdığını ve artan NaCl konsantrasyonu ile lipaz üretim zamanının kısaltıldığını bulmuştur (Hasan vd., 2009). Janssen vd., (1994), üretim ortamına magnezyum, demir ve kalsiyum iyonları ilave edildiğinde termofilik *Bacillus* sp. tarafından lipaz üretiminin birkaç kat arttığını rapor etmiştir. Benzer şekilde, Pokorny vd., (1994), *A. niger* ile lipaz üretiminin Mg^{++} mevcudiyetinde arttığını rapor etmiştir. Kok vd., (1994), *Aci-calcoaceticus* BD 413 tarafından hücre dışı lipaz üretiminin ortam Mg^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} ve Co^{++} iyonları ile desteklendiği zaman arttığını bildirmiştir. Lin vd., (1995), tarafından yapılan bir çalışmada, *P. pseudoalcaligenes* F-111 ile lipaz üretimi, fosfat içeren ortama Mg^{++} ilave edildiği zaman artmıştır. Bu alkali lipaz, pH 6-10 arasında oldukça aktif ve stabildir ve optimal reaksiyon sıcaklığı 40 °C'dir.

Wang vd., (1995), *Bacillus* sp. A 30-1 (ATCC 53841) tarafından lipaz üretiminin, Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , Co^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} , Mo^{++} ve Zn^{++} içeren kompleks bir ortamda gerçekleştiğini rapor etmiştir.

Sharon vd., (1998), *P.pseudoalcaligenes* KKA-5 tarafından maksimum lipaz üretiminin, 0,8 M Mg^{++} konsantrasyonunda meydana geldiğini bildirmiştir. Ortamdan magnezyum iyonlarının çıkarılması lipaz üretiminde yaklaşık % 50 azalmaya sebep olurken, ortama kalsiyum iyonlarının eklenmesi lipaz üretimini etkilememiştir (Sharma, 2001).

El Gammar ve Rizk (2000), *Candida utilis* ve *Debaryomyces hansenii* ile lipaz üretiminde fermantasyon ortamına % 0.01 oranında ilave edilen NaCl'nin lipaz üretimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

3.6.4. Fiziksel Faktörlerin Etkisi

Bir üretim ortamında farklı kimyasal içeriklere ilaveten pH, sıcaklık, karıştırma, havalandırma ve inkübasyon süresi gibi fizyolojik parametreler de mikroorganizmalarla enzim üretimini etkileyen önemli faktörlerdir.

Büyüme ortamının başlangıç pH'sı lipaz üretimi için önemlidir. Genellikle, *Bacillus* sp. (Sugihara vd., 1991), *Acinetobacter* sp. (Barbaro vd., 2001) ve *Burkholderia* sp. (Rathi vd., 2001) gibi bakteriler en iyi büyüme ve lipaz üretimi için yaklaşık pH 7'yi tercih ederler. Bununla beraber birçok çalışmada daha yüksek pH'larda (>7) maksimum aktivite gözlemlenmiştir (Nashit ve Nelson 1953; Gilbert vd., 1991; Wang vd., 1995; Khyami ve Horani 1996; Dong vd. 1999; Sharma vd., 2002). Lipaz üretimi için optimum sıcaklık genellikle mikroorganizmanın büyüme sıcaklığıyla uyumludur. Örneğin, *Bacillus* sp. RSJ1 ile en iyi büyüme ve lipaz üretimi için sıcaklık 50 °C olarak bulunmuştur (Sharma vd., 2002). Bununla birlikte lipazların genellikle 20-45 °C sıcaklık aralığında üretildiği gözlemlenmiştir.

Bakteriler tarafından maksimum lipaz üretimi için yapılan çalışmalarda, birkaç saatle birkaç gün arasında değişen inkübasyon süreleri elde edilmiştir. *A.calcoaceticus* ve *Bacillus* sp. RSJ1 ile lipaz üretimi için 12 saatlik inkübasyon süresi optimum olarak bulunmuştur (Mahler vd., 2000; Sharma vd., 2002). Oysa *Pseudomonas* spp. (*P.fragi*) ve *P. fluorescens* BW96cc suşları için sırasıyla 72 ve 96 saat inkübasyondan sonra maksimum lipaz üretmiştir (Pabai vd., 1996; Dong vd., 1999).

Aerobik organizmalar tarafından üretilen hücre dışı enzim miktarını artırmak için çoğunlukla çalkalamalı inkübatörler kullanılmaktadır. Havalandırma, lipaz üretimi için gerekli olup, en yüksek aktivite havalandırma ile elde edilmiştir. Farklı araştırmacılar, optimum lipaz üretimi için farklı havalandırma oranlarını rapor etmiştir. *Bacillus* sp. ile yapılan bir çalışmada, üretilen lipolitik aktivite sürekli havalandırma ile iki gün inkübasyondan sonra maksimum seviyeye ulaşmıştır (El-Shatei ve Rezkallah 1997). Yapılan başka bir çalışmada havalandırma, *P. aeruginosa* KKA-5'in büyüme ve lipaz üretimini artırmıştır (Sharon vd.,1999). Çalkalama (karıştırma), termofilik *Rhizopus oryzae* ile üretilen hücre içi ve dışı lipaz üretimini artırmıştır (Salleh vd., 1993).

3.7. Lipazların Kullanım Alanları

Mikrobiyal lipazlar, seri üretim kolaylığı ve çok yönlü uygulanabilir özelliklerinden dolayı biyoteknolojik olarak değerli enzimlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Günümüzde lipazlardan yağ, gıda, ilaç, deterjan, kozmetik gibi alanlarda faydalanılmaktadır (Sharma, 2001).

3.7.1. Yağ ve Oleokimya Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Mucor miehei (IM 20) ve *Candida antartika* (SP 382) lipazları, organik solventlerin yokluğunda serbest yağ asitlerinin esterifikasyonu veya izopropilden gliserollü heksanda yağ asiti metil esterlerinin transesterifikasyonu için kullanılmışlardır.

Büyük ölçekli işletmelerdeki palm yağının ve tereyağının toplam yıllık dünya çapındaki üretimi sırasıyla, 5.5 milyon ton ve 6.5 milyon tondur. Kakao yağı 37 °C'de erime noktası olan yüksek değerli bir üründür. Palm yağının kakao yağına (ikame olarak) dönüşümü interesterifikasyon ile elde edilebilir ve kullanılmakta olan ticari bir prosestir.

Lipaz ile birlikte lesitinin adsorpsiyonu, yemeklik sıvı ve katı yağların interesterifikasyon reaksiyonlarını yürütmek için etkilidir. Palm yağı, kanola veya soya fasulyesi yağı ile karıştırılır ve düşük sıcaklıklarda muamele özelliklerini geliştirmek için enzimatik seçici interesterifikasyon ile modifiye edilir. Organik solventte tutuklanmış *M. miehei* lipazı omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerini içeren mısır yağı, ayçiçeği yağı, fıstık

yağı, zeytinyağı ve soya yağı gibi bitkisel yağların üretiminde enzimatik interesterifikasyon reaksiyonlarını katalizlerler.

Oleokimya endüstrisinde lipazların kullanımı alkoliz, asidoliz, hidroliz ve gliseroliz süresince enerji ve termal degradasyonun minimize olmasını sağlamaktadır. Katı ve sıvı yağlar dünyada yıllık olarak yaklaşık 60 milyon ton seviyesinde üretilmektedir ve bunun önemli bir kısmı (yıllık 2 milyon tondan fazla) hidroliz, gliseroliz ve alkoliz gibi yüksek enerji tüketen proseslerde kullanılmaktadır.

Belirgin üstünlüğüne rağmen, enzimatik metotların potansiyelleri ile orantılı ticari kullanım düzeyine henüz ulaşılmamıştır. Bazı yüksek değerli çoklu doymamış yağ asitlerinin üretimi ve sabun imalatı için nispeten küçük ölçekli enzimik yağ ayırma prosesleri hakkında şimdiye kadar birkaç bilgi edinilmiştir. Örneğin, Japonya'da Miyoshi Oil & Fat Co, firması sabunların üretiminde, *Candida cylindracea* lipazını ticari olarak kullanmaktadır. Şirket enzimik metodun üstün bir ürün verdiğini ve bu metodun geleneksel prosesten daha ucuz olduğunu iddia etmektedir (Hasan, 2006).

3.7.2. Biyolojik Olarak Bozunabilir Polimerlerin Üretiminde Lipazların Kullanımı

Lipazlar, organik sentezlerde uygulanmaları için en önemli enzim gruplarından biridir. Lipazlar yararlı biyobozunur bileşiklerin üretiminde biyokatalist olarak kullanılmaktadır. 1-Butil oleat, kış aylarında kullanılan biyodizelin viskozitesini azaltmak için bütanol ve oleik asitin doğrudan esterifikasyonu ile üretilmektedir. Trimetilpropan esterleri yağlayıcılara (yağlama maddelerine) benzer şekilde de sentezlenir. Lipazlar ester sentezlerini katalizleyebilir ve organik çözücü sistemlerde transesterifikasyon reaksiyonları ile biyobozunur poliestерlerin enzim katalizli üretim olanağını sağlar. Aromatik poliestерler lipaz biyokatalizi ile sentezlenebilirler (Hasan, 2006).

3.7.3. Tekstil Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Lipazlar, tekstil endüstrisinde ve boyamada pürüzsüzlüğü sağlayarak, daha iyi emiciliğe sahip kumaş elde etmek için yağlama maddelerinin giderimine yardımcı olarak kullanılmaktadır. Lipazlardan kot taşlama sistemlerinde, çizgi ve kat izi oluşumunu azaltmak için de faydalanılmaktadır. Kot ve diğer pamuklu kumaşların haşıl sökümü için

kullanılan ticari preparatlar hem alfa amilaz hem de lipaz enzimlerini içermektedir (Hasan, 2006).

3.7.4. Deterjan Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Hidrolik lipazların ticari olarak en önemli uygulama alanı başlıca ev ve endüstriyel çamaşırhane ve evlerdeki bulaşık makinelerinde kullanılan deterjanlara katkı maddesi olarak kullanılmasıdır. Lipazlar; kızartma yağı, salata yağı, tereyağı, yağ bazlı soslar, çorbalar, insan sebumu veya belirli kozmetikler gibi kaynaklardan oluşan yağ içeren lekeleri gidermek için deterjan formülasyonlarında da kullanılmaktadır (Hasan, 2006).

Enzimler, daha düşük yıkama sıcaklıklarında deterjanların kullanımına imkan vererek enerji tasarrufu sağladığından deterjanların çevresel yükünü azaltmaktadır. Genellikle deterjanlarda daha az olması istenilen kimyasalların azaltılmasına imkan sağlamaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilir ve zararlı kalıntı bırakmaz. Ayrıca kanalizasyon arıtma tesislerinde olumsuz etkisi yoktur ve sucul yaşam üzerinde herhangi bir riski mevcut değildir.

Lipaz kumaş yüzeylerin ıslanılabilirliğini düzeltmek ve yüzeylerden yağ giderimini kolaylaştırmak için tutuklanır. Yıkama sırasında lipazın sürfaktanlar tarafından denatürasyonuna ve ısı etkisine karşı stabilitesi geliştirilmiştir ve çamaşırın yıkanması süresince kumaştan lekeyi giderme dayanıklılığına sahiptir. Yüksek sıcaklıkta kumaş kurutmadan sonra var olan aktivitesini korur ve depolama ve taşıma süresince aktivitesi kalır.

Aspergillus oryzae, *Acinetobacter radioresistens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Candida* ve *Chromobacterium* lipazları deterjanlarda kullanılmak üzere ticari olarak üretilmektedir (Hasan, 2006).

3.7.5. Gıda Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Günümüzde, katı ve sıvı yağ modifikasyonları yeni, ekonomik ve yeşil teknolojileri gerektiren gıda işleme sektörünün ana alanlardan birisidir. Besinsel olarak önemli yapısal triaçilgliserollerini içeren ve fizikokimyasal özellikleri değiştirilerek uygun hale getirilmiş bitkisel yağlar, gelecekte piyasada büyük bir potansiyele sahip olacaktır. Regio- ve yağ

asidi spesifikliği olan mikrobiyal lipazlar, büyük öneme sahiptir ve bitkisel yağların tekrar uygun hale getirilmesi için kullanılabilir.

Lipazlar, tat ve güzel koku bileşikleri olarak bilinen kısa zincirli yağ asitleri ve alkollerin esterlerinin sentezi ile lezzeti geliştirmek için gıdalara eklenerek kullanılmaktadır.

Lipazlar, daha önceleri balık gibi yalın (yağsız) et üretiminde kullanılmıştır. Balıkentinin işlenmesi sırasında lipaz ilave edilerek katı yağ giderilmekte ve bu işlem biyolipoliz olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca lipazlar, sosis üretiminin fermentatif adımlarında ve olgunlaşma sırasında serbest kalan uzun zincirli yağ asitlerindeki değişikliklerin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Daha önceleri farklı mikrobiyal kökenli lipazlar, rafine edilen pirincin lezzetlendirilmesinde, soya sütünün modifiye edilmesinde ve elma şarabının fermantasyonunun hızlandırılmasında ve aromasının iyileştirilmesinde kullanılmıştır (Hasan, 2006).

3.7.6. Rasemik Karışımların Ayırıştırılmasında Lipazların Kullanımı

Lipazlar, rasemik karışımları ayırştırmak, tıbbi ilaçlar, zirai ilaçlar ve pestisitlerin kiral yapı bloklarının sentezi için kullanılmaktadır. Bazı lipazlar, polar olmayan organik çözücülerde aktivitelerini koruyabilirler. Bu nedenle stereospesifik hidroliz yoluyla rasemik karışımların ayırıştırılması gibi suda çözünmeyen esterlerin hidrolizinde kullanılabilirler. Yapılan çalışmalarda enantiyo seçici hidroliz veya esterifikasyon ile stereo izomerlerin ayırıştırılması da sağlanmıştır.

Kiralite birçok ilacın etkinliğinde önemli bir faktördür. Yığın halinde etkin maddelerin ve tarımsal ürünlerin hazırlanması için tıbbi ve zirai ilaç endüstrilerinde kiral araçlar ve hassas kimyasallara yüksek bir talep vardır. Örneğin, ağrıların tedavisinde kas gevşetici olarak kullanılan Baklofenin üretiminde *C. cylindracea* lipazı rasemik karışımın ayırıştırılması için bir katalizör olarak kullanılmaktadır.

Lipazlar kilogram ölçeğinde optik olarak aktif ürünlerin hazırlanması için dünyada birçok farmokoloji firmaları tarafından kullanılmaktadır. Polifonksiyonel organik bileşiklerin regio seçici modifikasyonları genişleyen lipaz uygulamalarının bir başka alanıdır. AIDS tedavisinde umut verici bir ilaç olan castanospermin regio seçici modifikasyonunda lipazlar başarıyla uygulanmıştır (Hasan, 2006).

3.7.7. Tanı Aracı Olarak Lipazların Kullanımı

Lipazlar, sağlık sektöründe ilaç hedefleri veya gösterge olarak önemli enzim olup, tanı araçları olarak kullanılmaktadırlar ve onların varlığı ya da artan seviyesi bazı enfeksiyon veya hastalıkları göstermektedir.

Lipazlar enzim bağlantılı kolorimetrik reaksiyonlardan sonra oluşan gliserolü üretmek için serum trigliseritlerin enzimatik olarak belirlenmesinde kullanılır. Akut pankreatit ve pankreatik yaralanma olduğu sezinlenen durumlarda kan serumundaki lipazların seviyesi bir tanı aracı olarak kullanılabilir.

P. aeruginosa bir fırsatçı patojendir ve birçok farklı virülans faktörü sentezleme ve salgılama yeteneği *P.aeruginosa*'nın patojenliğine katkısı olan biyolojik özellikleri olarak kabul edilir. Virülans faktörler arasında lipaz da dahil olmak üzere birçok enzim vardır. Ayrıca *P. acnes*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* gibi patojen bakterilerin lipazı, akne hastalarında, deri döküntüsü oluşumunda etkili olduğu bulunmuştur (Hasan, 2006).

3.7.8. Unlu Mamüller, Şekerleme ve Peynir Lezzetlendirmede Lipazların Kullanımı

Lipazlar süt yağının hidrolizi için süt endüstrisinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Günümüzdeki uygulamalar; peynir gibi ürünlerin imalatı, peynirlerin lezzetinin artırılması, peynir olgunlaşmanın hızlandırılması ve tereyağı ve kremanın lipolizini içerisine almaktadır. Süt yağında lipazların etkinliği ile oluşan serbest yağ asitlerinden, lipazların spesifik lezzetlendirme karakteristikleri ile ilgili olarak özellikle yumuşak peynirler de olmak üzere birçok günlük üründe faydalanılmaktadır. Lipazlar, krema tadı ve şekerleme ve karamelin tereyağlı dokusunu elde etmek için kahve kremalarında lezzeti iyileştirmede kullanılmıştır. Küflü peynirin lezzetinin iyileştirilmesi *Pencillium roqueforti*'den elde edilen enzimle yapılmaktadır. Enzimlerin kullanımı, fırıncılara; ekmeklerin raf ömrünü arttırmak, enzimatik olmayan esmerleşmenin iyileştirilmesini ve kontrolünü yapmak, ekmek hacmini arttırmak ve ekmek iç yapısını geliştirmek için imkan sağlamaktadır. *A. niger*, *R. oryzae*, *C. cylindracea*'dan elde edilen lipazlar fırın ürünlerinde kullanılmaktadır (Hasan, 2006).

3.7.9. Kozmetikte Lipazların Kullanımı

Unichem International (İspanya) cilt ve güneş kremleri, banyo yağları gibi kişisel bakım ürünlerinde yumuşatıcı olarak kullanılmak üzere; izopropil miristat, izopropil palmitat ve 2-etilheksil palmitat üretmektedir. Bu işlemde tutuklanmış *Rhizomucor meihei* lipazı biyokatalist olarak kullanılmaktadır.

Retinoidler (A Vitamini ve türevleri) cilt bakım ürünleri gibi kozmetik ve farmakoloji de ilaçlar için büyük ticari kullanım potansiyeline sahiptir. Suda çözünen retinol türevleri tutuklanmış lipazın katalitik reaksiyonu ile hazırlanmıştır. Lipazlar saç dalgalandırma preparatında da kullanılmıştır (Hasan, 2006).

3.7.10. Medikal Uygulamalarda Lipazların Kullanımı

Lipazlar sindirim yardımcıları olarak kullanılabilirler. Lipazlar tümör nekroz faktörünün aktivatörleridir ve bu nedenle kötü huylu tümörlerin tedavisinde faydalanılabilir. Lipazlar eskiden gastrointestinal sistem bozuklukları, dispepsi, sindirim sistemi alerjilerinin derideki belirtileri gibi hastalıkların tedavisinde terapötik (iyileştirici) olarak kullanılmıştır. *Candida rugosa* lipazı serum kolesterol düzeyini düşüren bir ilaç olan lovastatini sentezlemek için kullanılmıştır. Koroner vazodilatör (damar genişletici) olarak yaygın bir şekilde kullanılan diltiazem hidroklorid sentezinde anahtar aracı ürün olan 3-fenilglisidik asit esterinin asimetrik hidrolizi *S. marcescens* lipazı ile gerçekleştirilmiştir.

Bitkilerden elde edilen lipazlar, sindirim yardımcıları olarak çeşitli ilaçlarda kullanılmaktadır. Sindirimi destekleyen komplike bir yüksek tesirli bitki enzimi olan Similase (protein, karbonhidratlar, yağlar, ve liflerin sindirimi) üretilmiştir. Ayrıca bitkisel sindirim enzimleri olan Vitaline® Herbal Formulas, All-Vita Northwest, ABD’de üretilmektedir (Hasan, 2006).

3.7.11. Biyosensör Olarak Lipazların Kullanımı

Biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerin enzim katalizli ayrışmasına dayalı biyosensörler geliştirilmiştir. Polimer enzim sistemi, poli (trimetilen) süksinat, lipaz ile ayrıştırılan sensörde kullanımı için araştırılmıştır. Böyle bir sensör sistemin potansiyel

uygulama alanları; enzim konsantrasyonlarının belirlenmesi ve enzim belirtkisi olarak polimer ayrıştırıcı enzimi kullanan, kullanıma hazır enzim esaslı immünosensörlerin oluşumudur. Lipazlar glukoz oksidaz ile kombinasyonunda pH/oksijen elektrotları üzerine tutuklanabilir ve lipid biyosensörler olarak bu fonksiyon trigliseritlerin ve kan kolesterolünün tayininde kullanılabilir (Hasan, 2006).

3.7.12. Deri Temizlemede (Yağ Alma) Lipazların Kullanımı

Lipazlar, yağ gideriminde çevresel olarak daha güvenilirdir. Yağ alma işlemi özellikle büyükbaş hayvanların postları ve küçükbaş hayvanların derileri gibi yağlı ham materyallerin proseslenmesinde önemli bir aşamadır. Alışlagelmiş yöntemler, uçucu organik bileşik emisyonları gibi çevre sorunları ortaya çıkmasına neden olabilen organik solventler ve sürfaktanların kullanılmasıdır. Lipaz enzimleri özellikle de makul seviyede yağ içeriği olan postlar ve derilerden yağ ve gresi giderebilir. Hem alkali stabil hem de asit aktif lipazlar deri ve postların yağlarının alınmasına kullanılabilir. Prosesi geliştirmek için alkali stabil proteazlar yağ hücre membranlarının ve yağ bezi bileşenlerinin degradasyonunu destekleme de kullanılır. Lipaz kullanmanın başlıca avantajları daha uniform renk ve daha temiz bir görünümdür. Lipazlar ayrıca hidrofobik su geçirmez deri üretimini (araçlar için döşemelik deri gibi) iyileştirirler (Hasan, 2006).

3.7.13. Atık/Atıksu/Kanalizasyon Arıtımında Lipazların Kullanımı

Lipazlardan, oksijen transferini (biyokütle yaşam koşullarını korumak için) sağlamak için, ince yağ tabakalarının havalandırma tanklarının yüzeyinden sürekli olarak giderilmesinde, aktif çamur ve diğer aerobik atık proseslerinde yararlanılmaktadır. Bu köpüğü alınmış, yağca zengin sıvı, *C. rugosa* gibi mikroorganizmalardan elde edilmiş lipaz ile sindirilebilmektedir. Katıların arızalara olan etkisi ve atık sistemlerde yağ blokajının veya filminin temizlenmesi ve önlenmesi birçok endüstriyel işletmede önemlidir. Örneğin; lipaz, selüloz, proteaz, amilaz, inorganik besinler, buğday kepeği, vb. maddelerin bir ticari karışımı organik atıkların degradasyonunda ve kanalizasyon arıtımı, bekleme tankları, septik tanklar, gres tutucuların temizlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Atıksu arıtımı; kesimevleri, gıda işleme endüstrisi, deri endüstrisi, kümes hayvanlarının atıklarını işleme gibi endüstriyel proseslerde de gereklidir. Hem *P. aeruginosa* LP602 hücrelerinin ve hem de lipazın lipitçe zengin atıksuların arıtımında kullanışlı olduğu görülmüştür. Başlıca trigliseritleri içeren atıksu arıtma tesislerindeki yağlar genellikle tutuklanmış lipaz ile hidrolize edilebilir.

Restoran yağ atıklarının basit alkil ester türevleri biyokatalist olarak tutuklanmış lipaz kullanılarak hazırlanmıştır. *Pseudomonas cepacia*'dan elde edilen lipazın, gresin metanoliz ve etanoliz olaylarını katalizlemede en etkili olduğu bulunmuştur. Ağırlıkları ile eşit oranlarda proteaz, lipaz ve selüloz içeren endüstriyel bir karışım, toplam askıda katı madde (AKM)'de % 30-50'lik bir azalma ve çamurdaki katıların çökmesini sağlamıştır. Bitki, bakteri ve hayvan (pankreatik) orijinli lipazlar mezbaha atıksularındaki yağ partiküllerinin boyutunu küçültmek ve/veya hidrolize etmek için de kullanılmaktadır (Hasan, 2006).

3.7.14. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrileri her yıl büyük miktarda lignoselülozik biyokütle kullanmaktadır. Kağıt hamuru imalatı için teknoloji oldukça fazladır ve mikrobiyal enzimlerin uygulanması için çok sayıda imkan vardır. Tarihsel olarak enzimlerin kağıt endüstrisinde bazı kullanımları vardır, ancak bu ham nişastanın modifikasyonları gibi sınırlı alanlarda olmuştur. Lipaz kullanılan enzimatik seviye kontrol yöntemi, büyük ölçekli kağıt yapma proseslerinde rutin bir işlem olarak 1990'ların başından beri kullanılmaktadır.

Lipazın atık kağıtlardaki mürekkebi gidermede kullanılması; hamur elde etme hızının yükselmesini, beyazlık ve yoğunluğunun artmasını, kimyasal kullanımının azalmasını, ekipman ömrünün uzamasını, atıksuyun kirlilik seviyesinin azalmasını, enerji ve zamandan tasarrufu sağlamaktadır. Etilen oksit-propilen oksit boya bileşimi stearatı için mürekkep giderici bileşiğe *Pseudomonas* türlerinden (KWI-56) elde edilen lipazın ilavesi kağıdın beyazlığını iyileştirir ve mürekkep lekelerinin azalmasını sağlamaktadır (Hasan, 2006).

3.7.15. Biodizel Üretiminde Lipazların Kullanımı

Sınırlı (ve hızla azalan) fosil yakıt kaynakları, artan ham petrol fiyatları ve çevresel kaygılar gibi çeşitli nedenlerle alternatif yakıt olarak bitkisel yağların kullanımı araştırılmaktadır. Bitkisel yağdan üretilen biyodizel yakıt, kükürt oksit üretmez ve petrol ile karşılaştırıldığında oluşan kurum partikülünü üçte bir oranında azaltarak minimize eder. Bu çevresel avantajları nedeniyle, biyodizel yakıt geleneksel dizel yakıt yerine kullanılması ümit edilebilir. Yapılan bir çalışmada tutuklanmış *P. cepacia* lipazı metanol ve etanol ile soya yağının transesterifikasyonunda kullanılmıştır. Başka bir çalışmada yağ asidi etil esterleri katalizör olarak iki ticari lipaz, Novozym 435 ve Lipozyme IM, solvent olarak n-hekzan kullanılarak hint yağından hazırlanmıştır. Ayrıca Novozyme 435, solventsiz ortamda biyodizel üretimi için ham soya yağının transesterifikasyonunu katalizlemek için kullanılmıştır.

Biyodizelin önemine rağmen, mikrobiyal lipaz üretim mekanizmaları ve lipaz üretiminde indükleyici olarak kullanılan lipidik maddelerin rolü üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır (Hasan, 2006).

3.8. Mikrobiyal Enzim Üretimi

3.8.1. Mikroorganizma Seçimi

Birçok faydalı enzim, hayvan ve bitki hücrelerinden elde edilmesine rağmen, teknik ve ekonomik avantajları nedeniyle mikroorganizmalar, endüstriyel enzimler için tercih edilen kaynaktır (Miller, 1976). Mümkün olduğu kadar çok miktarda ve makul bir sürede istenilen enzimi üretmek için uygun bir organizmanın seçimi oldukça önemlidir. Bu işlemin genel görünümü şöyledir:

- Hücreyi parçalamak için gerekli metotlar zor ve maliyetli olduğu için hücre dışı enzimler tercih edilir. Hücre dışı enzimler, hücre içi enzimlerle karşılaştırıldığında, kültür sıvısı içinde nispeten saf halde bulunurlar. Hücre içi enzimler; hücreyi parçalama, bulaşan hücre bileşenlerinin ayrılmasındaki zor işlemler nedeniyle endüstriyel olarak daha az kullanılır.
- Yüksek miktarda enzim elde edilmesi kültür üretimi için gerekli ekonomik zaman içerisinde elde edilmelidir.

- Mikroorganizma türü; verimliliği, kültür şartları ve sporlama ihtiyacına göre stabil olmalıdır.
- Organizma ucuz substratlar üzerinde geliştirilebilmelidir.
- Sentetik aktivite mümkün olduğu kadar istenilen enzim yönünde olmalıdır. Yan ürünlerin oluşumu düşük olmalıdır.
- Kültür sıvısının veya ekstraktının arındırılması kolay olmalıdır.
- Mikroorganizma türü toksik maddeler üretmemeli ve toksinleri sentezleyen türlerle ilişkili olmamalıdır.

Çoğunlukla enzimler stabilite ve aktivitelerine göre tercih edilir ve bunu belirlemek özel tarama metotlarını gerektirir. Tarama için kültürler, kültür koleksiyonlarından ve doğal kaynaklardan özellikle istenilen enzimin hareket edebildiği substratça zengin kaynaklardan yeni izole edilerek elde edilmektedir (Reed, 1981).

Genellikle hücre dışı enzim üreticiler, geri kazanım ve saflaştırma işlemleri daha basit olduğu için hücre içi enzim üreticilere tercih edilmektedir. Hücre içi enzimler binlerce farklı hücre proteininden ve diğer bileşiklerden saflaştırılmak zorundadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde enzim üretimi, bir enzimin üretiminde kullanılacak mikroorganizmanın emniyetli olup olmadığını gösteren GRAS (generally recognised as safe) statüye sahip olmalıdır. Bu özellik, özellikle organizma tarafından üretilen enzim, gıda proseslerinde kullanıldığı zaman önemlidir.

Lipaz üreten mikroorganizmalar; endüstriyel atıklar, bitkisel yağ işleyen fabrikalar, süt mamülleri, petrolle kirlenmiş toprak, yağ tohumları, çürüyen gıdalar, gübre yığınları, kömür parçaları ve sıcak kaplıcalar gibi farklı habitatlarda bulunmuştur (Sharma, 2001).

3.8.2. Enzim Üretimi İçin Ortam İhtiyaçları

İyi planlanmış fermantasyon ortamı; ucuz, kolay hazırlanabilir, tutarlı bir kalitede olmalı ve biyokütle ve metabolitlerin üretimi için gerekli olan kimyasal elementlerin tümünü içermelidir (Rao, 2010). Ortam formülasyonları yapılırken biyokütle bileşimi dikkate alınmalıdır. Hücresel biyokütle % 40-50 karbon, % 30-40 oksijen, % 6-8 hidrojen ve % 3-12 azot ihtiva eder. Fosfor, sülfür ve metaller gibi diğer elementlerde hücre metabolizması için önemlidir fakat çok küçük miktarlarda mevcuttur (Pandey, 2008).

Fermantasyon ortamının mikroorganizmanın fonksiyonlarını desteklemesi istendiği için ortamın ihtiyaçları da mikroorganizmalara göre belirlenir. Bu nedenle ortam ihtiyaçları:

- karbon kaynağı,
- azot kaynağı,
- enerji kaynağı,
- mineraller,
- vitaminler gibi diğer nütrientler,
- aerobik prosesler için oksijen/hava,
- ve su'dur (Rao, 2010).

3.8.2.1. Karbon Kaynağı

Karbon kaynağı büyüme ve birincil ve ikincil metabolitlerin sentezi için gerekli olduğu kadar, hücrenin enerji ihtiyacını sağlamak içinde gereklidir. Oldukça fazla olan karbon kaynakları arasında seçim yapılırken, organizmaya ve prosesin ekonomisine uygun olan seçilmelidir (Bowers, 2008). Karbon kaynağının seçimi proses ekonomisinde özellikle ürünün üretim maliyetinin % 60-75'ini ham materyalin oluşturduğu durumlarda önemli bir rol oynamaktadır. Lipaz üretimi için karbon kaynağı olarak; yağlar, yağ asitleri, triaçilgliseroller ve tweenler kullanılmaktadır. Ayrıca melas, nişasta, mısır gibi bazı tahıllar, sakroz, glukoz, laktoz gibi bazı şekerlerden de faydalanılmaktadır.

3.8.2.2. Azot Kaynağı

Mikroorganizmalar azotu, organik ve inorganik kaynaklardan kullanamaktadır. Amonyum ve amonyum tuzları (amonyum sülfat veya nitrat gibi), tuzun tipine bağlı olarak hem asidik hem de bazik ortamları sağlayan genel inorganik azot tuzları kaynağıdır. Amonyum tuzları tükendiği zaman; amonyum sülfat asidik bir ortam oluştururken, amonyum nitrat bazik bir ortam oluşturmaktadır. Organik azot kaynakları; aminoasitler, proteinler veya üredir. Mikroorganizmalar, organik azot varlığında daha hızlı büyüeyebilirler ve bazı mikroorganizmalar amino asitlere mutlaka ihtiyaç duyarlar. Saf aminoasitlerin kullanılması oldukça pahalıdır. Bu nedenle amino asitler yerine bazı prekürsörlerin kullanımı tercih edilmektedir. Protein veya aminoasitleri sağlayan bazı azot

kaynakları; mısır sıvısı, soya unu, soya fasulyesi, maya özütü, balık unu, pamuk kozası unu, kazein hidrolizat ve mezbaha atıklarıdır (Hill, 2010).

3.8.2.3. Enerji Kaynağı

Enerji ortam bileşenlerinin oksidasyonunda ya da ışıktaki meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar için gereklidir. Fotosentetik bakteri ve algler, ışık enerjisinden faydalanırlar fakat mikroorganizmaların çoğu karbon kaynaklarından enerji sağlayan kemo-organotrofturlar. Karbonhidratlar, lipitler ve proteinler enerji elde edilen genel kaynaklardır. Adenozintrifosfat (ATP) hücrelerde enerji transformasyonlarında en önemli bileşenlerdir. ATP, bazı elverişsiz reaksiyonların oldukça hızlı devam etmesine imkan vermektedir. Fungus, maya ve heterotrofik bakteriler, organik bileşiklerin oksidasyonu ile ATP oluştururken, ototrofik bakteriler ortamdaki inorganiklerin oksidasyonu ile ATP sağlarlar (Hill, 2010).

3.8.2.4. Mineraller

Magnezyum ve fosfor gibi mineraller, ATP'yi içine alan tüm enerji transferi reaksiyonları ile ilişkili olduğu için ortamda bulunması önemlidir. Ayrıca potasyum, sülfür ve kalsiyum gibi diğer mineraller de önemlidir. Bu mineraller hücrelerin çoğunda önemli miktarlarda bulunurlar. Demir, kobalt, çinko, manganez ve molibden gibi bazı diğer mineraller de iz miktarlarda gereklidir, fakat ortam bileşimindeki safsızlıklar olarak mevcuttur. Bu mikronütrientler hücreler için gereklidir (Hill, 2010).

3.8.2.5. Diğer Nütrientler

Ortamda gerekli olan diğer nütrientler genellikle bazı vitaminlerdir. Vitaminlerin bazıları veya çoğu genellikle karbon ve azot kaynaklarında mevcuttur (Hill, 2010).

3.8.3. Fermantasyon Yöntemleri

Diğer fermentasyon proseslerinde olduğu gibi mikroorganizmalar ile enzim üretimi için uygun nütrient bileşimi steril bir ortama saf kültür halinde aşılır ve oksijenin varlığı veya yokluğunda kontrol edilen sıcaklıklarda inkübasyon yapılır. Ticari enzimlerin çoğu aerobik organizmalardan üretilir (Miller, 1976). Endüstriyel enzim üretimi daldırmalı veya katı hal fermentasyonu yöntemleri ile yapılmaktadır. Daldırmalı fermentasyon; proses kontrolü ve iyi verimde hücre dışı enzim elde edilmesinde avantajlara sahip olması nedeniyle enzim endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fermantasyon sonucu oluşan ürünler, nispeten seyreltiktir ve bu nedenle de yüksek miktarda atık (çamur) oluşturmaktadır. Katı hal fermentasyonu ise alternatif olarak geliştirilmiş olup, lipaz ve esterazları kapsayan çeşitli enzimleri üretmek için ekonomik bir yol sağlayabilmektedir (Balaji ve Ebenezer, 2008, Edwinoliver vd., 2010, Sun ve Xu, 2008, Nagy vd., 2006).

3.8.3.1. Daldırmalı Fermantasyon

Enzimlerin endüstriyel üretimlerinin çoğu, genellikle genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanıldığı daldırmalı fermentasyon ile gerçekleştirilmektedir. Daldırmalı fermentasyon için biyoreaktörler kullanılmaktadır ve çeşitli parametreler (pH, sıcaklık, havalandırma gibi) sürekli olarak kontrol edilmektedir. Bu proseslerde kütle transferi ve ısı gideriminde herhangi bir sorunla karşılaşilmamaktadır. Büyük hacimli endüstriyel enzimler 50-500 m³'lük fermentörlerde üretilmektedir. Daldırmalı fermentasyonda mikroorganizmalarda temas halinde olan ortam sıvıdır ve fermentasyonda oksijen desteği gereklidir.

Daldırmalı fermentasyonda mikroorganizmaların gelişimi için kesikli kültür, beslemeli kesikli kültür, perfüzyon kesikli kültür ve sürekli kültür olmak üzere dört ana yol vardır. Kesikli kültürde mikroorganizmalar, ortama sabit hacimde aşılır. Beslemeli kesikli kültür olması durumunda konsantre nütrient bileşimi kesikli kültüre tedrici olarak ilave edilir. Perfüzyon kesikli kültürde, kültür ilavesi ve kullanılan hücresiz ortamın eşit hacimde geri alınması sağlanır. Sürekli kültürde ise taze ortam, ürünü içeren ortamın alınmasının yerini tutacak şekilde mikrobiyal büyümenin üstel fazı süresince kesikli

sisteme ilave edilir. Sürekli kültürasyon; nütrientler, metabolitler, hücre miktarı veya biyokütlede az dalgalanma sayesinde dengeli bir büyüme sağlanmaktadır.

Hücre dışı enzimler, genellikle ultrafiltrasyon ile (vakum silindir filtrasyon, ayırıcılar veya mikrofiltrasyon ile) hücre giderildikten sonra geri kazanılır. Gerekli olması halinde saflaştırma işlemi iyon değiştirme veya jel filtrasyon ile yapılır. Nihai ürün ya tuzlar gibi nihai koruyucular içeren konsantre olmuş sıvı ya da alternatif olarak toz olmayan kuru ürüne (granül halinde) öğütülür (Soataert ve Vandamme, 2010).

3.8.3.2. Katı Hal Fermantasyonu

Katı hal fermantasyonu, serbest suyun yokluğunda (veya çok az) katıların fermantasyonu olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte substrat, mikroorganizmanın gelişimi ve metabolizması için yeterli derecede neme sahip olmalıdır (Pandey, 2003). Katı maddelerin aerobik mikrobiyal dönüşümü veya katı substrat fermantasyonu aşağıdaki özelliklere göre tanımlanmaktadır:

- Katı substrat, biyolojik olarak parçalanabilen veya parçalanmayan, 10^3 - 10^6 m²/cm³ aralığında olan birim hacim başına büyük bir yüzey alanına sahip, katı/gaz arafazında mikrobiyal büyümeye elverişli katı gözenekli bir matrisdir.
- Bu matris, biyokimyasal proseslerde yüksek miktarlara imkan vermesi için katı/gaz arafazında nispeten yüksek su aktivitesine sahip, kendi kuru ağırlığının bir veya birkaç katına kadar suyu absorblayabilmelidir.
- Diğer gazlar ve aerosoller ile oksijenin hava karışımı, nispeten düşük basınç altında akabilmelidir ve fermente olan kütle ile karışmalıdır.
- Katı/gaz arayüzeyi ya saf ya da karışık halde küf, maya veya bakterilerin belirli kültürlerinin hızlı gelişimi için iyi bir habitat olmalıdır.
- Katı matrisin mekanik özellikleri fermantasyon prosesi için istenildiği gibi basınçlı veya yumuşak karıştırmaya dayanıklı olmalıdır. Bu, birbirlerinin kırılmasına ya da bağlanmasına neden olmayan küçük granül veya lifli partiküller gerektirir.
- Katı matris mikrobiyal aktivitenin inhibitörleri ile kirlenmiş olmamalıdır ve karbonhidratlar (selüloz, nişasta, şeker), azot kaynakları (amonyak, üre, peptidler) ve mineral tuzlar gibi kullanılabilir mikrobiyal gıda maddeleri içermeli veya absorbe edebilmelidir (Raimbault, 1998).

Katı hal fermantasyonunun tipik örnekleri; Japonya’da “koji” olarak adlandırılan katı substrat olarak buhar verilmiş pirinç, Endonezya’da "Tempe" veya Hindistan’da "ragi" olarak adlandırılan, katı substrat olarak buhar verilmiş ve kırılmış bakla tohumları, Fransa’da "mavi damarlı peynir" elde edilmesinde substrat olarak delikli taze peynirin kullanıldığı fermantasyonlardır (Raimbault, 1998, Couto ve Sanroman, 2005).

Katı hal fermantasyonunda ana aşamayı uygun substratın seçimi oluşturmaktadır. Substrat seçimi ise, ilgili enzime bağlıdır. Katı madde hem fiziksel destekleyici hem de nütrient kaynağı olarak davranan çözünmeyen bir materyaldir. Bu madde tarımsal ürünler, tarım endüstrisi atıkları veya inert destekleyiciler (örneğin poliüretan köpük) gibi doğal olarak oluşan katı substratlardır (Pandey, 2003). Farklı araştırmacılar tarafından buğday kepeği (Uvarani vd., 1998), pirinç kepeği (Rao vd., 2003), soya unu (Han, 2003), badem unu (Ul-Haq vd., 2002), şeker kamışı (Babu ve Rao, 2007), zeytinyağı keki (Cordova vd., 1998) gibi substratlar lipaz üretiminde substrat olarak kullanılmıştır.

Katı substratlar, genellikle birim hacimleri başına geniş yüzey alanına sahiptir. Daha küçük substrat partikülleri, mikrobiyal etkinlik için daha büyük yüzey alanı sağlarken, partiküller arasındaki mesafe sınırlamalarına bağlı olarak havalandırmada zorluklara neden olmaktadır. Daha büyük partiküller ise, daha iyi havalandırma sağlarken, daha düşük yüzey alanına neden olurlar. Biyoproses optimizasyonunda bazen maliyet etkinliği için farklı boyutlardaki partikül karışımlarını kullanmak gerekebilir. Örneğin, katı hal fermantasyonunda en yaygın kullanılan buğday kepeği, ince ve kalın olmak üzere iki formda kullanılmaktadır. Katı hal proseslerinin çoğunda optimum üretim için bu iki form farklı oranlarda karıştırılarak kullanılır.

Substratın nem içeriği katı substrat proseslerinde önemli bir husustur. Genellikle, substrat nem içeriği % 30-80’dir. Yüksek nem seviyesi; substrat partiküllerinin bir araya toplanmasına, zayıf havalandırma ve olası anaerobik koşullara yol açmaktadır. Yaygın bir substrat olan haşlanmış pirinç, nem seviyesi % 30-35’i aştığında yapışkan hale gelmektedir. Optimum nem içeriği mikroorganizma ve substrata bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan mantarlar için optimum nem ihtiyacı % 40-80 arasında değişmektedir. Farklı substratlarda büyüyen aynı organizma için optimum nem seviyesi çok farklı olabilir; bu nedenle, tek başına nem yüzdesi büyüme tahmininde güvenilmezdir ve su aktivitesi bunun yerine tercih edilmektedir. Su aktivitesi (a_w) ya da substratın bağıl nemi; substratın sıcaklığında, substrattaki suyun buhar basıncının saf suyun buhar basıncına oranıdır. 0.9’un altındaki su aktiviteleri birçok bakterinin büyümesini desteklemez, fakat maya ve mantar

0.7 ve daha büyük su aktivitelerinde büyüyebilirler. Su aktivitesi büyümeyi etkilemesine ek olarak, ürün oluşumu da etkilemektedir. Üretilen ürünün yelpazesi (spektrumu) ve aroması gibi özellikler de su aktivitesinden etkilenir.

Katı hal fermantasyonlarında maksimum mikrobiyal biyokütle konsantrasyonu 10-30 kg/m³ olarak, daldırmalı kültürde tipik olarak görülen 40-50 kg/m³'den daha düşüktür. Ancak su miktarının az olması, fermante olan kütle başına ısı üretiminin katı hal fermantasyonlarında daha büyük olmasına yol açar. Isıyı absorbe edecek az su olduğu için sıcaklık tekrar hızla yükselebilir. Sonuç olarak, özellikle büyük ölçekli fermantasyonlarda sıcaklık kontrolü zor olmaktadır. Metabolik ısının gideriminde özellikle gözenekli fermantasyon kütlesi, zayıf ısı iletkenliği nedeniyle bazen önemli sınırlamalara neden olmaktadır. Fermantasyon sırasında sıcaklık kontrolü çoğunlukla buharlı soğutma ile sağlanır, dolayısıyla kuru hava daha iyi bir soğutma etkisi sağlamaktadır.

Katı hal fermantasyonları substratın hazırlanması sırasında yapılan ayarlamaların dışında pH, kontrolsüz olarak uygulanmaktadır. Birçok bakterinin aksine, maya ve mantarlar daha asidik şartlara genellikle daha toleranslıdır. Başlangıçtaki ayarlamaların dışında, substratların tamponlama kapasitesinin fermantasyon sırasında pH'daki büyük değişiklikleri kontrol ettiğine itimat edilmektedir. Birçok substrat etkili tampondur. Bu, özellikle protein açısından zengin sustratlar açısından, esasen protein deaminasyonu az ise, doğrudur. Bazı pH stabiliteyi substrattaki azot kaynağı olarak üre ve amonyum sülfat bir arada kullanarak elde edilebilir. Ürenin ayrışması, pH artışına neden olan NH₄⁺ halini almak için bir proton alarak amonyak üretir. Bu etki amonyum iyonunu alan hücrelerden protonun çıkması ile karşılanırken, NH₃ olarak proteinlerin bünyesine katılabilir. Amonyum alımı hızlı asidifikasyona neden olmaktadır. Protein veya amino asit bakımından zengin olan ortamda, deaminasyon pH artışına katkıda bulunabilir. Fermantasyon sırasında pH stabilitesine dikkat etmek, belirli prosesler için özellikle önemli olmaktadır. Enzimler ve bazı ikincil metabolitlerin kararlılığı; üretim hızı, pH değişiklikleri ile etkilenmemesine rağmen, pH'a bağımlıdır ve genel proses verimliliği ürünün yok oluşu nedeniyle azalabilir (Flickinger ve Drew, 1999).

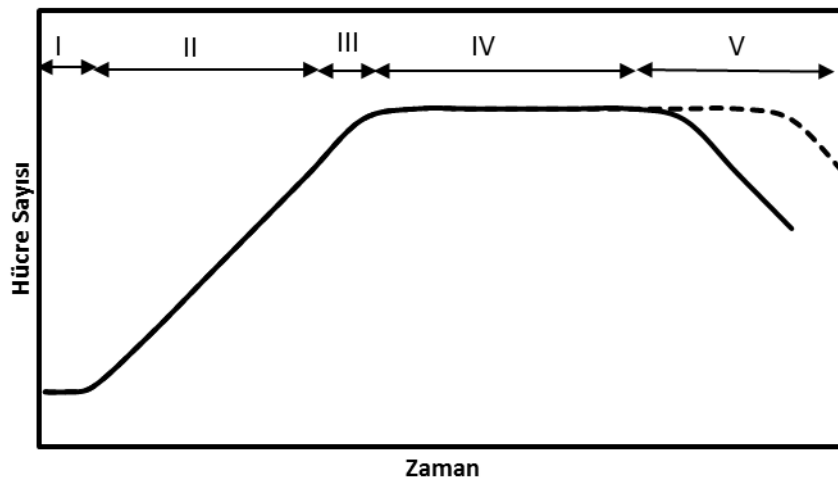
Tablo 3.4'de daldırmalı ve katı hal fermantasyonu karakteristik özelliklerine göre karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.4. Daldırmalı ve katı hal fermantasyonu arasındaki farklar (Rao, 2010).

Karakteristik özellik	Katı hal fermantasyonu	Daldırmalı fermantasyon
Mikroorganizma ve substrat şartları	Durgun	Çalkalamalı
Substratın durumu	Ham	İşlenmiş
Su mevcudiyeti	Sınırlı	Yüksek
Oksijen kaynağı	Difüzyon ile	Kabarcık/serpme ile
Oksijenle temas	Doğrudan	Çözünmüş oksijen
Fermantasyon ortamı ihtiyacı	Az	Fazla
Enerji ihtiyacı	Düşük	Yüksek
Kinetik çalışmalar	Kompleks	Kolay
Sıcaklık ve konsantrasyon gradyenleri	Aşırı	Sorunsuz
Reaksiyon kontrolü	Zor	Kolay
Bakteriyel bulaşma olasılığı	İhmal edilebilir	Yüksek
Bertaraf edilecek sıvı miktarı	Düşük	Yüksek
Kirlilik problemleri	Düşük	Yüksek

3.8.3.3. Kesikli Kültürlerde Mikrobiyal Büyüme

Mikroorganizmalar hücre bölünmesiyle çoğalırlar ve uygun gelişme ortamına aşılınmış bir organizma inkübasyon sırasında lag fazı, logaritmik (üstel) faz, yavaşlama fazı, durağan faz ve ölüm fazı olmak üzere beş aşamadan geçmektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kesikli kültürde mikrobiyal büyüme eğrisi (I: lag fazı, II: logaritmik faz, III: yavaşlama fazı, IV: durağan faz, V: ölüm fazı) (Kargı, 1980).

Başlangıç (lag) fazında kültür yerleşir ve çoğalmaya başlar. Lag fazı; organizmaya, ortama ve inkübasyon şartlarına bağlı olarak uzun veya kısa olabilir. Lag fazının uzaması; gelişme ortamı kültürü büyütmek için kullanılan kompozisyondan dikkate değer derecede farklılık gösterdiğinde kültür, aktif olarak gelişme aşamasını geçtiğinde ya da vegetatif hücre aşılması yerine spor aşılması kullanıldığında yaşanmaktadır. Başlangıç lag fazı erlenlerde, steril şartların sürdürülmesinde sorun olmadığı için laboratuarda genellikle az önem taşır ve fermentasyon zamanı önemli değildir. Fakat tesislerde bu aşamayı en aza indirmek veya elimine etmek arzu edilmektedir. Çünkü büyük kültür kaplarında bulaşmayı önlemek sürekli bir problemdir ve fermentasyon zamanı tesis ekipmanlarının etkili kullanımı için çok önemlidir. Üretim fermantöründe kullanıldığı gibi aynı kompozisyonu aşılama ortamında kullanarak ve aktif olarak büyüyen kültürlerin aşılması yapılarak, tesis fermantörlerindeki lag aşaması tamamen elimine edilebilir.

Logaritmik veya üstel büyüme aşamasında çoğalma hızlanır. Bu aşama esnasında organizmaların tamamen canlı (yaşayabilir) ve hepsinin eşit güçte olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber, inhibitör ürünlerin akümüasyonu ya da gerekli nütrientlerin tükenmesi gibi kısıtlayıcı mekanizmalar, maksimum popülasyon yoğunluğuna ulaşmadan önce ortaya çıkmaya başlamaktadır. Ališılmış kesikli fermentasyonda büyüme sınırı, ortamın kompozisyonu ve hacmiyle belirlenmektedir. Fakat yine de, eğer kültüre devamlı olarak taze ortam ilave edilirse sürekli logaritmik fazda büyümeyi hemen hemen süresiz uzatmak mümkündür. Bu elbette sürekli fermentasyon prosedürlerinin temelidir.

Logaritmik fazı izleyen durağan fazda hücre popülasyonu yaklaşık olarak sabit kalır. Bazı hücreler bölünmeye devam edebilir, bazıları canlı olmalarına rağmen statik kalırlar ve diğerleri ölebilir. Her bir hücrenin gücünde ve metabolizmalarının tipi ve hızında dikkate değer derecede farklılıklar vardır.

Yavaşlama fazında, hücre bölünmesi yine devam eder fakat giderek azalan bir hızdadır ve oluşan yeni hücrelerin sayısı ölen hücrelerin sayısından kat kat azdır. Son aşama canlı kalma aşamasıdır. Hiç bir yeni hücre oluşmasın diye hücre bölünmeleri tamamen durur. Sadece daha önce oluşmuş hücreler canlı kalmaya devam eder ve eninde sonunda ölürlür. Bu nedenle zamana karşı çizilen hücre miktarı eğrisi seviye kaybeder ve sonunda horizontal bir eksene dönmektedir.

Enzim birikimi süresince her bir organizma ve enzime bağlı olarak büyüme aşamasında büyük değişkenlikler vardır. Lag fazı hariç, herhangi bir aşamada istenilen enzim görülebilir. Örneğin, bazı bakteriyel proteinazlar logaritmik aşama sırasında hızla ve

neredeyse tamamı meydana gelirken, bakteriyel amilazların üretimi çoğunlukla durağan faz süresince oluşur. Bazı durumlarda hücre dışı enzimler logaritmik fazın ilk bölümü sırasında görünmeye başlayabilir ve daha sonraki aşamalarda miktar olarak artmaya devam eder. Hücre içi enzimler, muhtemelen önemli ölçüde logaritmik aşama sırasında üretilirler fakat sadece yavaşlama fazı sırasında hücreler kaybolurken ortama bırakılırlar. Bundan dolayı, hücre içi enzimlerin geri kazanımı en iyi şekilde logaritmik aşamanın sonunda hücreler alınarak sağlanmata ve sonra enzim sulu çözeltiden; yok etme, mekanik öğütme veya ultrasonikasyon yoluyla serbest bırakılmaktadır.

Fermentasyon sırasında üretilen enzimin konsantrasyonu maksimum seviyeye çıkmaktadır. Enzime bağlı olarak konsantrasyonu dikkate değer bir süre sabit kalabilir veya yavaş ya da hızlı bir şekilde azalabilir. Bir fermentasyonda yavaş ya da hızlı bir şekilde enzim konsantrasyonu azaldığı zaman iyi enzim verimleri elde etmede ciddi geri kazanım problemleri olmaktadır.

Hem laboratuarda hem de tesislerde enzimi almada, optimum zaman problemleri ve etkili enzim geri kazanım metotları, mikrobiyal büyümenin ve enzim oluşumu ve stabilitesinin değişik faktörlerinden etkilenmektedir. Laboratuarda genellikle büyük ölçekli fermentasyonlardan daha uzun fermentasyon süresi gerekmektedir. Organizmaya ve istenilen enzime bağlı olarak laboratuarda 2 ile 14 günlük fermentasyon süreleri yaygınken, tesislerde benzer fermentasyonlar sadece 12 saat ile 6 gün içerisinde gerçekleşmektedir.

Laboratuarda enzim üretimi için küçük hacimler kullanılır. Böylelikle maksimum enzim üretimine ulaşıldığında, kültürler alınabilir ve basit metotlarla enzim geri kazanılabilir. Bunun için dakikalar veya birkaç saat gerekir. Oysa tesiste, büyük bir kesikli prosesinde; filtreleme, konsantre etme, çöktürme, geri kazanım ve kurutma işlemlerinin her biri için saatler gerekmektedir. Gerçekte bir mikrobiyal enzim üretim prosesini ölçeklendirmede karşılaşılan en önemli problemler, genellikle fermentasyonda değil, daha ziyade onu izleyen geri kazanım aşamalarında olmaktadır.

3.9. *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens, üstel büyüme fazında rodları 0.7-0.8 µm ile 2.3-2.8 µm arasında değişen, yaşlı kültürlerde daha kısa ve ince olabilen gram-negatif bir bakteridir. Tek veya çift halinde çoğalabilir. Polar multitrik flagellasyon ile hareket eder, bezende hareketsizdir.

Kültürleri, özellikle demir olmayan ortamlarda dağılabilir, floresan pigmentler üretir. Bazı suşları dağılmayan mavi pigmentler üretmektedir.

Organik büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaz. Farklı suşları 80'den fazla farklı karbon kaynağı kullanabilir. Denitrifikasyon yeteneğine sahip ve nitratlı ortamda anaerobik şartlarda büyüeyebilen suşları dışında zorunlu aerobiktir. Optimum büyüme sıcaklığı 25-30 °C'dir. Bazı suşları 4 °C veya altında büyüeyebilirlerken, 41 °C'de büyüeyemezler. Toprak ve sudan, ayrıca çeşitli karbon kaynakları ile zenginleştirilmiş aerobik ortamda inkübe edildikten sonra izole edilebilirler. Ayrıca *P. fluorescens* genel olarak gıdaların bozulmasına (yumurta, balık, süt ve et) neden olur (Buchanan ve Gibbons, 1974).

Biyotip I, II, III ve IV olmak üzere dört farklı biyotipi vardır. Genel olarak Biyotip I lipolitik, Biyotip II lipolitik değildir, diğer biyotipler için ise lipolitik özellik değişkendir.

3.10. Biyoreaktörde Oksijen Transferi

Aerobik biyoproseslerde oksijen, sulu çözeltilerde düşük çözünürlüğüne bağlı olarak anahtar bir substrattır ve sürekliliğinin sağlanması gereklidir. Yeterli oksijenin sağlanması ve karbondioksitin giderimi, aerobik biyoreaktörlerin tasarımı ve işletilmesinde önemlidir. Biyoreaktörlerde gaz-sıvı kütle transferi hacimsel oksijen transfer katsayısı, k_La ve oksijen tüketim hızı, r_o , terimleri ile karakterize edilir. k_La ve r_o değerlerinin hassas bir şekilde bilinmesi biyoreaktörün tasarımı ve işletimi için gereklidir. Bu değişkenler; sıvı besiyerinin viskozite ve yüzey gerilimini, biyokütlenin konsantrasyonu ve morfolojisini, biyoreaktör hidrodinamiklerini ve havalandırma hızını içine alan birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Biyolojik sistemlerde k_La değerlerinin öngörülmesi zordur, dolayısıyla kültür sıvısında ölçülen veriler çeşitli amaçlar için gereklidir.

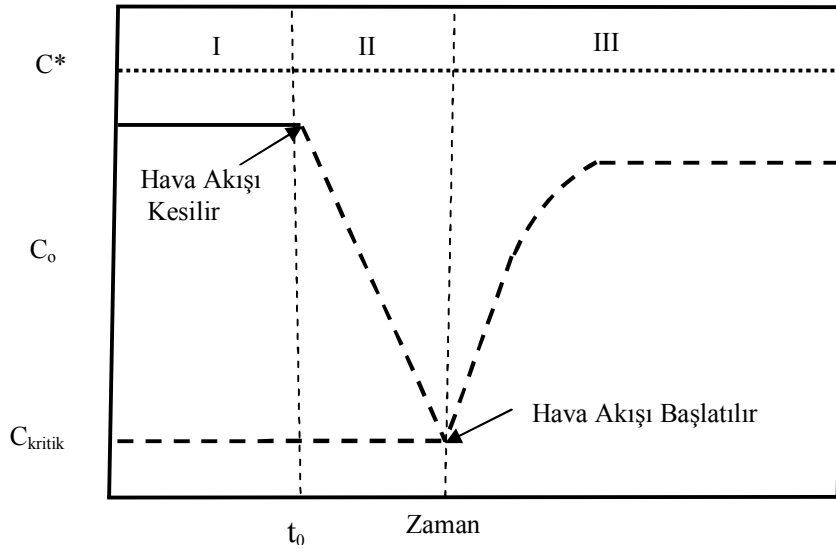
k_La' yı ölçmek için çeşitli yöntemler bulunmaktadır, fakat bunlardan birkaçı biyolojik sistemlerde işletme süresince ölçümler için uygulanabilmektedir. İnkübasyon süresince k_La' yı ölçmek için en sık kullanılan yöntemlerden biri, iyi bilinen dinamik metottur. Yöntem zaman profillerine karşı, çözünmüş oksijen konsantrasyonunun ölçümüne dayanmaktadır. İlk adımda, biyoreaktöre verilen gaz akışı durdurulur ve mikrobiyal alımla azalan oksijen hızı, oksijen tüketim terimini belirlemek için ölçülür. Daha sonra, gaz akışı başlangıç işletme değerine geri getirilir ve zamanla çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki artma, k_La değerini hesaplamak için kullanılır. Çözünmüş oksijen hassas elektrotlar kullanılarak ölçülmektedir. Dinamik ölçüm hava akımının kesilmesini

gerektirir. Bu, ölçüm sırasında biyoreaktör hidrodinamiklerini etkilemektedir. Dinamik metotta oksijen tüketimi teriminin hidrodinamik rejim değişikliklerinden etkilenmediği varsayılmaktadır (Lopez vd., 2006).

Dinamik metotta yatışkın olmayan durumda oksijenin kütle dengesi Eşitlik (3.1.) ile gösterilmektedir.

$$\frac{dC_o}{dt} = k_L a (C_o^* - C_o) + r_o \quad (3.1)$$

Burada; C_o^* : Havadaki oksijenin kısmi basıncı ile dengede olan sıvıda çözünmüş oksijen konsantrasyonunu (mg/L), C_o : Biyoreaktörde ölçülen zamanda çözünmüş oksijen konsantrasyonunu (mg/L), $k_L a$: Hacimsel oksijen transfer katsayısını (s^{-1}), r_o : Oksijen tüketim hızını (mg/L/s) göstermektedir.



Şekil 3.3. Dinamik metotta göre çözünmüş oksijen konsantrasyonunun değişimi (Ochoa ve Gomez, 2009).

Dinamik metotun tipik şekli olan Şekil 3.3'de görülebileceği gibi, t_0 anında reaktördeki hava akış hızı durdurulduğu zaman çözünmüş oksijen konsantrasyonu, C_o , azalır ve ikinci kısımda oksijen transferi olmayacağı için eşitlik (3.1), eşitlik (3.2)' ye dönüşür.

$$\frac{-dC_o}{dt} = r_o \quad (3.2)$$

Eşitlik (3.2) kullanılarak, ikinci kısımda oksijen tüketim hızı, r_o , hesaplanabilir. Hava akışı tekrar başlatıldığı zaman, üçüncü kısımda görüldüğü gibi C_o , zamanın bir fonksiyonu olarak artmaktadır. Burada eşitlik (3.1) geçerli olur ve eşitlik (3.1) ve (3.2)'den faydalanılarak eşitlik (3.3) elde edilir.

$$C_o = -\frac{1}{kLa} \left(\frac{dC_o}{dt} - r_o \right) + C_o^* \quad (3.3)$$

Burada C_o 'a karşı $(dC_o/dt - r_o)$ grafiğe geçirilerek, eğrinin eğiminden kLa değeri hesaplanabilir.

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Mikroorganizma Üretimi

Deneyisel çalışmalarda American Type Culture Collection (A.T.C.C)'den temin edilen *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-2641) bakterisi kullanılmıştır. *P. fluorescens* çalışmalarda kullanılmak üzere laboratuarda üretilmiştir. Liyofilize halde getirilen bakteri kültürü, önce içinde nütrient agar ortamı bulunan petri kutuları ve tüplerde 30 °C'de etüvde üretilerek aktifleştirilmiş, daha sonra bu ortamlardan bileşimi Tablo 4.1.'de verilen zengin sıvı besin ortamlarına aktarılmıştır.

Tablo 4.1.'deki bileşime sahip besiyerinden 250 ml'lik erlenlere 100 ml ilave edilerek, erlenlerin ağzıları pamuk tıkaç ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavlanarak steril edilmiştir. Üretime hazırlanan besiyerleri steril koşullarda oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Daha sonra steril koşullarda *P. fluorescens*'in ekimi yapılmıştır. *P. fluorescens*, 30 °C sıcaklık ve pH 7'de, 150 rpm karıştırma hızında çalışan orbital inkübatörde 24 saat süre ile kesikli karıştırılmalı tepkimeli kapta üremesi sağlanmıştır. Üretilmiş olan mikroorganizma, 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Buzdolabında saklanan mikroorganizma 15 günde bir zengin besin ortamlarına 1/10 oranında nakledilerek mikroorganizmanın aktifliğini koruması sağlanmıştır.

Tablo 4.1. *P. fluorescens*'in üretiminde kullanılan zengin sıvı besiyerinin bileşimi

<i>P. fluorescens</i>	
Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Glukoz	5
Maya özütü	1
Bakteriyolojik pepton	1
K ₂ HPO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
(NH ₄) ₂ .SO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.005

4.2. Enzim Üretim Ortamı

Enzim üretim çalışmalarında kullanılan besiyerinin bileşimi Tablo 4.2’de verilmiştir. Kesikli düzende daldırmalı kültürde yürütülen fermantasyon çalışmaları; 500 mL’lik, 150 mL çalışma hacmine sahip erlenlerde (135 mL besiyeri + 15 mL mikroorganizma), katı substratın kullanıldığı deneyler ise 250 mL’lik, 100 mL çalışma hacmine sahip erlenler de (90 mL besiyeri + 10 mL mikroorganizma) yürütülmüştür. Erlenler sabit karıştırma ve çalkalama hızına sahip orbital inkübatöre yerleştirilmiş ve belli bir süre fermantasyona tabi tutulmuştur. Tüm deneylerde zengin besiyerinde üretilen mikroorganizmalar, 1/10 oranında enzim üretim ortamına ilave edilmiş, fermantasyon çalışmaları 30 °C sıcaklık, pH 6 ve 150 rpm karıştırma hızında yapılmış ve lipaz üretimine çeşitli parametrelerin etkisi incelenmiştir.

Zengin besiyerinde (ön çoğaltma ortamı) bir gün öncesinden 24 saat süre ile üretilen *P. fluorescens*, Tablo 4.2.’de verilen lipaz üretim ortamına aktarılmıştır. Lipaz üretim ortamı 121 °C’de otoklavda 15 dakika tutularak steril lenmiştir. Sterillenerek üretime hazırlanan besiyerlerine *P. fluorescens*’in ekimi yapılmıştır. Ekim işleminin gerçekleştirildiği çevre, ekimden belli bir süre önce UV lambası kullanılarak sterilize edilmiştir. Ekimler bek alevi karşısında, sterilizasyonun bozulmayacağı şekilde yapılmıştır.

Tablo 4.2. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı

<i>P. fluorescens</i>	
Bileşen	Konsantrasyon (%)
Glukoz	0.1
Maya özütü	0.1
K ₂ HPO ₄	0.05
KH ₂ PO ₄	0.05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.005

Deneylerde katı substrat olarak kullanılan ayçekirdeği küspesi, Manisa Doğa Organik Gıda A.Ş. firmasından temin edilmiştir. Öğütülmüş halde olan küspe, az olan neminin (% 7) gitmesi için, 60 °C’de 24 saat süre ile kurutulmuştur. Daha sonra elek analizi yapılmış

ve farklı boyutlara getirilerek (20-100 mesh arası, +20 mesh) deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır. Ayçekirdeği küspesine ait özellikler Ek 6'da verilmiştir.

4.3. Analitik Yöntemler

P. fluorescens ile yapılan lipaz enzimi üretim çalışmalarında belli aralıklarla fermantasyon ortamından alınan numuneler (0, 3, 6 saat ,...), 5000-6000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek mikroorganizmadan ayrılmıştır. Elde edilen sıvı kısım enzim kaynağı olarak kullanılarak, lipaz aktivitesi ve diğer parametreler belirlenmiştir. Tüpte kalan mikroorganizma kütlesi ile mikroorganizma gelişimi takip edilmiştir.

4.3.1. Mikroorganizma Konsantrasyonu Tayini

Mikroorganizma konsantrasyonu, UV-spektrofotometrede türbidimetrik olarak absorbans ölçümüyle belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan mikroorganizma çözeltilerinin 400 nm dalga boyunda absorbanslarının okunmasıyla yaş mikroorganizma kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Yaş ve kuru ağırlık arasındaki ilişkiyi belirlemek için mikroorganizma etüvde kurutulduktan sonra, kuru ağırlığa karşı yaş ağırlık grafiğe geçirilerek, yaş-kuru ağırlık kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve bu kalibrasyon doğruları kullanılarak kuru mikroorganizma ağırlığı g/L olarak belirlenmiştir (Ek 1).

4.3.2. Lipaz Aktivite Tayini

Elde edilen lipaz enziminin aktivitesi, sürfaktan içermeyen zeytinyağı emülsiyon yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir (Rosu ve diğ., 1997, Elibol vd., 2008). 250 mL'lik erlenlere 1 mL zeytinyağı (Riviera tipi), 0.5 mL 0.1 M CaCl₂, 3 mL Tris-HCl tamponu (pH 8) ve 5 mL saf su ilave edildikten sonra erlenler su banyosuna yerleştirilmiştir. 37 °C' de 10 dakika çalkalandıktan sonra erlenlere 1 mL lipaz enzimi eklenmiş ve 20 dakika daha çalkalama işlemine devam edilmiştir. Bu süre sonunda erlenlere 20 mL aseton:etanol (1:1, v/v) katılarak enzim denatüre edilmiştir. Karışım daha sonra 0.01 M NaOH ile pH 10'a kadar titre edilmiştir. Aynı koşullarda enzim bulunmayan kör denemede yürütülmüştür. Enzim aktivite değerleri aşağıda verilen Eşitlik 4.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Lipaz Aktivitesi (U/ml)} = \frac{(V_0 - V_k) * N * 1000}{20} \quad (4.1)$$

V_0 = Örnek için sarf edilen NaOH hacmi (mL)

V_k = Kör için sarf edilen NaOH hacmi (mL)

N = NaOH konsantrasyonu (mol/L)

Bir ünite (U) lipaz aktivitesi, 1 dakikada zeytinyağından enzim tarafından açığa çıkarılmış yağ asitlerinin μmol miktarı olarak belirtilmiştir.

Spesifik lipaz aktivitesi, enzim aktivitesinin toplam protein miktarına bölünmesiyle hesaplanmıştır (Eşitlik 4.2).

$$\text{Spesifik lipaz aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{U/mL enzim}}{\text{mg protein/mL enzim}} \quad (4.2)$$

4.3.3. Protein Konsantrasyonu Tayini

Üretim ortamındaki protein miktarı Lowry yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir (Lowry vd, 1951). Bu yöntemde kullanılan reaktifler ve yöntemin uygulama aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. Reaktif 1: % 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Reaktif 2: % 2 Na-K-Tartarat, Reaktif A: 0.1 N NaOH içinde % 2'lik Na_2CO_3 ; Reaktif B: 1 mL Reaktif 1 + 1 mL Reaktif 2 alınarak, 100 mL'ye Reaktif A ile tamamlanır. Reaktif C: Folin Ciocalteu fenol reaktifi 1/1 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
2. Örnek tüplerine 0.5 mL seyreltilmiş örnek, kör tüpüne de 0.5 mL saf su koyulmuştur.
3. Tüm tüplere 2.5 mL reaktif B eklenmiştir.
4. Karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
5. Tüm tüplere 0.25 mL Reaktif C eklenmiştir.
6. Karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
7. Absorbanslar 660 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur.
8. Protein miktarları oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi yukarıda belirtilen aşamalara göre bovine serum albuminin (BSA) konsantrasyonları bilinen örneklerinden yararlanılarak hazırlanmıştır (Ek 2).

4.3.4. Glukoz Tayini

Mikroorganizmanın tüketmediği toplam indirgenmiş şeker (glukoz) miktarını belirlemek için Miller tarafından önerilen DNS (dinitrosalisilik asit) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (Miller, 1959). Bu yöntemde DNS çözeltisinin hazırlanması ve yöntemin uygulama aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. DNS çözeltisi; % 1 DNS, % 0.2 fenol, % 0.05 sodyum sülfid, % 1 sodyum hidroksit, % 30 sodyum potasyum tartarat karıştırılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
2. Örnek tüplerine 0.5 ml seyreltilmiş örnek, kör tüpüne de 0.5 mL saf su koyulmuştur.
3. Tüm tüplere 0.5 mL DNS çözeltisi eklenmiştir.
4. Hazırlanan bu tüpler 5 dakika kaynayan su banyosunda bekletilmiştir.
5. Daha sonra soğuk suda soğutulmuştur.
6. Absorbanslar 575 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur.
7. Glukoz miktarları oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi yukarıda belirtilen aşamalara göre konsantrasyonu bilinen miktarlarda glukoz içeren ortamlar kullanılarak hazırlanmıştır (Ek 3).

4.3.5. Yağ Asidi Analizi

Daldırmalı fermantasyonda enzim üretim ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan atık kızartma yağlarının fermantasyondan önce ve sonra yağ asidi bileşimini belirlemek için yağ asidi analizleri yapılmıştır. Fermantasyondan önce ve fermantasyon sırasında sıvı kültürden alınan numunelerdeki lipidlerin ekstraksiyonu 3:2 (v/v) hekzan izopropanol karışımının kullanıldığı Hara ve Radin (1983) metoduyla yapılmıştır.

Bunun için, 5 mL mikroorganizmadan ayrılmış numuneler (süpernatant) ağzı kapaklı tüplere alınarak üzerlerine 3:2 (v/v) oranında 5 mL hekzan-izopropanol karışımı ilave edilmiştir. Tüpler vortekste iyice karıştırıldıktan sonra yağ asitlerinin analizinde kullanılmıştır.

4.3.5.1. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Lipitler içinde bulunan yağ asitlerinin gaz kromatografik analizinin yapılabilmesi için polar olmayan uçucu ve kararlı yapıya sahip olan metil esterleri gibi türevlerine dönüştürülmesi gerekmektedir.

Metil esteri hazırlamak için hekzan/izopropanol fazı içindeki lipit ekstraktı sızdırma yapmayan deney tüplerine alınmıştır. Üzerine % 2'lik metanolik sülfirik asitten 5 mL ilave edilerek, vorteks ile iyice karışmaları sağlanmıştır. Bu karışım 50 °C'lik etüvde 15 saat süre ile metilleşmeye bırakılmıştır. Tüpler etüvden çıkarılarak oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur ve 5 mL % 5'lik sodyum klorür ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri 5 mL hekzan ile ekstrakte edilmiş ve fazlar iyice ayrıldıktan sonra ayrılan hekzan fazı pipetle alınarak, 5 mL % 2'lik KHCO₃ ile muamele edilmiş ve fazların ayrılması için 4-5 saat bekletilmiştir. Önce üst faz alınmış, daha sonra metil esterleri içeren bu karışım, 45 °C'de ve azot akımı altında çözücüsü uçurulmuştur. 1 mL hekzan ile çözülerek 2 mL'lik ağzı kapaklı otosampler vialleri içine alınarak gaz kromatografisinde analiz edilmiştir. Analize kadar numuneler -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

4.3.5.2. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi

Lipit ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra SHIMADZU GC 17 Ver. 3 gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Bu analiz için 25 m uzunluğunda, 0,25 µm iç çapında ve PERMABOND 25 mikron film kalınlığına sahip Machery-Nagel (Germany) kapiler kolon kullanılmıştır. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120-220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutulmuştur. Kolon sıcaklık programı 120 °C'den 220 °C'ye kadar ayarlanmıştır. Sıcaklık artışı 200 °C'ye kadar 5 °C/dk ve 200'den 220'ye kadar 4 °C/dk olarak belirlenmiştir. 220 °C'de 8 dakika tutulmuş ve toplam süre 35 dk olarak belirlenmiştir. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanılmıştır. Analiz sırasında örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlenmiştir. Bu işlemden sonra gerekli programlama yapılarak örneklere ait yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapılmıştır. Örnek grafikler Ek-4'de gösterilmiştir.

4.4. Biyoreaktörde Sıvı Faz Hacimsel Kütle Transfer Katsayısı ve Oksijen Birikim Hızının Hesaplanması

Lipaz üretimi üzerine sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayısı ve oksijen birikim hızını belirlemek için kullanılan biyoreaktör; 6 L hacimli, 5 L çalışma hacmine sahip, karıştırma hızı, sıcaklık, çözünmüş oksijen, pH ve hava akış hızı değerlerinin kontrol edilebildiği bir sisteme sahiptir. Hazne bölmesi, ısıya dayanıklı silindir şeklinde pyreks camdan oluşmakta ve cam bölmenin üstünde yer alan kapak ile haznenin altına yerleştirilmiş olan çanak şeklindeki taban kısmı paslanmaz çelikten oluşmaktadır. Kapak kısmı üzerinde; steril hava girişi ve çıkışı, pH ve çözünmüş oksijen problemleri, termovel, aşılama, numune alma, asit-baz, nütrient ve köpük kırıcı ilavesi için dizayn edilmiş boşluklar vardır. Cam kap üst kapak kablo bağlantıları çıkarıldıktan sonra tümüyle otoklavda sterilize edilebilmektedir.

Biyoreaktörde lipaz üretimi üzerine sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayısı ve oksijen birikim hızını belirlemek için Bölüm 3.9.'da anlatılan Dinamik Metot kullanılmıştır (Bandyopadhyay and Humprey, 1967). Mikroorganizma biyoreaktöre atıldıktan sonra, dinamik oksijen transfer deneyleri mikroorganizmanın biyolojik aktivitelerini etkilemeyecek şekilde çok kısa süreli olarak belli kültürasyon zamanlarında yapılmıştır. Bu sırada hava girişi tamamen kesilmiş ve yüzey havalandırmanın etkisini azaltmak için karıştırma hızı 20-50 dk⁻¹ arasına düşürülmüştür. Havalandırmanın kesildiği bu zaman periyodunda eşitlik (3.2) kullanılarak, oksijen tüketim hızları, r_o , hesaplanmıştır. Biyoreaktöre havanın tekrar verilmesiyle çözünmüş oksijen konsantrasyonunun artması sonucu eşitlik (3.3) kullanılarak, elde edilen eğrinin (C_o , $dC_o/dt-r_o$) eğiminden $k_L a$ değeri belirlenmiştir. Ek 5'de örnek grafik ve hesaplamalar gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 6 L hacimli biyoreaktör

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

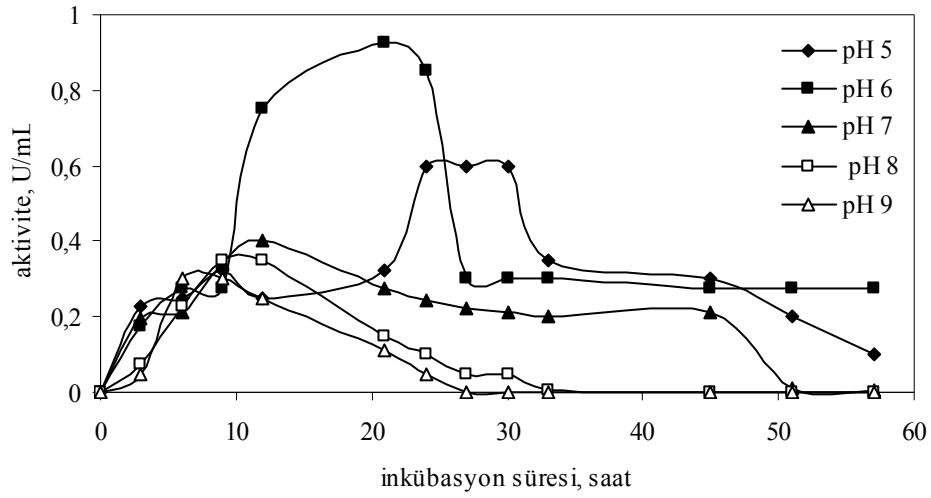
Bu çalışmada, *P. fluorescens* kullanılarak, sentetik ortamda daldırmalı fermantasyon ile lipaz üretimini araştırılmış ve enzim üretim şartları optimize edilmiştir. Daha sonra bu sonuçlara göre katı substrat fermantasyonu uygulanarak enzim üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Ayrıca enzim üretimi üzerine karıştırma hızı ve hava akış hızının etkisini belirlemek için, laboratuvar ölçekli biyoreaktör kullanarak, oksijen tüketim hızları ve sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayılarının değişimini incelenmiştir.

5.1. Başlangıç pH' ının Etkisi

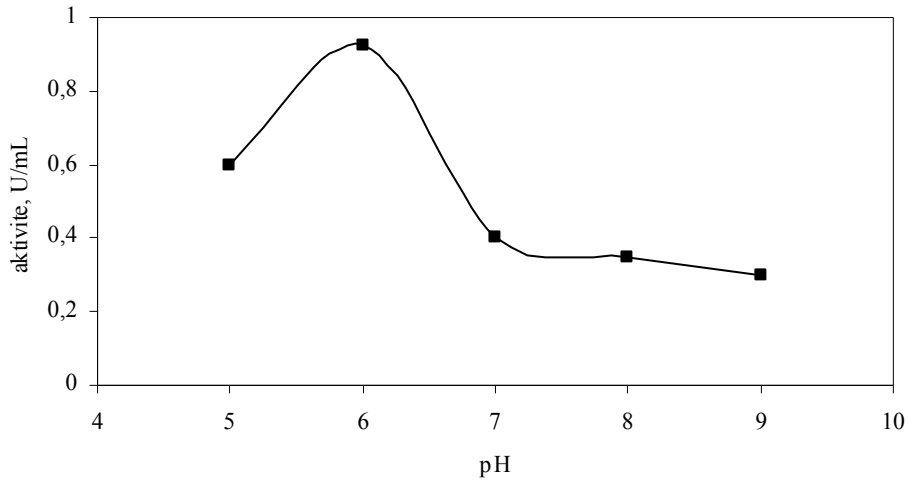
Enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri besin ortamının başlangıç pH'sıdır. *P. fluorescens* bakterisi ile yapılan enzim üretiminde öncelikle başlangıç pH'ının etkisi incelenmiş ve daha sonraki deneyler, elde edilen en uygun pH değerinde yapılmıştır. pH etkisini incelemek için başlangıç pH değerleri 5, 6, 7, 8 ve 9 olan ve Tablo 4.2' de verilen enzim üretim ortamı (karbon kaynağı % 1 zeytinyağı) kullanılmıştır.

Şekil 5.1.'de farklı pH değerlerinde elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi verilmiştir. Şekil 5.1.'den de görüldüğü gibi maksimum enzim aktivitesi pH 6'da logaritmik fazda (üstel üreme fazı) elde edilmiştir. Logaritmik fazda lipaz üretimi daha önce farklı *P. fluorescens* suşları ile yapılmış olan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Makhzoum vd., (1995), Rajmohan vd., 2002, Çadircı ve Yaşa (2010)). Ayrıca birçok araştırmacı psikrofilik bakterilerin hücre dışı lipaz ve proteinazları logaritmik büyüme fazında salgıladıklarını bildirmiştir (Juffs vd., 1968, Adams vd., 1975, Gebre vd., 1980, Stead, 1987).

Şekil 5.2.'de farklı pH değerlerinde elde edilen maksimum enzim aktiviteleri verilmiştir. pH 6'da elde edilen en yüksek aktivite 0.925 U/mL'dir. pH 5, 7, 8 ve 9'da elde edilen en yüksek aktiviteler ise sırasıyla 0.600, 0.400, 0.350 ve 0.300 U/mL olarak belirlenmiştir. pH 8'de 45. ve pH 9'da 27. saatten sonra, enzim aktivitesi ölçülememiştir. Şekil 5.2.'ye göre pH 6'dan sonra en yüksek aktiviteler sırasıyla 5>7>8>9'da elde edilmiştir.

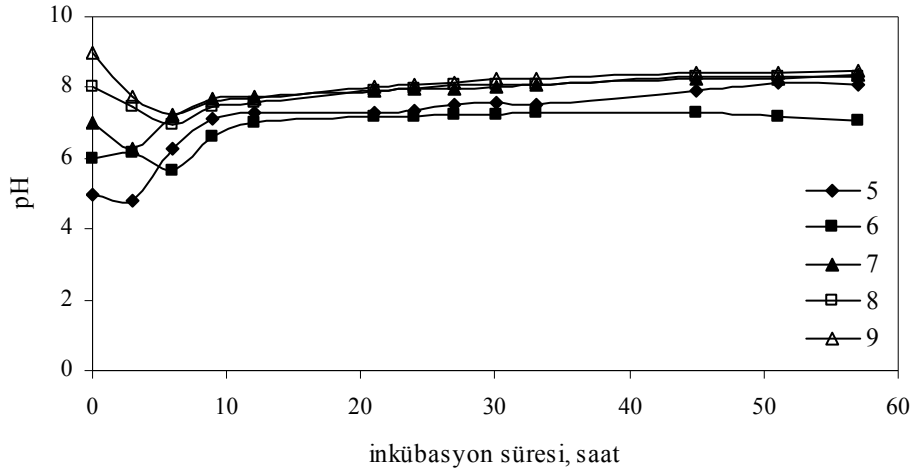


Şekil 5.1. Farklı pH değerlerinde enzim aktivitesinin zamanla değişimi (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 zeytinyağı, aşı oranı: % 10 v/v)



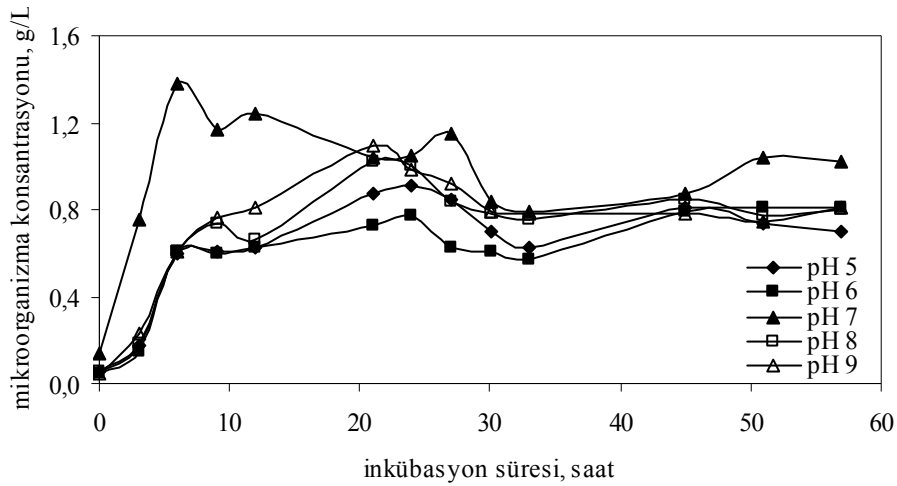
Şekil 5.2. Farklı pH değerlerinde elde edilen maksimum aktivite değerleri (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 zeytinyağı, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç pH değerlerinde fermantasyon ortamlarının pH'sının zamanla değişimi Şekil 5.3.'de verilmiştir. Fermantasyon sonucu açığa çıkan metabolik asitler, çalışılan tüm pH değerlerinde başlangıçta pH'ı azaltmıştır. Karbon kaynağının ortamdaki uzaklaşması ile mikroorganizmalar bu kez aminoasitleri kullanarak ortam pH'sının yükselmesine sebep olmuştur.



Şekil 5.3. Farklı başlangıç pH değerlerinde ortam pH'nın zamanla değişimi (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 zeytinyağı, aşı oranı: % 10 v/v)

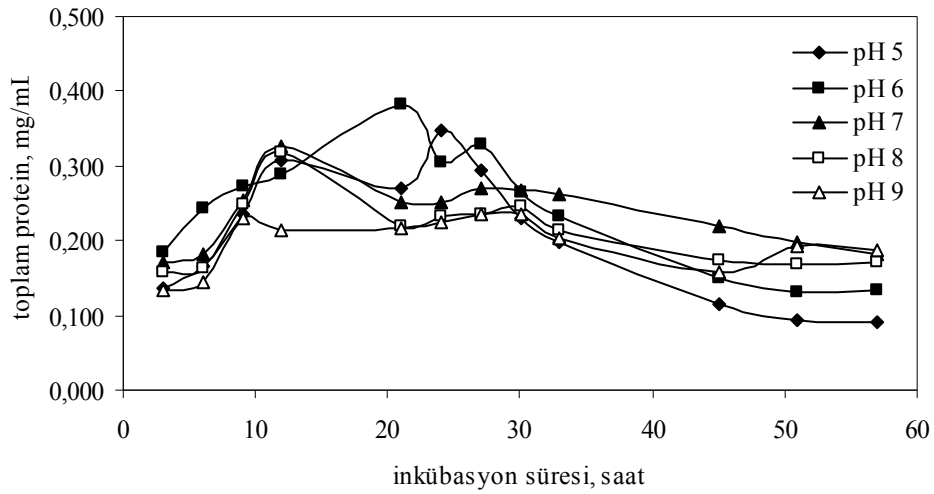
Şekil 5.4.'de çalışılan pH değerlerinde elde edilen *P. fluorescens*'ın üreme eğrileri verilmiştir. Tüm pH değerlerinde mikroorganizmalar çok kısa lag (gecikme) fazından sonra inkübasyonun hemen başlarında üremeye başlamakta ve üstel üreme evresi başlamaktadır. En yüksek mikroorganizma konsantrasyonu 1.378 mg/L olarak pH 7'de elde edilmiştir.



Şekil 5.4. Farklı pH değerlerinde mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 zeytinyağı, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.5.'de farklı pH değerlerinde ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları verilmiştir. Protein konsantrasyonları artarken genel olarak enzim aktivitesi ve

mikroorganizma konsantrasyonu da artmaktadır. pH 5, 6, 7, 8 ve 9’da ölçülen maksimum protein konsantrasyonları sırasıyla 0.347, 0.383, 0.327, 0.318 ve 0.216 mg/mL’dir. Spesifik enzim aktiviteleri, enzim aktivitesinin toplam protein miktarına bölünmesiyle elde edilmiştir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek spesifik aktivite pH 6’da 24. saatte 2.778 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Ancak, protein miktarlarından gelen farklılıklar nedeniyle, en yüksek spesifik aktiviteler sırasıyla pH 5, 9, 8 ve 7’de 2.620, 2.096, 1.413, 1.358 U/mg protein olarak elde edilmiştir.



Şekil 5.5. Farklı pH değerlerinde toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 zeytinyağı, aşı oranı: % 10 v/v)

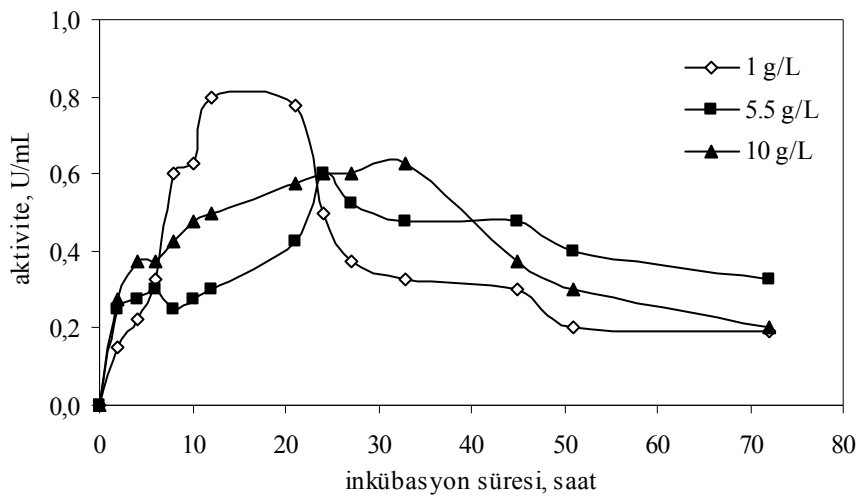
5.2. Karbon Kaynaklarının Etkisi

Fermantasyon ile enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri ortam bileşimidir. Ortam bileşenleri içerisinde karbon kaynağı ortam maliyetinin % 60-80’ini oluşturmaktadır (Rehm,1987).

Karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için yapılan deneylerde Tablo 4.2.’de verilen besin ortamı kullanılmıştır. Bu amaçla bu besin ortamında karbon kaynağı değiştirilmiş, diğer ortam bileşenleri sabit tutularak, farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak; glukoz, bitkisel yağlar (ayçiçeği yağı, zeytinyağı, soya yağı, mısır yağı) ve bir trigliserid olan tribütirin kullanılmıştır.

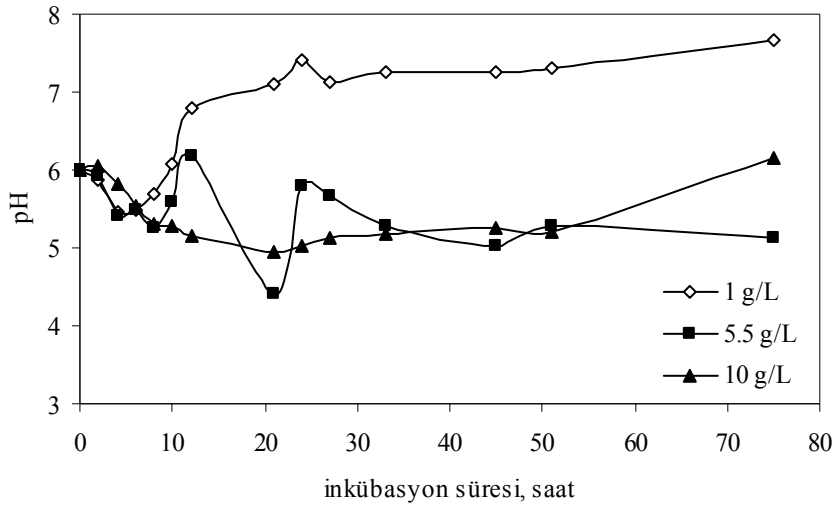
5.2.1. Glukoz Konsantrasyonunun Etkisi

Glukozun enzim üretimi üzerine etkisini incelemek için 1, 5.5 ve 10 g/L'lik başlangıç glukoz konsantrasyonları içeren fermentasyon ortamları kullanılmıştır. Şekil 5.6.'da başlangıç glukoz konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi 1 g/L glukoz konsantrasyonunda 12. saatte 0.800 U/mL olarak elde edilmiştir. 5.5 ve 10 g/L glukoz konsantrasyonlarında ise enzim aktivitelerinde nispeten azalma olmuştur ve maksimum aktivitenin elde edildiği süre uzamıştır. Glukoz konsantrasyonundaki artışın, enzim üretimi üzerine represyon etkisi yaptığı söylenebilir. Glukozun represyon (baskılama) etkisi birçok fermentasyon prosesinde gözlenmektedir. Bu durum, yüksek glukoz konsantrasyonlarında açığa çıkan metabolik asitlerin artmasından dolayı emzimin protein yapısının değişmesinden kaynaklanabilir. Literatürde bulunan bazı çalışmalarda da glukozun lipaz üretimi üzerine represyon etkisi olduğu rapor edilmiştir (Narasaki 1968, Mate ve Sudakevi, 1973). Bu da yüksek glukoz konsantrasyonlarında açığa çıkan metabolik asitlerin artmasından dolayı enzimin protein yapısının değişmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Glukoz gibi kolay tüketilebilen karbon kaynaklarının yer aldığı fermantasyon proseslerinde bu duruma oldukça sık rastlanılmaktadır. Bununla birlikte glukozun lipaz enzimi üretimini tamamen inhibe ettiğini rapor eden çalışmalarda mevcuttur (Makhzoum vd., 1995, Lima vd., 2003).



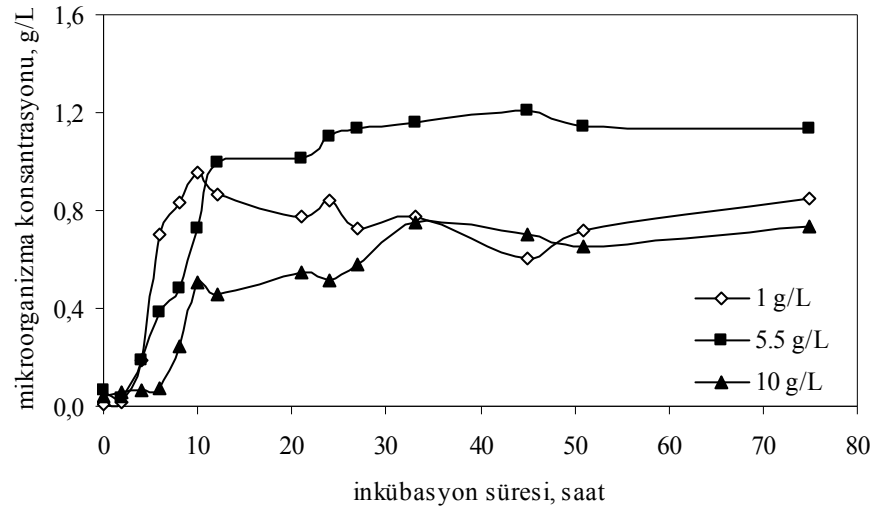
Şekil 5.6. Farklı glukoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.7.'de farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. Glukoz içeren ortamlarda fermentasyon sonucu açığa çıkan metabolik asitler pH'ı azaltmakta ve glukoz harcandıkça ortamın asitliği artmaktadır. Karbon kaynağının ortamdaki uzaklaşması ile mikroorganizmalar bu kez aminoasitleri kullanarak ortam pH'ının yükselmesine sebep olmaktadır. Glukoz tükenince veya çok azalınca pH' daki düşme durmaktadır.

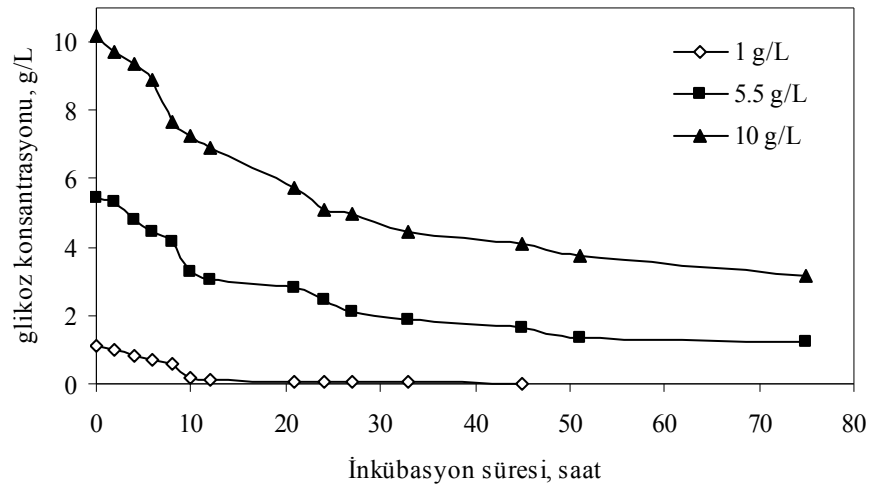


Şekil 5.7. Farklı glukoz konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (pH:6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.8.'de farklı glukoz konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi, glukoz konsantrasyonunun zamanla değişimi ise Şekil 5.9'da verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu 5.5 g/L glukoz içeren ortamda 1.21 g/L olarak bulunmuştur (Şekil 5.8). Mikroorganizma konsantrasyonu en fazla 5.5 g/L glukoz içeren ortamda elde edilmesine rağmen en yüksek aktivite 1 g/L glukoz içeren ortamda elde edilmiştir. Yapılan birçok çalışmada da bakteri ve diğer mikroorganizmaların üreme miktarıyla enzim aktivitesi arasında doğrusal bir ilişki olmadığı ifade edilmiştir (Nahas, 1988; Maia vd., 2000, Mahadik vd., 2004, Brozzoli vd., 2009,). Yüksek glukoz konsantrasyonlarında, glukozun mikroorganizmalar tarafından tüketilmesi için daha uzun süre geçmelidir.

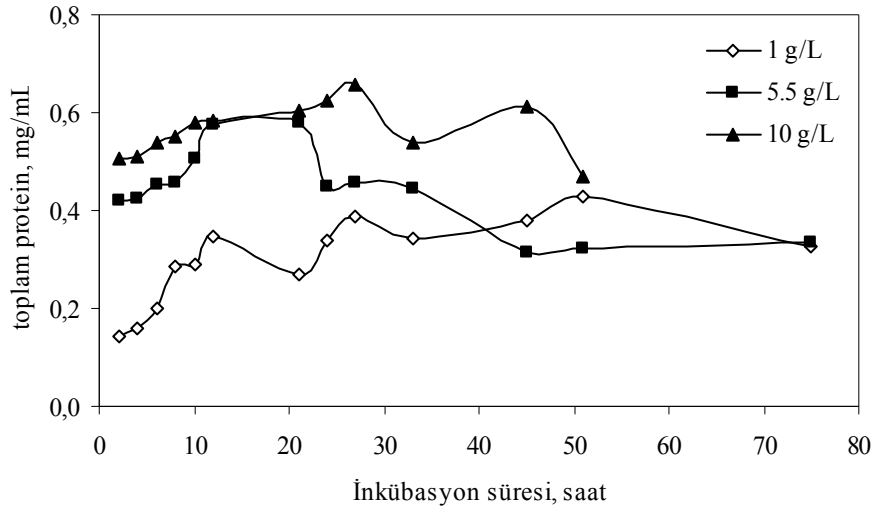


Şekil 5.8. Farklı glukoz konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.9. Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren fermantasyon ortamlarında glukoz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.10.'da gösterilmiştir. Genel olarak enzim aktivitesi ve mikroorganizma konsantrasyonu artarken protein konsantrasyonları da artmaktadır. En yüksek protein konsantrasyonu 10 g/L glukoz konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 27. saatte 0.658 mg/mL'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktivite 1 g/L glukoz konsantrasyonunda 21. saatte 2.888 U/mg olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.10. Farklı glukoz konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

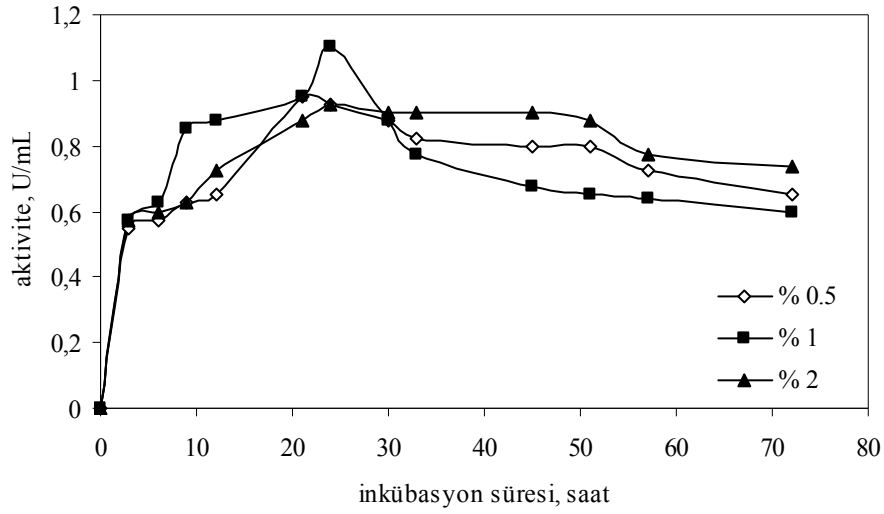
Tablo 5.1.'de çalışılan glukoz konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.

Tablo 5.1. Farklı glukoz konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Glukoz Konsantrasyonu (g/L)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
1	0.800	0.864	0.349	2.293	12	6.8
5.5	0.600	1.101	0.449	1.336	24	5.8
10	0.625	0.751	0.540	1.157	33	5.18

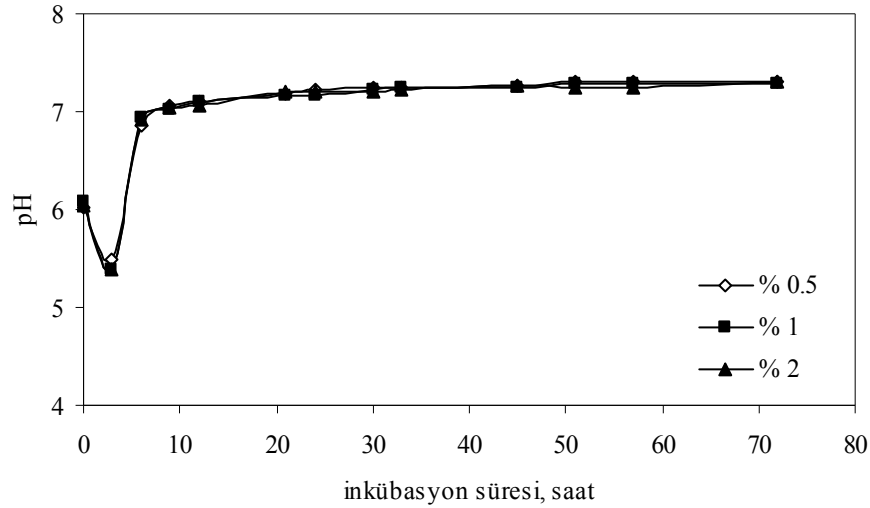
5.2.2. Ayçiçeği Yağı Konsantrasyonunun Etkisi

Karbon kaynağı olarak ayçiçeği yağının enzim üretimi üzerine etkisini gösterebilmek için % 0.5, 1 ve 2 ayçiçeği yağı içeren fermentasyon ortamları kullanılmıştır. Şekil 5.12.'de farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi % 1 ayçiçeği yağı konsantrasyonunda 24. saatte 1.100 U/mL olarak elde edilmiştir. % 2 ayçiçeği yağı konsantrasyonunda ise maksimum enzim aktivitesinde nispeten düşme olmuştur. Bu duruma substrat inhibisyonunun neden olduğu söylenebilir.



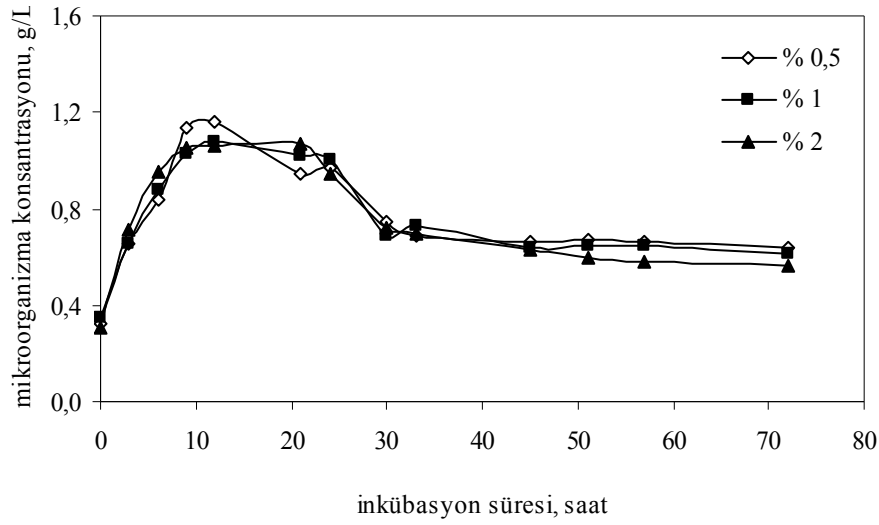
Şekil 5.11. Farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.12.'de farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi tüm ortamlarda pH değerleri birbirine çok yakındır. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanılan ortamın aksine pH'ın salınım göstermediği gözlenmiştir. Ayçiçeği yağı konsantrasyonunun değiştirilmesinin ortam pH'ı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı söylenebilir.



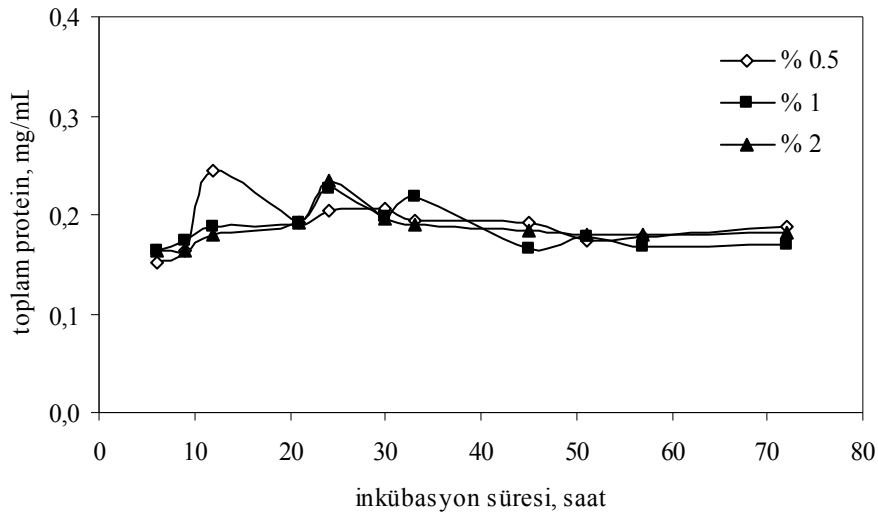
Şekil 5.12. Farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.13.'de farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi tüm ortamlarda mikroorganizma konsantrasyonları birbirine çok yakın olmakla beraber, maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 0.5 ayçiçeği yağı içeren ortamda 12. saatte 1.158 g/L olarak bulunmuştur (Şekil 5.13.). Glukoz kullanılan ortamın aksine ayçiçeği yağı konsantrasyonunun değiştirilmesinin mikroorganizma konsantrasyonu üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 5.13. Farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.14.' de verilmiştir. Genel olarak enzim aktivitesi ve mikroorganizma konsantrasyonu artarken protein konsantrasyonları da artmaktadır. Elde edilen protein konsantrasyonu değerleri birbirine yakın olmakla beraber en yüksek protein konsantrasyonu % 0.5 ayçiçeği yağı konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 12. saatte 0.245 mg/mL'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktivite protein konsantrasyonlarından gelen farklılıklar nedeniyle % 1 ayçiçeği yağı konsantrasyonunda 21. saatte 4.962 U/mg olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.14. Farklı konsantrasyonlarda ayçiçeği yağı içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Tablo 5.2.'de çalışılan ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.

Tablo 5.2. Farklı ayçiçeği yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

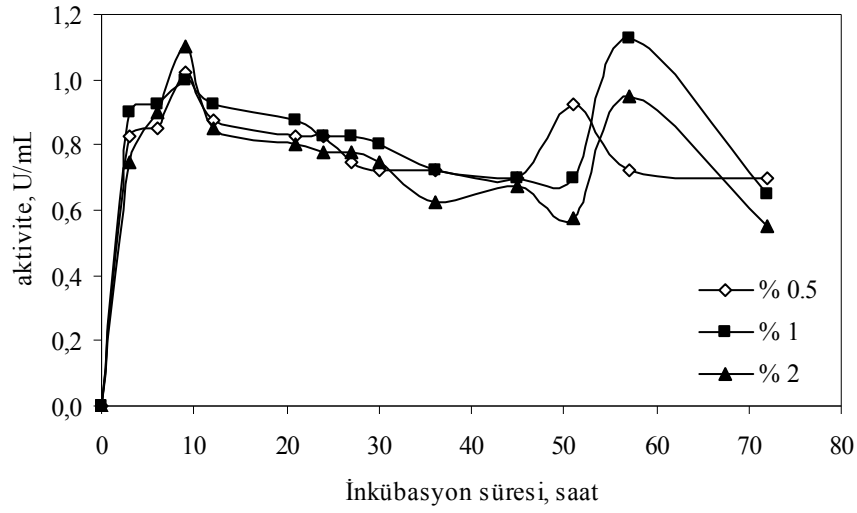
Ayçiçeği yağı konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.5	0.950	0.943	0.193	4.916	21	7.18
1	1.100	1.005	0.227	4.841	24	7.17
2	0.925	0.943	0.234	3.946	24	7.20

5.2.3. Soya Yağı Konsantrasyonunun Etkisi

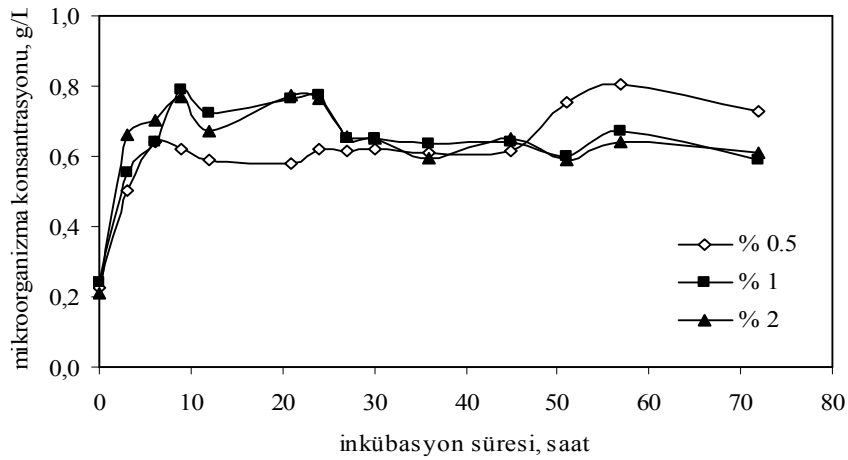
Soya yağının enzim üretimi üzerine etkisini gösterebilmek için % 0.5, 1 ve 2 soya yağı içeren fermantasyon ortamları kullanılmıştır. Şekil 5.15.'de farklı soya yağı konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi, Şekil 5.16'da da farklı soya yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Şekil 5.16. incelendiğinde çok kısa adaptasyon fazından sonra mikroorganizmanın logaritmik büyüme fazına geçtiği ve logaritmik fazın iki faza bölündüğü görülmektedir. Hong-wei vd., (2009), *Pseudomonas* Lip35 kullanarak yapmış olduğu lipaz üretimi

çalışmasında da logaritmik fazı iki faz halinde bulmuş ve bunu lipazın indüklenebilir bir enzim olmasından kaynaklandığını rapor etmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 1 soya yağı konsantrasyonunda ikinci (pikte) logaritmik fazda 57.saatte 1.125 U/mL olarak elde edilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 0.5 soya yağı içeren ortamda 57. saatte 0.807 g/L olarak bulunmuştur.

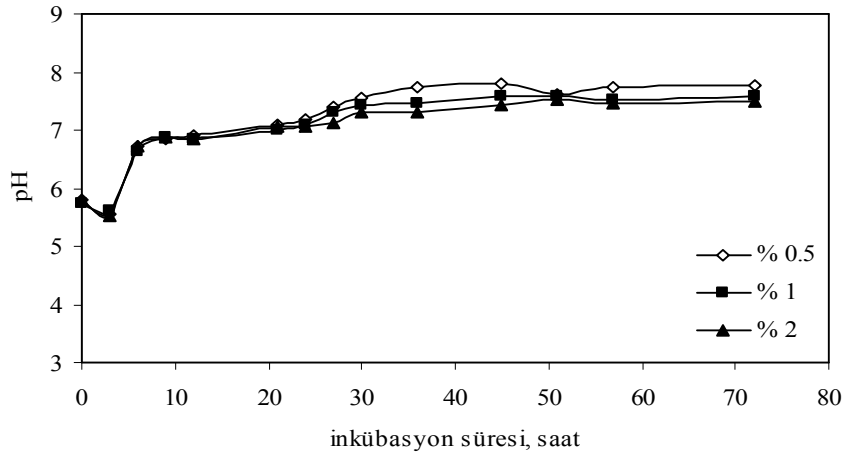
Şekil 5.17.'de farklı soya yağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi tüm ortamlarda pH değerleri birbirine yakın olup, soya yağı konsantrasyonlarındaki değişimlerin pH üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 5.15. Farklı soya yağı konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

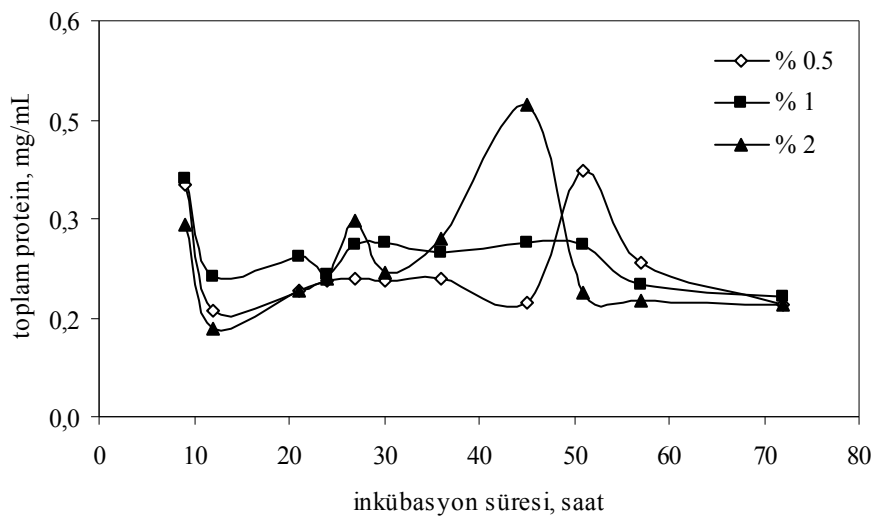


Şekil 5.16. Farklı soya yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.17. Farklı soya yağı konsantrasyonlarında ortam pH'nın zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç soya yağı konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.18.'de gösterilmiştir. Genel olarak enzim aktivitesi ve mikroorganizma konsantrasyonu artarken protein konsantrasyonları da artmaktadır. En yüksek protein konsantrasyonu % 2 soya yağı konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 45. saatte 0.472 mg/mL'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktivite protein konsantrasyonlarında gelen farklılıklar nedeniyle % 2 soya yağı konsantrasyonunda 12. saatte 6.334 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.3.'de çalışılan soya yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



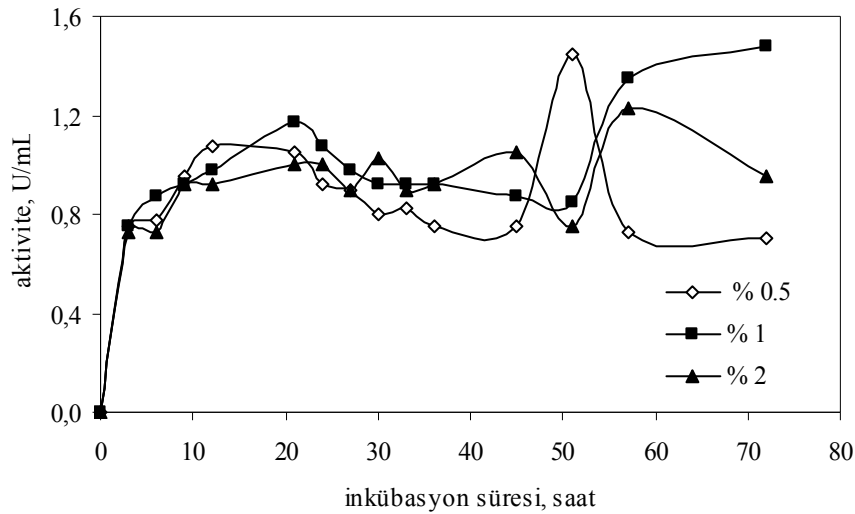
Şekil 5.18. Farklı konsantrasyonlarda soya yağı içeren fermentasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Tablo 5.3. Farklı soya yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Soya yağı konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.5	1.025	0.618	0.351	2.923	9	6.86
1	1.125	0.670	0.200	5.614	57	6.87
2	1.100	0.770	0.292	3.772	9	6.89

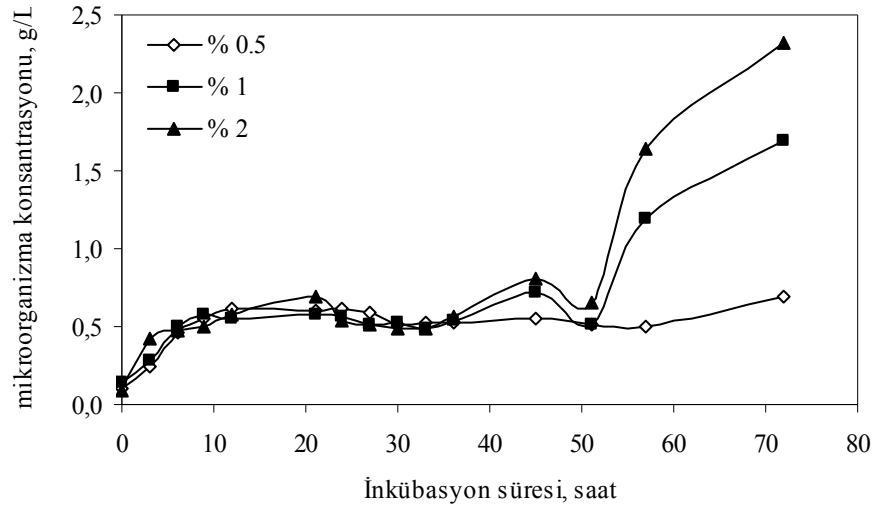
5.2.4. Mısır Yağı Konsantrasyonunun Etkisi

Karbon kaynağı olarak mısır yağının enzim üretimi üzerine etkisini gösterebilmek için % 0.5, 1 ve 2 mısır yağı içeren fermentasyon ortamları kullanılmıştır. Şekil 5.19.'da farklı mısır yağı konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi, Şekil 5.20.'de ise farklı mısır yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Şekil 5.20. incelendiğinde mikroorganizmanın soya yağında olduğu gibi çok kısa adaptasyon fazından sonra logaritmik büyüme fazına geçtiği ve logaritmik fazın iki faza bölündüğü görülmektedir. En yüksek enzim aktivitesi % 1 mısır yağı konsantrasyonunda 72. saatte ikinci logaritmik fazda 1.475 U/mL olarak elde edilmiştir (Şekil 5.19.). Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu ise % 2 mısır yağı içeren ortamda 72. saatte 2.318 g/L olarak bulunmuştur (Şekil 5.20.). Gözlenen bu durum mısır yağının, mikroorganizma tarafından substrat olarak tüketilmesinin yanı sıra, enzim sentezi prosesinde indükleyici olarak görev yaptığı sonucunu göstermektedir.

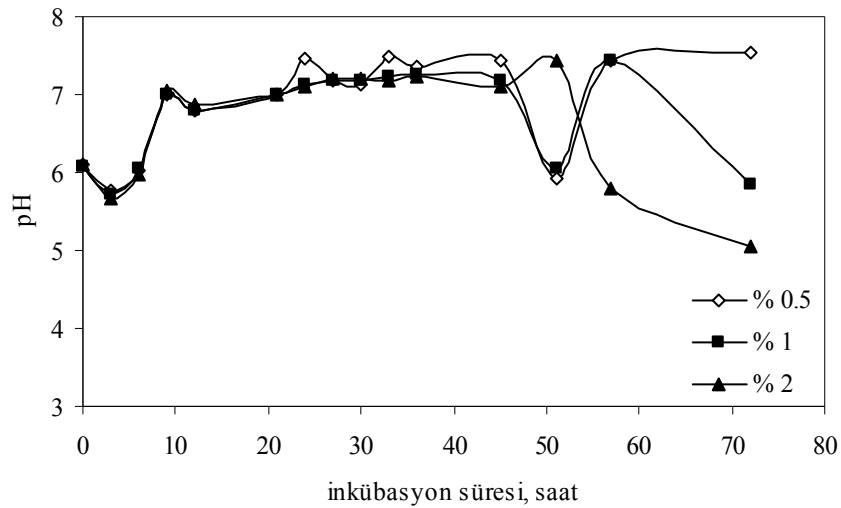


Şekil 5.19. Farklı mısır yağı konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.21.'de farklı mısır yağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi başlangıçta tüm ortamlarda pH düşmekte ve daha sonra yükselerek yaklaşık olarak sabitlenmekte ve sonra tekrar düşmektedir. pH'ın ikinci logaritma fazında düşmesi mikroorganizmanın karbon kaynağı olarak yağı kullanması sonucu yağ asitlerinin oluşumu nedeniyle olabilir.

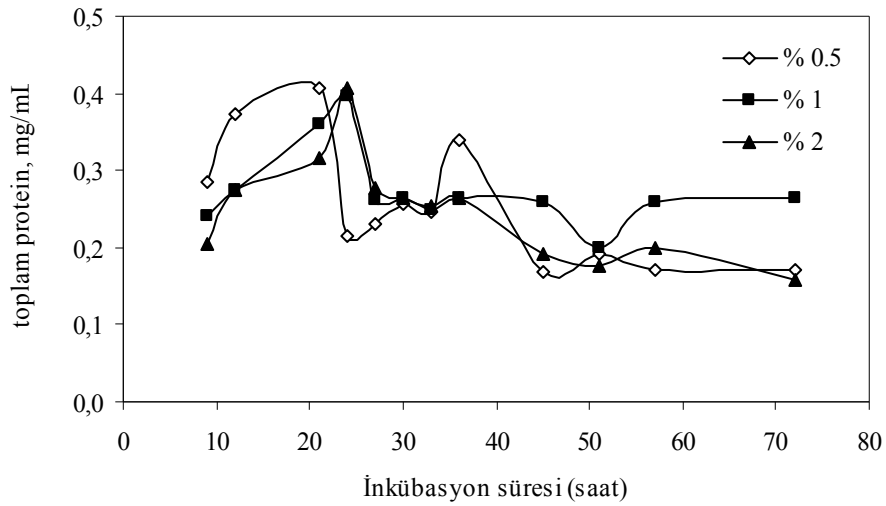


Şekil 5.20. Farklı mısır yağı konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.21. Farklı mısır yağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç mısır yağı konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.22.'de verilmiştir. Genel olarak enzim aktivitesi ve mikroorganizma konsantrasyonu artarken protein konsantrasyonları da artmaktadır. En yüksek protein konsantrasyonu % 2 mısır yağı konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 24. saatte 0.408 mg/mL'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktivite protein konsantrasyonlarından gelen farklılıklar nedeniyle % 0.5 mısır yağı konsantrasyonunda 51. saatte 7.574 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.4.'de çalışılan mısır yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



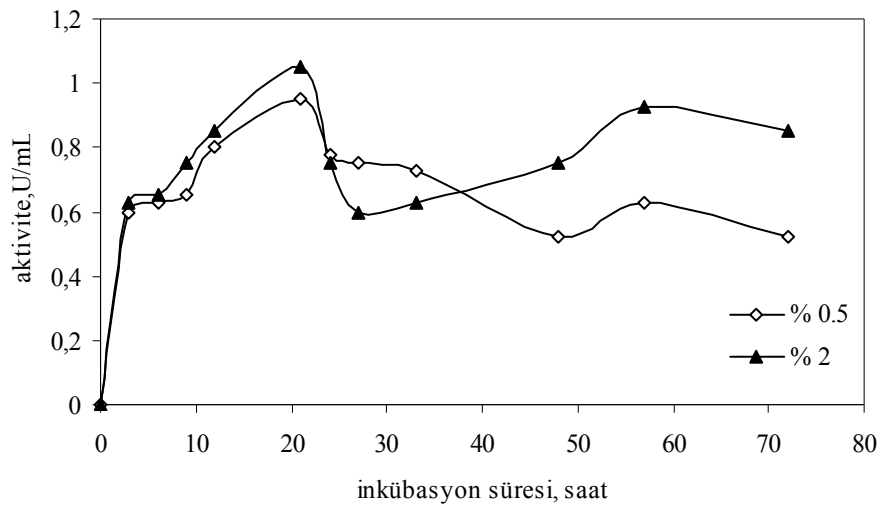
Şekil 5.22. Farklı konsantrasyonlarda mısır yağı içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Tablo 5.4. Farklı mısır yağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Mısır yağı konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.5	1.450	0.518	0.191	7.574	51	5.92
1	1.475	1.690	0.263	5.608	72	5.85
2	1.225	1.638	0.200	6.113	57	5.80

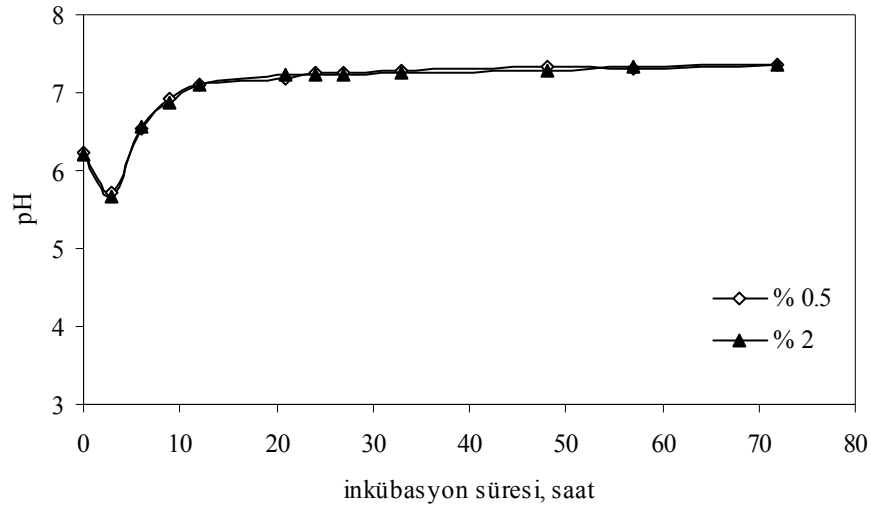
5.2.5. Zeytinyağı Konsantrasyonunun Etkisi

Zeytinyağının enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak için % 0.5, 1 ve 2 zeytin yağı içeren fermantasyon ortamları kullanılmıştır. % 1 zeytinyağı içeren fermantasyon ortamı ile ilgili grafikler Bölüm 5.1.'de başlangıç pH'ının etkisinde gösterildiği için burada tekrar verilmemiştir. Şekil 5.23.'de farklı zeytinyağı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 2 zeytinyağı konsantrasyonunda 21. saatte 1.050 U/mL olarak elde edilmiştir.



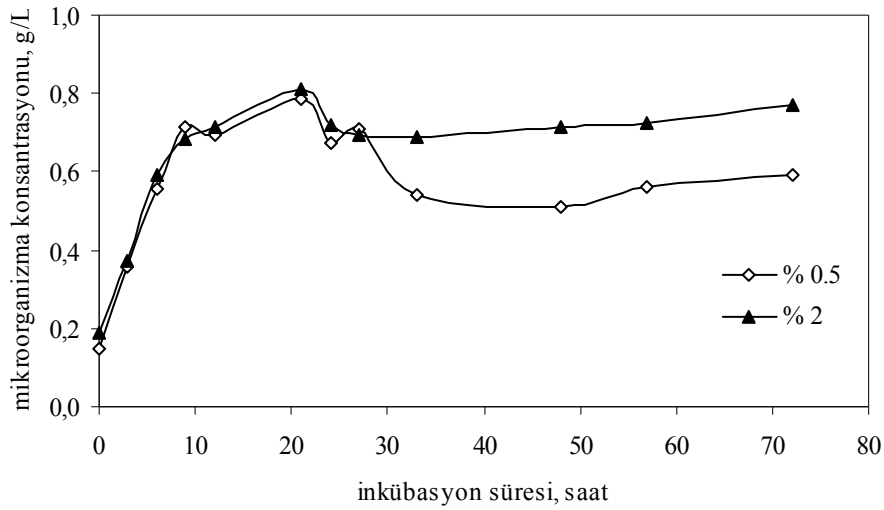
Şekil 5.23. Farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.24.'de farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi bütün çalışma ortamlarda pH değerleri, birbirine çok yakındır.



Şekil 5.24. Farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (pH: 6, T:30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

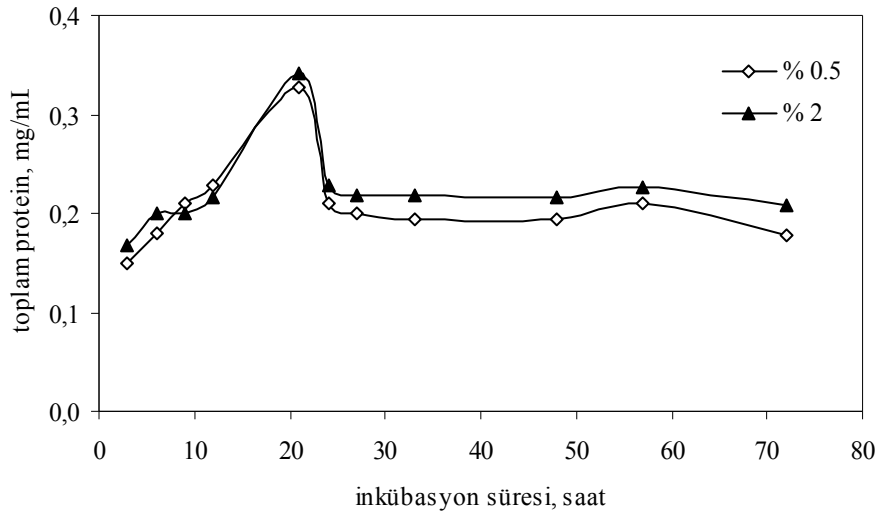
Şekil 5.25.'de farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 2 zeytinyağı içeren ortamda 21. saatte 0.811 g/L olarak bulunmuştur.



Şekil 5.25. Farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç zeytinyağı konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.26.'da verilmiştir. Genel olarak enzim aktivitesi ve mikroorganizma konsantrasyonu artarken protein konsantrasyonları da artmaktadır. En

yüksek protein konsantrasyonu % 1 zeytinyağı konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 21. saatte 0.383 mg/mL 'dir (Şekil 5.5, Şekil 5.26). Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek spesifik aktivite protein konsantrasyonlarından gelen farklılıklar nedeniyle % 2 zeytinyağı konsantrasyonunda 72. saatte 4.095 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.5.'de çalışılan farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



Şekil 5.26. Farklı konsantrasyonlarda zeytin yağı içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T:30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

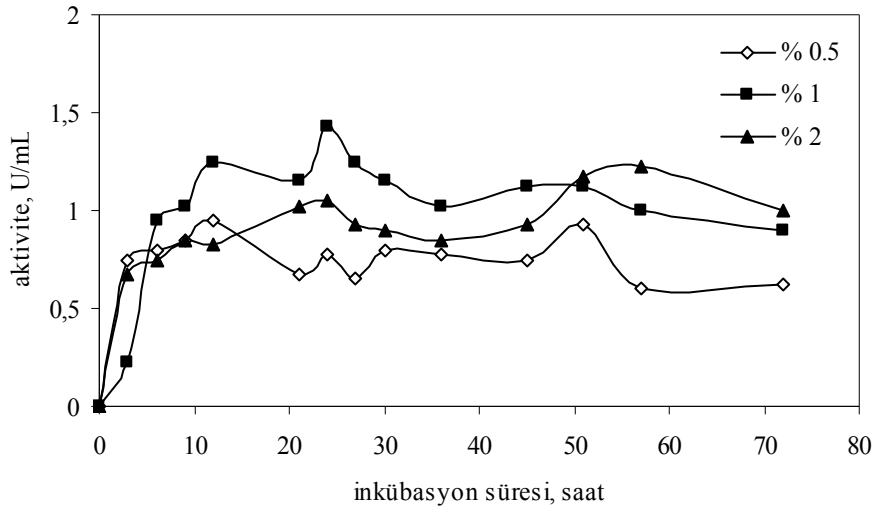
Tablo 5.5. Farklı zeytinyağı konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Zeytinyağı konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.5	0.950	0.784	0.327	2.901	21	7.19
1	0.925	0.728	0.383	2.416	21	7.16
2	1.050	0.811	0.342	3.072	21	7.22

5.2.6. Tribütirin Konsantrasyonunun Etkisi

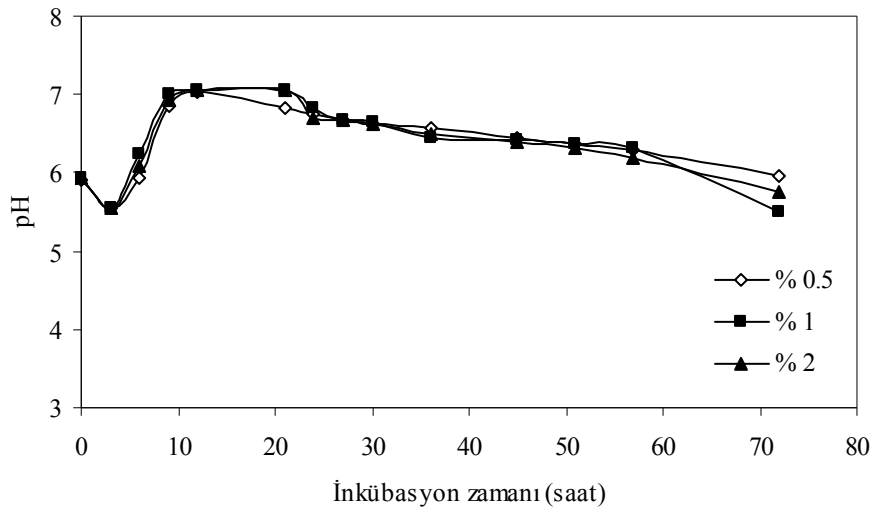
Bu çalışmada; karbon kaynağı olarak kullanılan sıvı yağlar ile karşılaştırma yapmak amacıyla bir trigliserid olan tribütirin kullanılmıştır. Bu amaçla; sıvı yağlarda olduğu gibi tribütirinin enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak için fermantasyon ortamına % 0.5, 1

ve 2 oranlarında tribütirin ilave edilmiştir. Şekil 5.27.'de farklı tribütirin konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi % 1 tribütirin konsantrasyonunda 24. saatte 1.425 U/mL olarak elde edilmiştir.



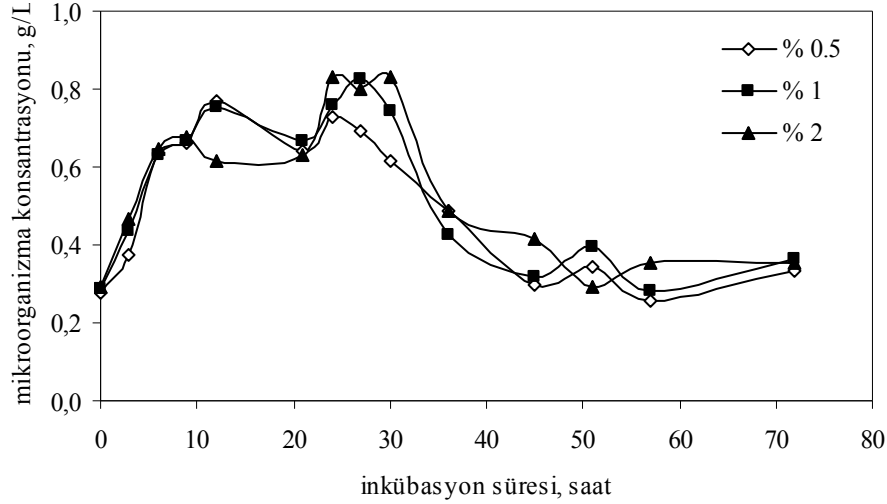
Şekil 5.27. Farklı tribütirin konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.28.'de farklı tribütirin konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi bütün ortamlarda pH, fermantasyonun başında düşmekte, daha sonra yükselmekte ve tekrar düşmektedir.



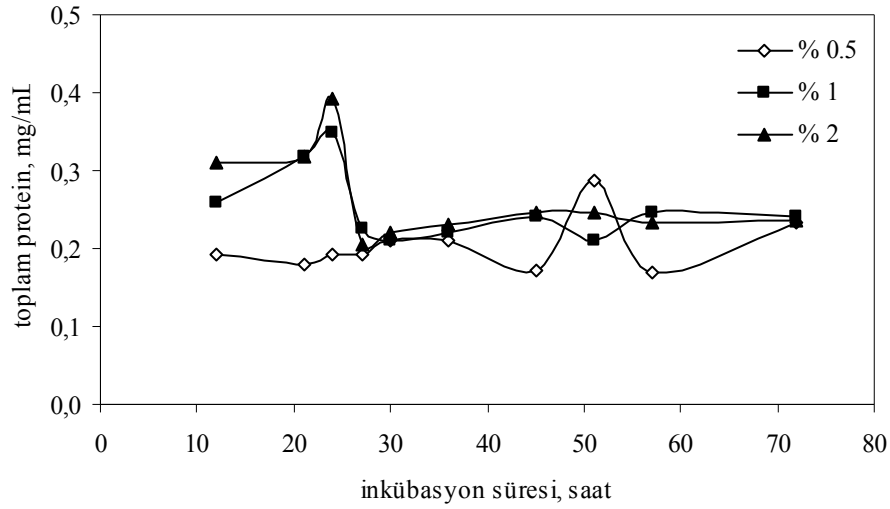
Şekil 5.28. Farklı tribütirin konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.29.'da farklı tribütirin konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiş olup, maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 2 tribütirin içeren ortamda 24. saatte 0.832 g/L olarak bulunmuştur.



Şekil 5.29. Farklı tribütirin konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç tribütirin konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.30.'da verilmiştir. Genel olarak enzim aktivitesi ve mikroorganizma konsantrasyonu artarken, protein konsantrasyonları da artmaktadır. Elde edilen protein konsantrasyonu değerleri özellikle % 1 ve % 2 'de birbirine yakın olmakla beraber en yüksek protein konsantrasyonu % 2 tribütirin konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 24. saatte 0.392 mg/mL'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktivite % 1 tribütirin konsantrasyonunda 27. saatte 5.545 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.6.'da çalışılan tribütirin konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



Şekil 5.30. Farklı konsantrasyonlarda tribütirin içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 6, T:30 °C, KH: 150 rpm, aşı: % 10 v/v)

Tablo 5.6. Farklı tribütirin konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Tribütirin konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.5	0.950	0.771	0.191	4.962	12	7.04
1	1.425	0.758	0.349	4.084	24	6.82
2	1.050	0.832	0.392	2.680	24	6.70

Karbon kaynakları karşılaştırıldığında elde edilen maksimum enzim aktivitesi % 1 oranında mısır yağı kullanıldığı zaman 1.475 U/mL olarak elde edilmiştir. Diğer karbon kaynakları olan tribütrin, soya yağı, ayçiçeği yağı, zeytinyağı ve glukoz için elde edilen maksimum enzim aktiviteleri sırasıyla 1.425, 1.125, 1.100, 1.050 ve 0.800 U/mL olarak bulunmuştur. En yüksek aktivite mısır yağı kullanılan fermantasyon ortamında elde edildiğinden bundan sonraki çalışmalarda (azot kaynaklarının etkisi, fosfat konsantrasyonunun belirlenmesi, metal iyonlarının etkisi, biyoreaktör deneyleri) karbon kaynağı olarak % 1 oranında mısır yağı kullanılmıştır.

5.3. Azot Kaynaklarının Etkisi

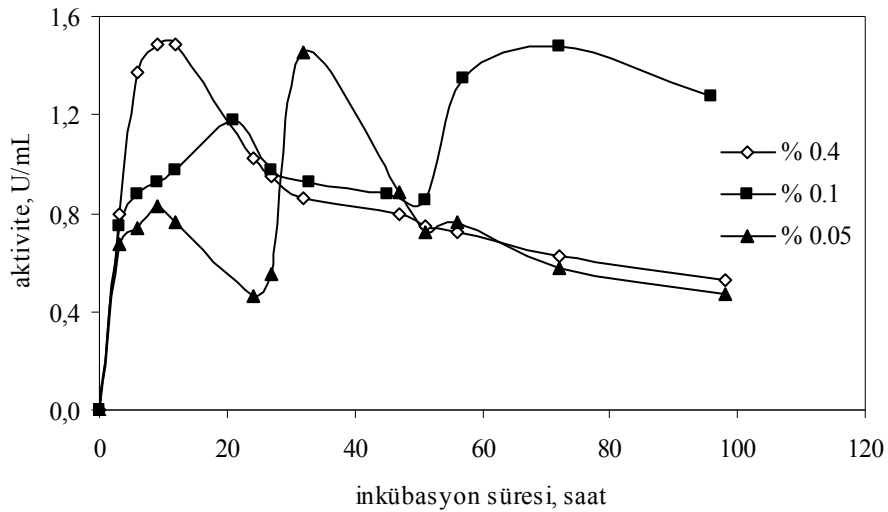
Organik ve inorganik azot kaynakları hidrolazların sentezinde önemli rol oynamaktadır. Organik azot kaynakları, hücre metabolizması ve protein sentezi için gerekli olan birçok

hücre büyüme faktörünü ve amino asitleri sağlayabilirken, inorganik azot kaynakları çabuk tükenabilir ve amonyumun baskılayıcı oluşumuna bağlı olarak enzim sentezi baskılanabilir (İftikhar vd., 2008).

Azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için yapılan deneylerde Tablo 4.2.'de verilen besin ortamı (karbon kaynağı % 1 mısır yağı) kullanılmıştır. Bu amaçla bu besin ortamında azot kaynağı değiştirilmiş, diğer ortam bileşenleri sabit tutularak, farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine olan etkisi incelenmiştir. Azot kaynağı olarak organik (maya özütü, pepton) ve inorganik $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4)$ azot kaynakları kullanılmıştır.

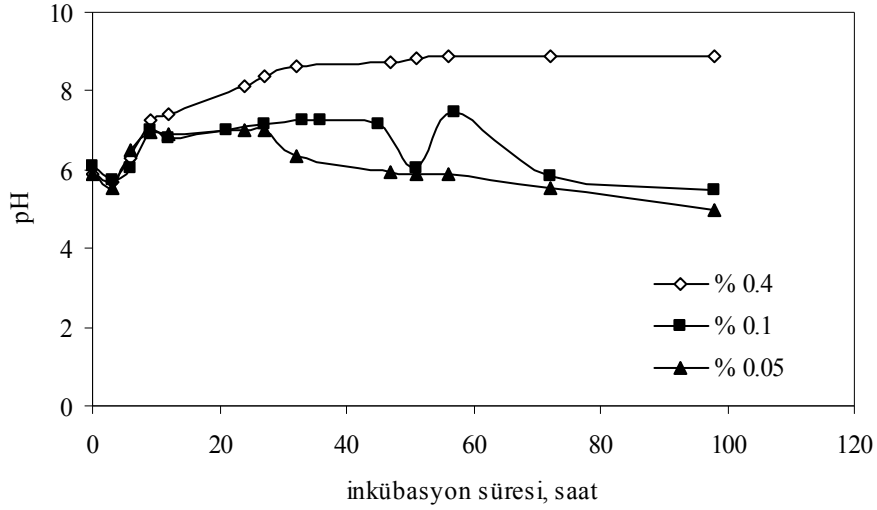
5.3.1. Maya Özütü Konsantrasyonunun Etkisi

Azot kaynağı olarak maya özütünün enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak için % 0.4, 1 ve 0.05 maya özütü içeren fermentasyon ortamları kullanılmıştır. Şekil 5.31.'de farklı maya özütü konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 0.4 maya özütü konsantrasyonunda 1.490 U/mL olarak elde edilmiştir.



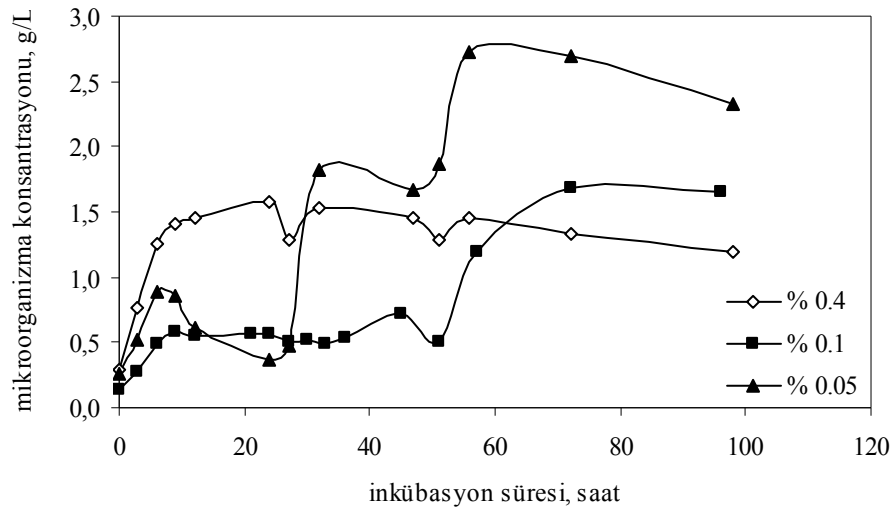
Şekil 5.31. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.32.'de farklı maya özütü konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. % 0.4 maya özütü konsantrasyonunda pH değeri yükseldikten sonra, hemen hemen sabitlenirken, diğer konsantrasyonlarda düşmektedir. % 0.4 maya özütü konsantrasyonunda azot miktarının yüksek olması nedeniyle pH düşmemiştir.



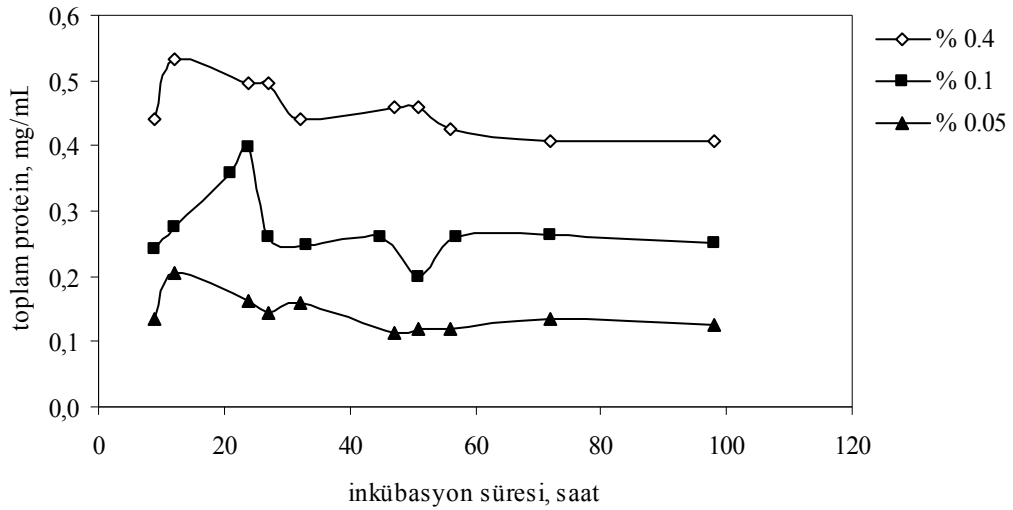
Şekil 5.32. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.33'de farklı maya özütü konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu %0.05 maya özütü içeren ortamda 56.saatte 2.717 g/L olarak bulunmuştur.



Şekil 5.33. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç maya özütü konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.34.'de verilmiştir. Başlangıçta protein konsantrasyonları düzensiz olduğu için şekilde verilmemiştir. Genel olarak enzim aktivitesi ve mikroorganizma konsantrasyonu artarken protein konsantrasyonları da artmaktadır. En yüksek protein konsantrasyonu % 0.4 maya özütü konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 12.saatte 0.532 mg/mL'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek spesifik aktivite protein konsantrasyonlarından gelen farklılıklar nedeniyle % 0.05 maya özütü konsantrasyonunda 32.saatte 9.095 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.7.'de çalışılan farklı maya özütü konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



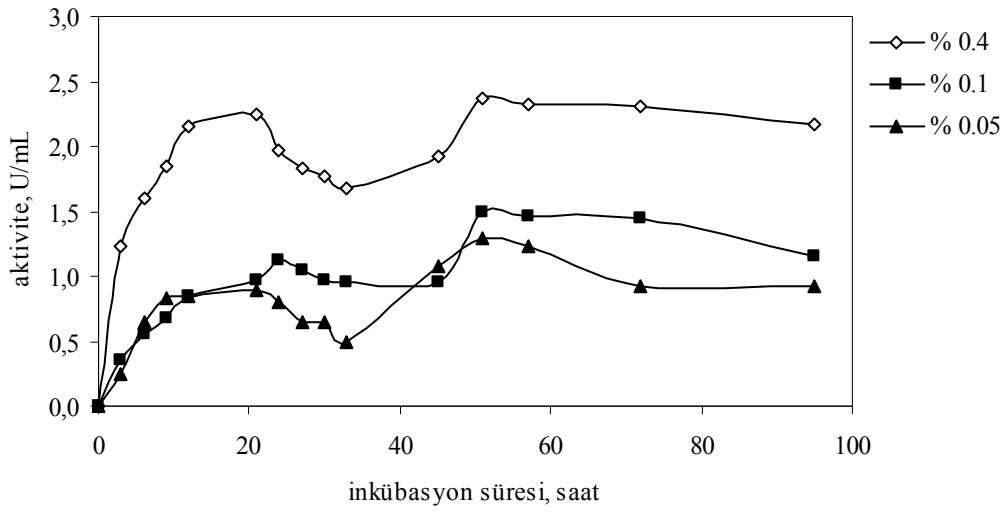
Şekil 5.34. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Tablo 5.7. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

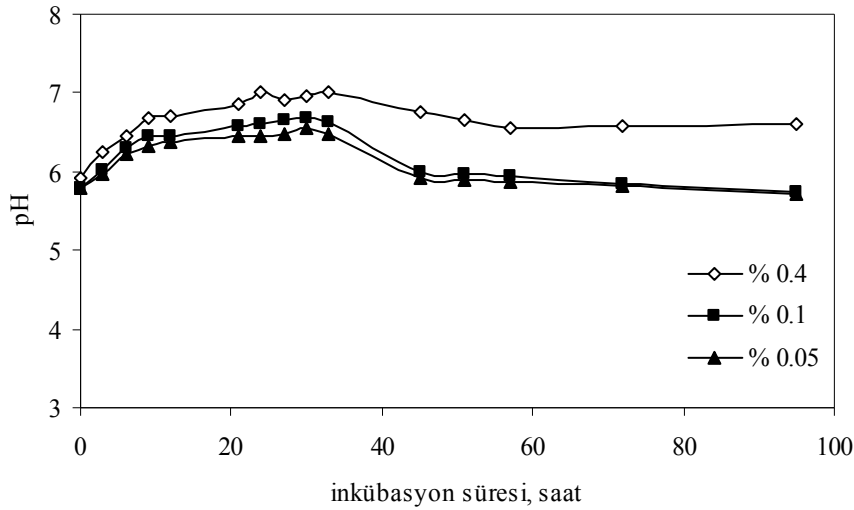
Maya özütü konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.4	1.490	1.415	0.442	3.371	9	7.25
0.1	1.475	1.690	0.263	5.608	72	5.85
0.05	1.450	1.814	0.159	9.095	32	6.35

5.3.2. Pepton Konsantrasyonunun Etkisi

Peptonun lipaz enzim üretimi üzerine etkisini incelemek için % 0.4, 1 ve 0.05 pepton içeren fermantasyon ortamları kullanılmıştır. Şekil 5.35.'de farklı pepton konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 0.4 pepton konsantrasyonunda 2.375 U/mL olarak elde edilmiştir. Şekil 5.36.'da farklı pepton konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir.

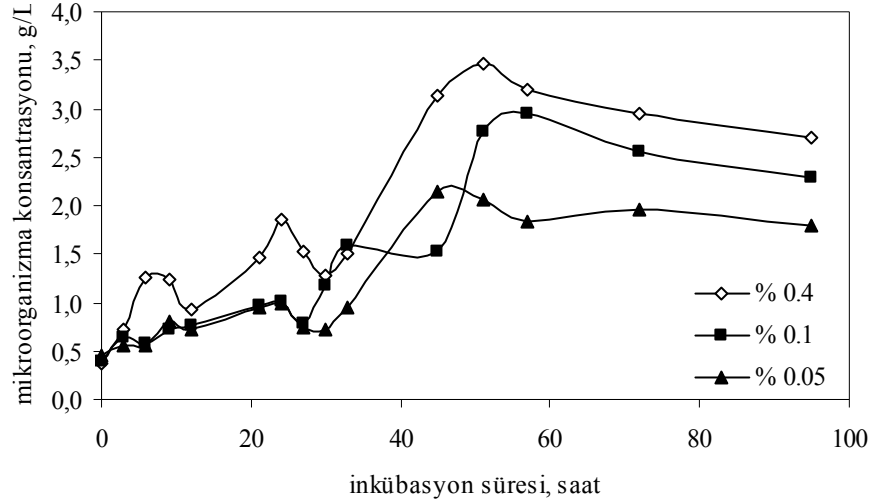


Şekil 5.35. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.36. Farklı pepton konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.37’de farklı pepton konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 0.4 pepton içeren ortamda 51. saatte 3.469 g/L olarak bulunmuştur.



Şekil 5.37. Farklı pepton konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç pepton konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.38.’de verilmiştir. Başlangıçta protein konsantrasyonları düzensiz olduğu için şekilde gösterilmemiştir. En yüksek protein konsantrasyonu % 0.4 pepton konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 27. saatte 0.324 mg/mL ’dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek spesifik aktivite protein konsantrasyonlarından gelen farklılıklar nedeniyle % 0.05 pepton konsantrasyonunda 51. saatte 16.857 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.8.’de çalışılan farklı pepton konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.

Tablo 5.8. Farklı pepton konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Pepton konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH’ı
0.4	2.500	2.955	0.233	10.740	72	6.57
0.1	1.500	2.759	0.093	16.091	51	5.97
0.05	1.300	2.057	0.077	16.857	51	5.89

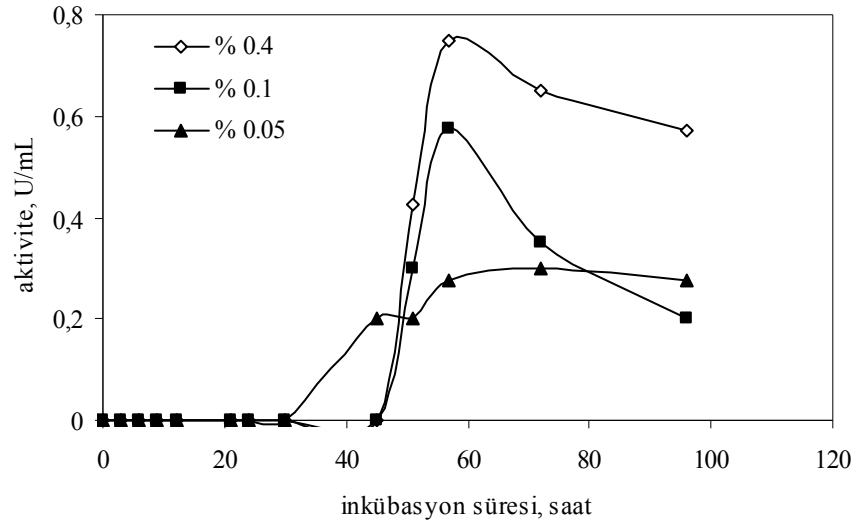


Şekil 5.38. Farklı konsantrasyonlarda pepton içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

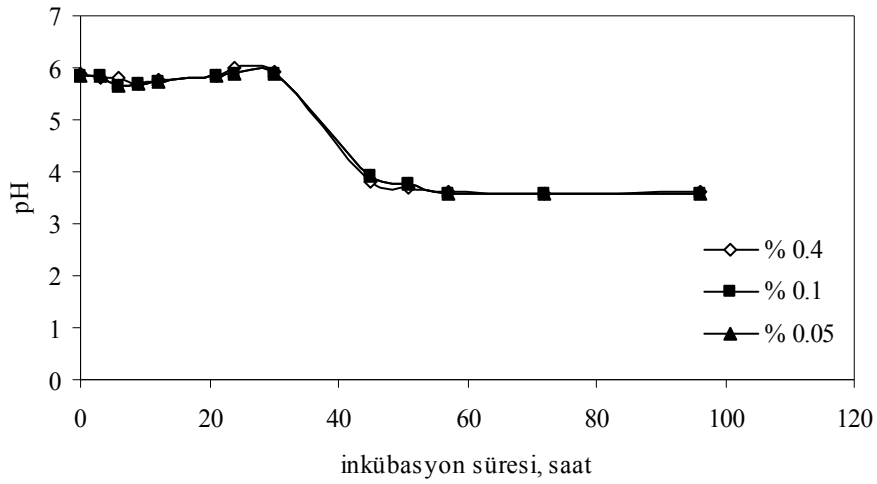
5.3.3. Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi

Azot kaynağı olarak amonyum sülfatın ((NH₄)₂SO₄) enzim üretimi üzerine etkisini gösterebilmek için % 0.4, 1 ve 0.05 amonyum sülfat içeren fermantasyon ortamları kullanılmıştır. Tüm konsantrasyonlarda kullanılan organik azot kaynaklarına göre amonyum sülfat içeren ortamda üreme (30. saat ve sonrası) çok geç başlamıştır. Bu durum organik azot kaynaklarının, mikroorganizma tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle organik azot kaynaklarında görülen iki logaritma fazı inorganik azot kaynaklarında görülmemiştir. *P. fluorescens*, oluşabilecek ara ürünler sayesinde ikinci logaritmik fazda üremeye başlamış olabilir. Şekil 5.39.'da farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 0.4 amonyum sülfat konsantrasyonunda 0.750 U/mL olarak elde edilmiştir.

Şekil 5.40.'da farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. Bütün konsantrasyonlarda da 45. saat ve sonrasında pH oldukça düşmüştür. Amonyum sülfat, asit karakterli bir azot kaynağıdır. Bu nedenle de ortamın pH'ı düşmüştür.

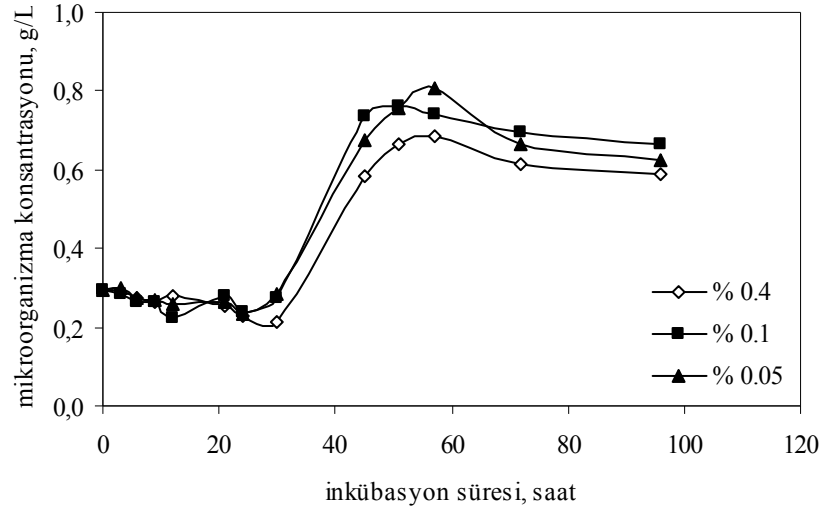


Şekil 5.39. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



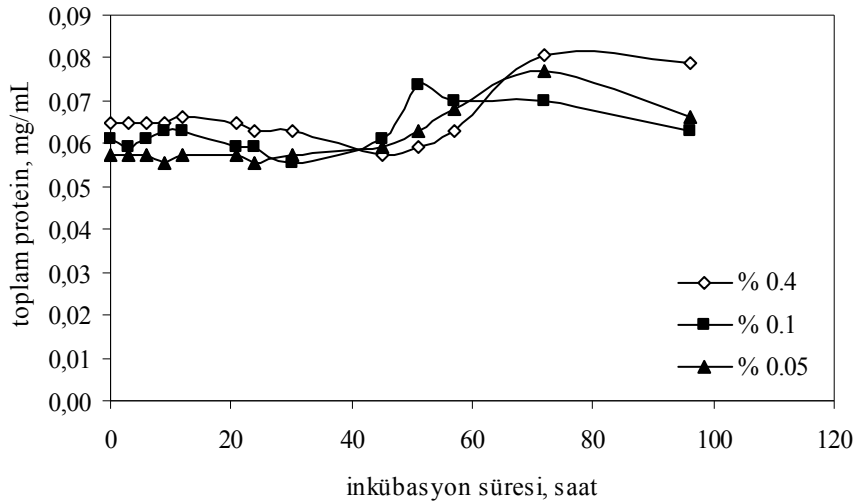
Şekil 5.40. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.41'de farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 0.05 amonyum sülfat içeren ortamda 57.saatte 0.805 g/L olarak bulunmuştur. Tüm konsantrasyonlarda 30.saat sonrasında mikroorganizma üremesi gözlenmiştir.



Şekil 5.41. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç amonyum sülfat konsantrasyonlarında elde edilen toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.42.'de verilmiştir. En yüksek protein konsantrasyonu % 0.4 amonyum sülfat konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 72.saatte 0.081 mg/mL 'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek spesifik aktivite % 0.4 amonyum sülfat konsantrasyonunda 57.saatte 11.942 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.9.'da farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



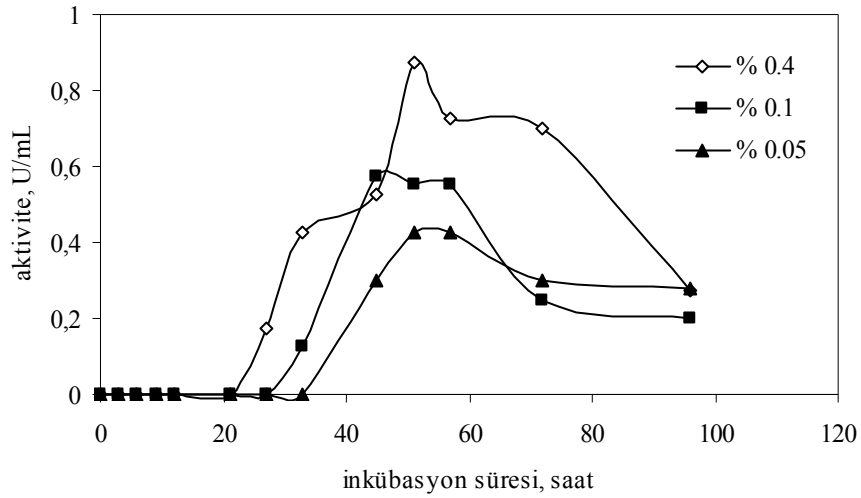
Şekil 5.42. Farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat içeren fermentasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Tablo 5.9. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Amonyum sülfat konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.4	0.750	0.685	0.063	11.942	57	3.63
0.1	0.575	0.740	0.070	8.219	57	3.57
0.05	0.300	0.666	0.077	3.890	72	3.57

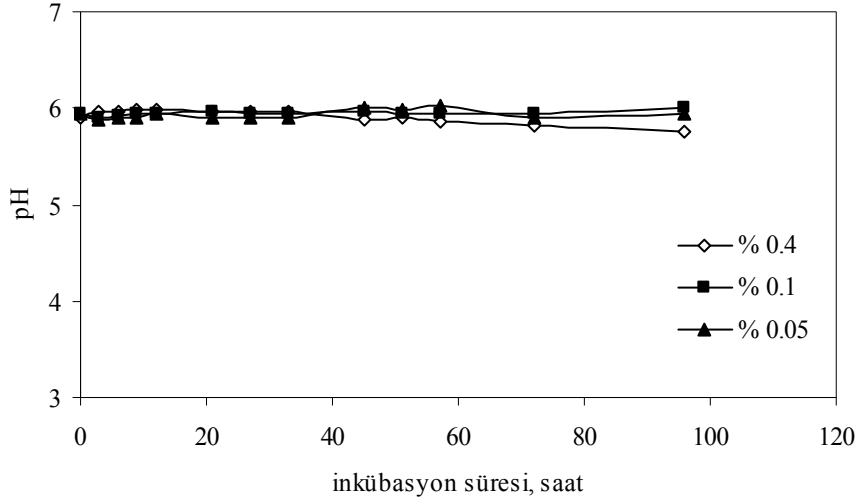
5.3.4. Amonyum Dihidrojen Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi

Amonyum dihidrojen fosfatın ((NH₄)H₂PO₄) enzim üretimi üzerine etkisini gösterebilmek için % 0.4, 1 ve 0.05 amonyum dihidrojen fosfat içeren fermantasyon ortamları kullanılmıştır. Şekil 5.43.'de farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 0.4 amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonunda 0.875 U/mL olarak elde edilmiştir.



Şekil 5.43. Farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.44.'de farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir.



Şekil 5.44. Farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında ortam pH'nın zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.45'de farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 0.4 amonyum dihidrojen fosfat içeren ortamda 72.saatte 0.791 g/L olarak bulunmuştur. Çalışılan bütün konsantrasyonlarda; başlangıçta mikroorganizma üremesi gözlenmemiştir. % 0.1 ve 0.05 amonyum dihidrojen fosfat içeren ortamlarda mikroorganizma büyümesi oldukça düşük olmuştur. Bu durum amonyum dihidrojen fosfatın düşük konsantrasyonlarda mikroorganizmanın gelişmesi için yeterli olmadığını göstermektedir.



Şekil 5.45. Farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı başlangıç amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında elde edilen toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.46.'da verilmiştir. En yüksek protein konsantrasyonu % 0.05 amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonunda ölçülmüş olup, 51.saatte 0.081 mg/mL 'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek spesifik aktivite % 0.4 amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonunda 51.saatte 15.725 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.9.'da farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



Şekil 5.46. Farklı konsantrasyonlarda amonyum dihidrojen fosfat içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Tablo 5.10. Farklı amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Amonyum dihidrojen fosfat konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.4	0.875	0.653	0.056	15.725	51	5.91
0.1	0.575	0.392	0.056	10.333	45	5.96
0.05	0.425	0.358	0.077	5.511	57	6.03

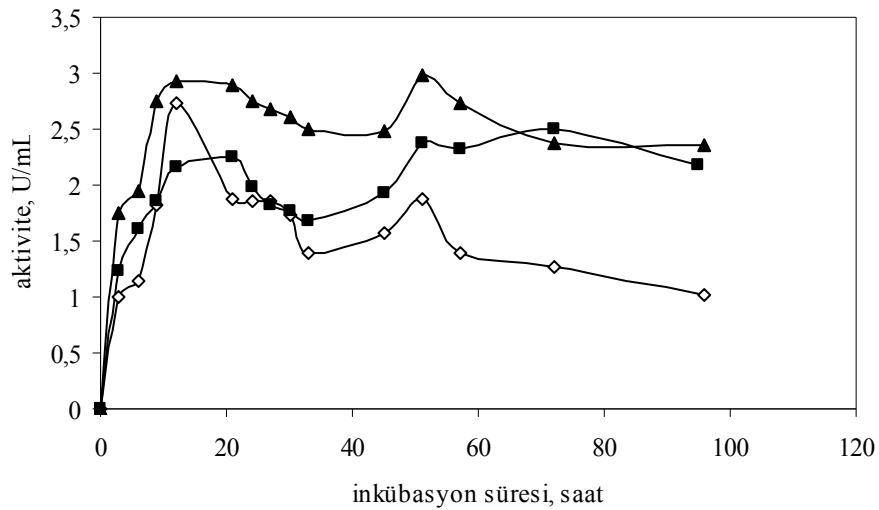
Azot kaynakları karşılaştırıldığında en iyi aktivite % 0.4 oranında pepton içeren ortamda 2.500 U/mL olarak elde edildiğinden bundan sonraki çalışmalarda azot kaynağı olarak % 0.4 oranında pepton kullanılmıştır. Diğer azot kaynakları olan maya özütü,

amonyum sülfat ve amonyum dihidrojen fosfat için elde edilen maksimum enzim aktiviteleri ise sırasıyla; 1.490, 0.750 ve 0.875 U/mL olarak bulunmuştur.

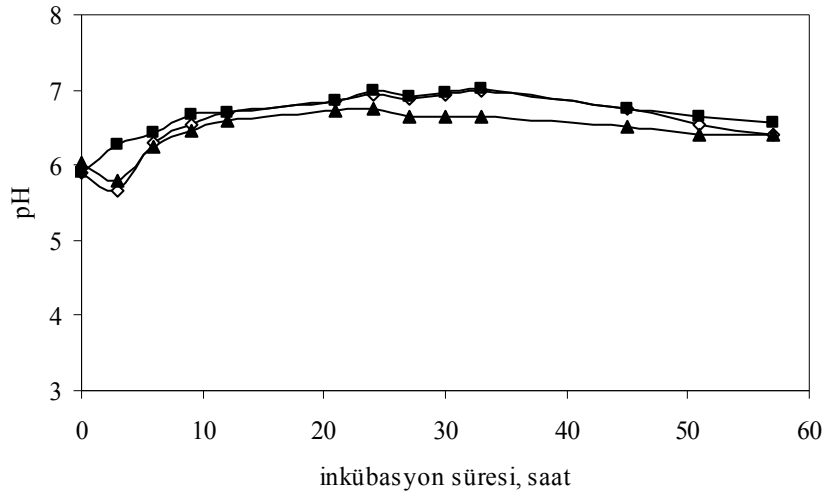
5.4. Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim üretimi üzerine fosfat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için üç farklı konsantrasyonda fermantasyon ortamına (% 0.025 KH_2PO_4 + % 0.025 K_2HPO_4 ; % 0.05 KH_2PO_4 + % 0.05 K_2HPO_4 , % 0.1 KH_2PO_4 + % 0.1 K_2HPO_4) fosfat ilave edilmiştir. Fermantasyon ortamı bileşimi Tablo 4.2.'de verildiği gibidir (karbon kaynağı % 1 mısır yağı, azot kaynağı % 0.4 pepton).

Şekil 5.47.'de farklı fosfat konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 0.1 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 içeren ortamda 2.975 U/mL olarak elde edilmiştir. Şekil 5.48.'de farklı fosfat konsantrasyonlarında ortam pH'nın zamanla değişimi görülmektedir.



Şekil 5.47. Farklı fosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (◇: % 0.025, ■: % 0.05, ▲: % 0.1 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 , % 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşıl oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.48. Farklı fosfat konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (◇: % 0.025, ■: % 0.05, ▲: % 0.1 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 , % 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı fosfat konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 5.49.'da verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 0.025 K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 içeren ortamda 72.saatte 3.728 g/L olarak bulunmuştur. Farklı başlangıç fosfat konsantrasyonlarında ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları da Şekil 5.50.'de verilmiştir. En yüksek protein konsantrasyonu % 0.1 K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 içeren ortamda elde edilmiş olup, 30.saatte 0.363 mg/mL'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde ise, en yüksek spesifik aktivite protein konsantrasyonlarında meydana gelen farklılıklar nedeniyle % 0.05 K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 konsantrasyonunda 51.saatte 12.63 U/mg olarak belirlenmiştir.

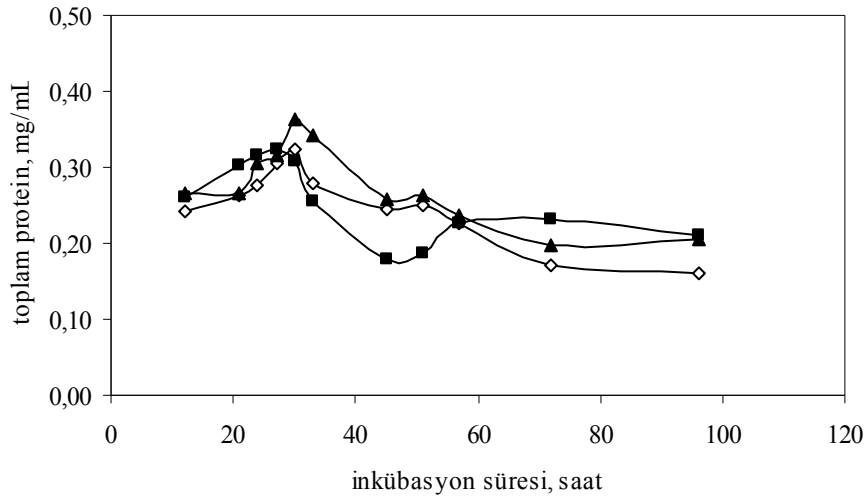
Tablo 5.11.'de çalışılan fosfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.

Tablo 5.11. Farklı fosfat konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.025	2.725	1.402	0.242	11.273	12	6.71
0.05	2.500	2.955	0.233	10.740	72	6.57
0.1	2.975	3.197	0.263	11.312	51	6.40



Şekil 5.49. Farklı fosfat konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (◇: % 0.025, ■: % 0.05, ▲: % 0.1 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 , % 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.50. Farklı konsantrasyonlarda fosfat içeren fermentasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (◇: % 0.025, ■: % 0.05, ▲: % 0.1 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 , % 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

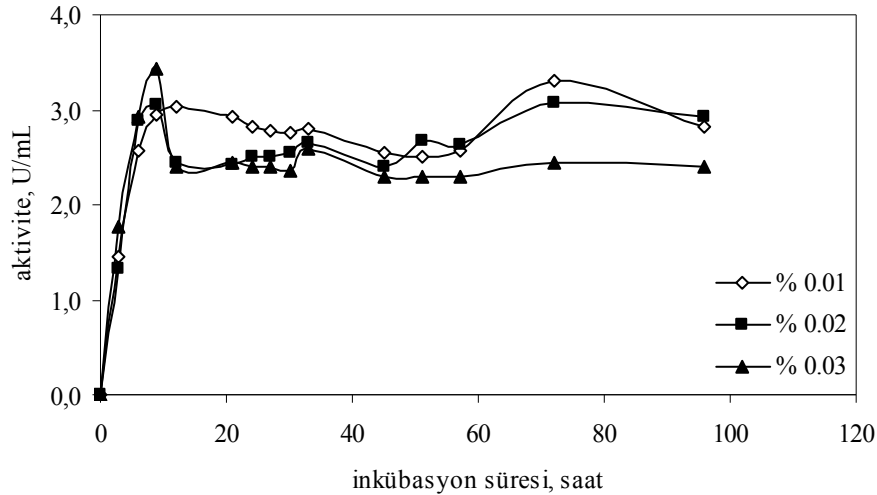
5.5. İyonların Etkisi

Metal iyonları mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olup, lipaz sentezini olumlu yada olumsuz yönde etkileyebilir (Omar vd., 1987, Makhzoum vd., 1995, Sharon, vd., 1998, Hong-wei vd., 2009). İnorganik metal iyonlarından olan Ca^{++} ve Na^+ iyonları, tuzları halinde optimize edilen fermentasyon ortamına (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, % 0.1

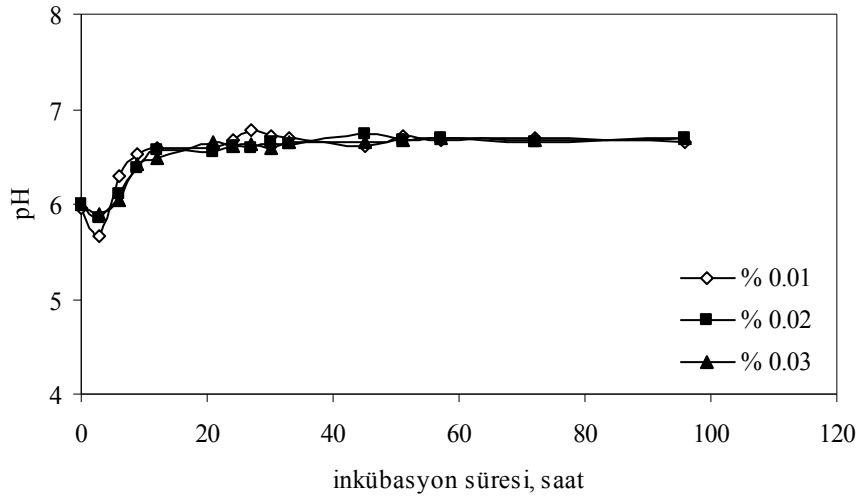
KH₂PO₄, % 0.1 K₂HPO₄, % 0.0005 MgSO₄.7H₂O) ilave edilerek bu iyonların enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

5.5.1. Ca⁺⁺ İyonunun Etkisi

Ca⁺⁺ iyonunun enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için % 0.01, 0.02 ve 0.03 CaCl₂.2H₂O içeren fermentasyon ortamları kullanılmıştır. Şekil 5.51.'de farklı CaCl₂.2H₂O konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 0.03 CaCl₂.2H₂O konsantrasyonunda 3.425 U/mL olarak elde edilmiştir. Ca⁺⁺ ilave edilmeyen ortamda ise enzim aktivitesi 2.975 U/mL olarak bulunmuştur. Ca⁺⁺ iyonunun ortama ilave edilmesi lipaz enzimi aktivitesini 0.450 U/mL arttırmıştır. McKellar (1989), kalsiyumun psikrofil bakteriler ile hücre dışı enzim sentezinde en önemli iyonlardan biri olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca Ca⁺⁺ iyonlarının saflaştırılmış lipazın hidrolitik aktivitesini stabilize ettiği ve ilerlettiği belirtilmiştir. Şekil 5.52.'de farklı CaCl₂.2H₂O konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi farklı CaCl₂.2H₂O konsantrasyonları pH üzerinde etkili değildir.

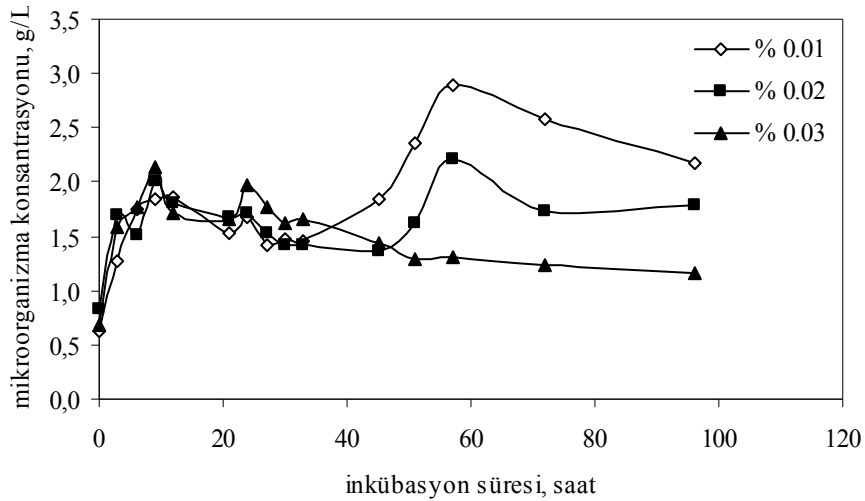


Şekil 5.51. Farklı CaCl₂.2H₂O konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşırı oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.52. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

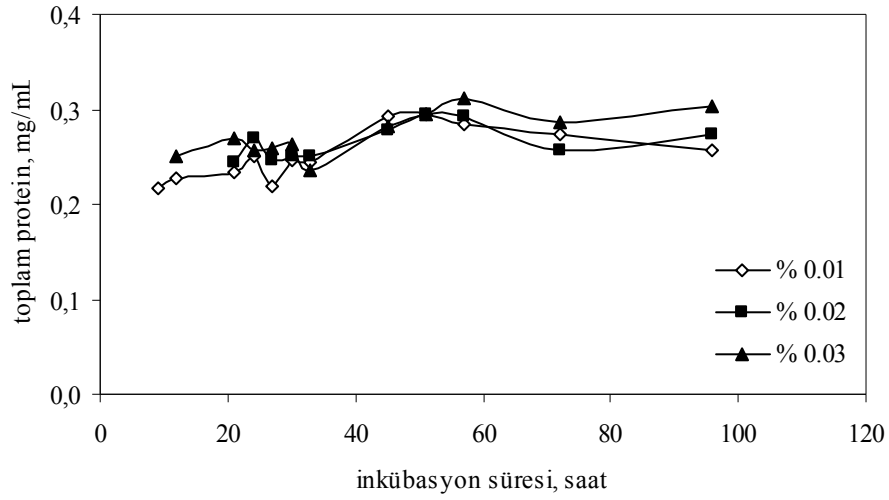
Şekil 5.53.'de farklı Ca^{++} konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 0.01 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ içeren ortamda 57.saatte 2.885 g/L olarak bulunmuştur.



Şekil 5.53. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Farklı Ca^{++} konsantrasyonlarında elde edilen toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.54.'de verilmiştir. En yüksek protein konsantrasyonu % 0.03 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

konsantrasyonunda elde edilmiş olup, 57.saatte 0.312 mg/mL'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek spesifik aktivite % 0.01 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda 27.saatte 12.702 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.11.'de farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



Şekil 5.54. Farklı konsantrasyonlarda $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

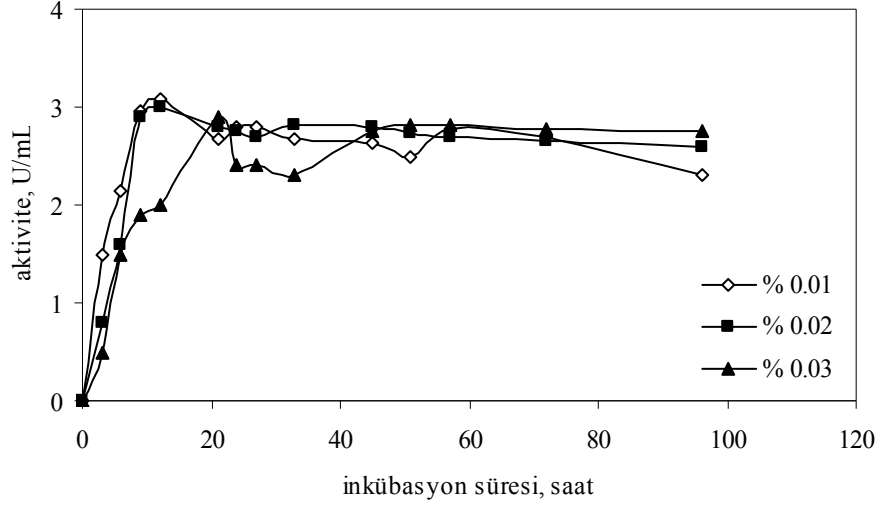
Tablo 5.12. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.01	3.300	2.572	0.274	12.046	72	6.69
0.02	3.075	1.738	0.258	11.926	72	6.65
0.03	3.425	2.143	0.269	12.753	9	6.42

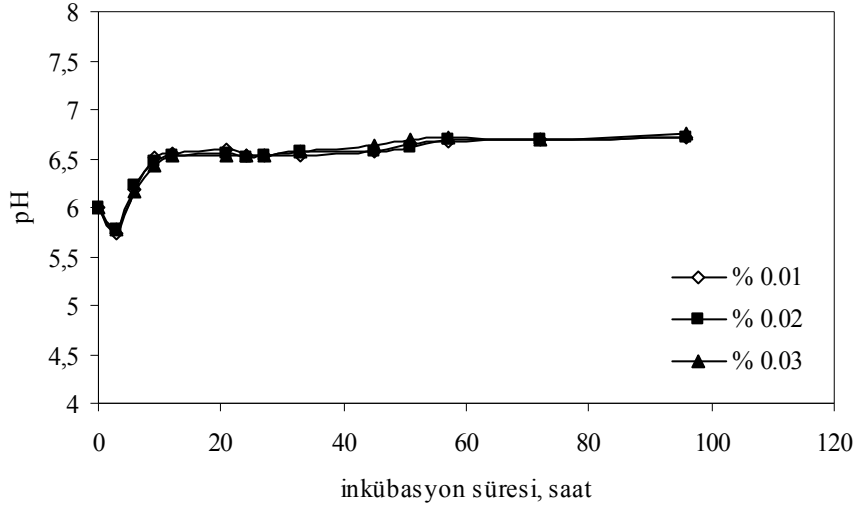
5.5.2. Na^+ İyonunun Etkisi

Na^+ iyonunun lipaz üretimi üzerine etkisini belirlemek için Ca^{++} iyonunda olduğu gibi % 0.01, 0.02 ve 0.03 konsantrasyonlarında NaCl fermantasyon ortamına eklenmiştir. Şekil 5.55.'de farklı NaCl konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. Ortam özellikleri birbirine benzemekle birlikte en yüksek enzim aktivitesi % 0.01 NaCl içeren

fermantasyon ortamında 3.075 U/mL olarak elde edilmiştir. Na^+ , optimize edilen ortama göre (2.975 U/mL) enzim aktivitesini fazla etkilememekle beraber, 0.100 U/mL arttırmıştır. Şekil 4.56.'da ortam pH'nın zamanla değişimi verilmiştir.



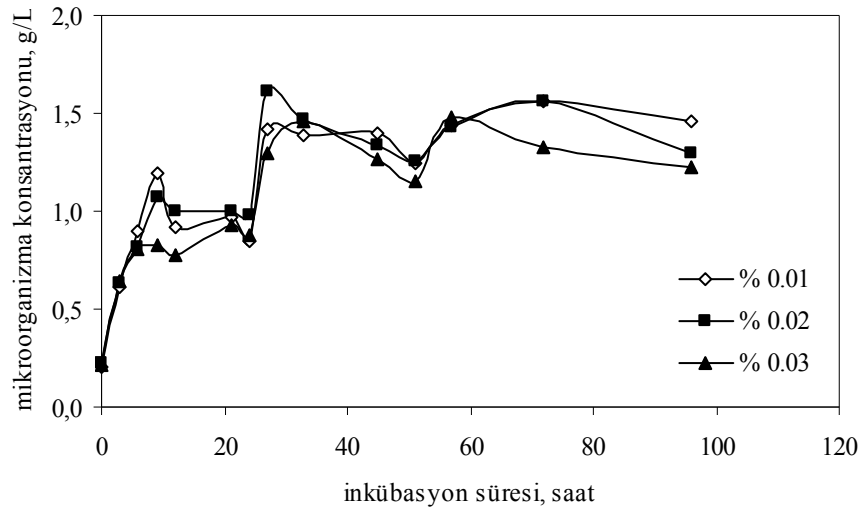
Şekil 5.55. Farklı NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



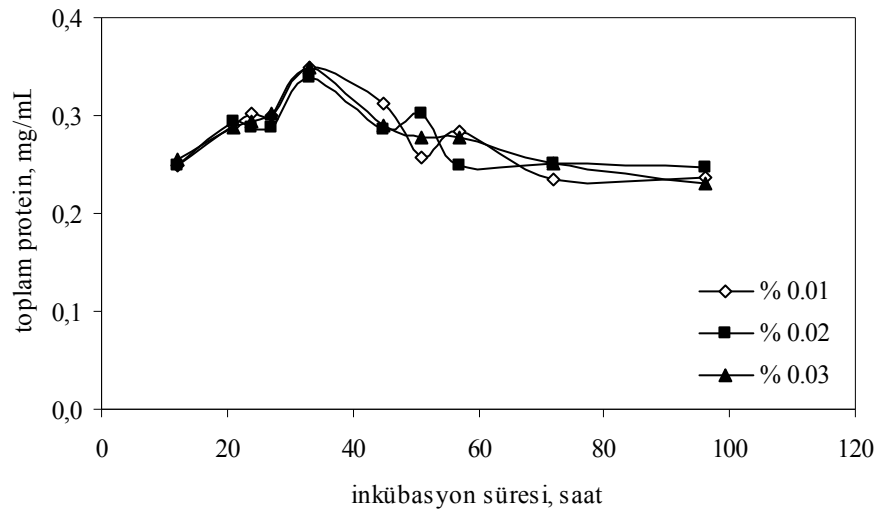
Şekil 5.56. Farklı NaCl konsantrasyonlarında ortam pH'nın zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.57'de farklı NaCl konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu % 0.02 NaCl içeren ortamda 27.saatte 1.614 g/L olarak bulunmuştur. Farklı başlangıç NaCl

konsantrasyonlarında elde edilen toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.58.'de verilmiştir. En yüksek protein konsantrasyonu % 0.01 ve 0.03 NaCl içeren ortamlarda eşit olup, 33.saatte 0.349 mg/mL 'dir. Spesifik aktiviteler incelendiğinde en yüksek % 0.01 NaCl konsantrasyonunda 12.355 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.12.'de farklı NaCl konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.



Şekil 5.57. Farklı NaCl konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.58. Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Tablo 5.13. Farklı NaCl konsantrasyonlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

NaCl konsantrasyonu (%)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
0.01	3.075	0.917	0.249	12.355	12	6.56
0.02	3.000	1.001	0.249	12.054	12	6.54
0.03	2.900	0.930	0.288	10.061	21	6.54

5.6. Atık Yağlar Kullanılarak Lipaz Üretimi

Enzim üretiminde fermantasyon ortamının ana bileşenlerinin başında karbon kaynağı gelmekte ve ortam maliyetinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle alternatif substratların kullanımı çeşitli avantajlar sağlayabilir.

Günümüzde kızartılmış yiyecekler birçok ülkede oldukça fazla tüketilen önemli gıdalardan biridir. Kızartılmış yiyeceklerin artmasına bağlı olarak atık kızartma yağı miktarlarında da önemli artışlar olmaktadır. Kızartma işlemi sonucu oluşan atık yağlar alıcı ortamlarda önemli sorunlara ve çevre problemlerine yol açabilmektedir. Bununla birlikte atık yağlar, mikrobiyal büyüme için yüksek enerjili bir besin kaynağı olarak düşünülebilir ve değerli ürünlere dönüştürülebilir. Bu nedenle optimize edilen fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak tatlı ve patates kızartılmış iki farklı atık yağ substrat olarak kullanılmış ve enzim üretimi incelenerek atığın değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Patates kızartılmış atık yağ ev ortamında patates kızartılmış yağdan, tatlı kızartılmış atık yağ ise, yerel bir pastaneden temin edilmiştir.

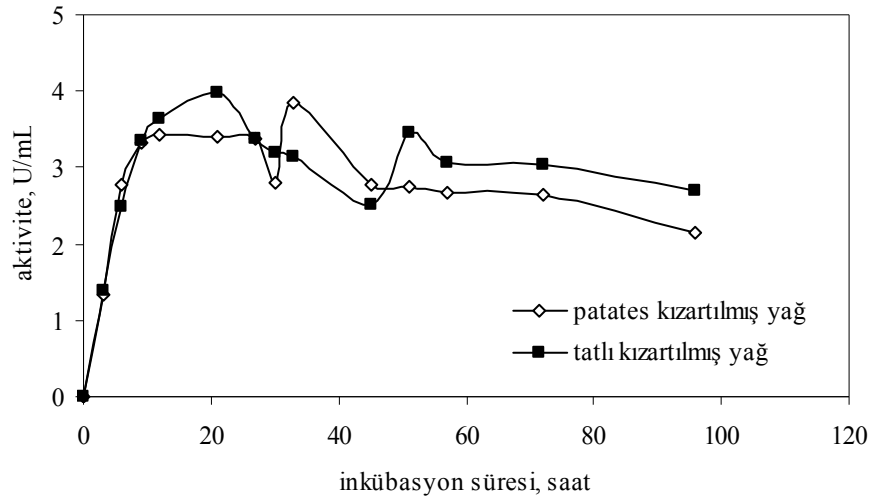
Bitkisel yağlarda 16 ve 18 karbon içeren yağ asitleri baskındır. Kızartılmış yağların yağ asiti içerikleri, kızartılan gıdaya bağlı olarak değişebilmektedir. Kullanılan atık yağların yağ asiti bileşimini belirlemek için yapılan yağ asiti analizleri sonuçları Tablo 5.14.'de verilmiştir.

Tablo 5.14. Mikrobiyal büyüme ve lipaz üretimi için substrat olarak kullanılan atık yağların yağ asiti bileşimi (x110 kat)

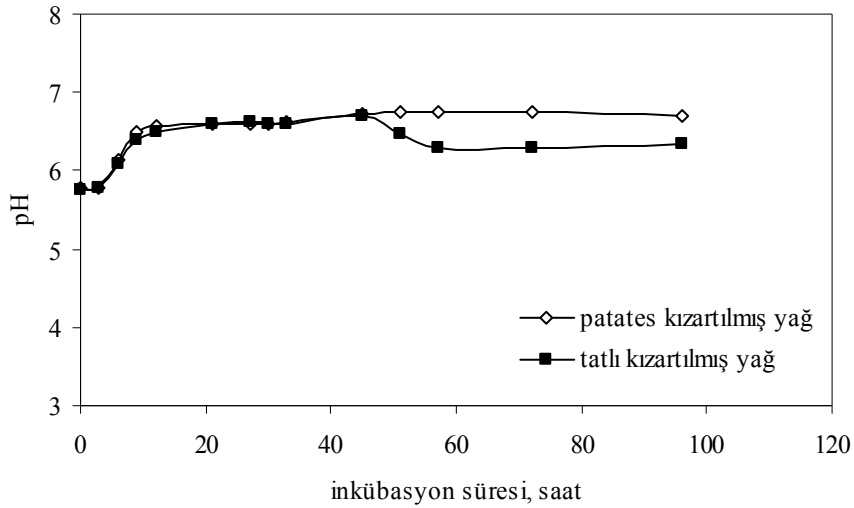
Yağ asitleri	Patates kızartılmış yağ (µg/µL)	Tatlı kızartılmış yağ (µg/µL)
Palmitik asit, 16:0	0.4854	0.2856
Palmitoleik asit, 16:1 (n-7)	0.0488	0.0393
Stearik asit, 18:0	0.1187	0.2027
Oleik asit, 18:1 (n-9)	1.2659	1.2010
Linolelaidik asit 18:2 (n-6t)	0.1330	0.1351
Linoleik asit, 18:2 (n-6)	3.2863	4.0894
γ-Linolenik asit, 18:3 (n-6)	0.4638	0.5858
α-Linolenik asit, 18:3 (N-3)	-	0.0516
Dokosadienoik asit, 22:2	-	0.0413

5.6.1. Tatlı ve Patates Kızartılmış Atık Yağların Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Enzim üretimi üzerine atık yağların etkisini belirlemek için, optimize edilen fermentasyon ortamında (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, % 0.1 KH₂PO₄, % 0.1 K₂HPO₄, % 0.0005 MgSO₄.7H₂O) karbon kaynağı olarak mısır yağı yerine % 1 oranında tatlı ve patates kızartılmış atık yağlar kullanılmıştır. Şekil 5.59.'da kullanılan atık yağların enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek enzim aktiviteleri; patates kızartılmış yağ için 3.85 U/mL, tatlı kızartılmış yağ için 3.975 U/mL olarak elde edilmiştir. Bu değerler, mısır yağı kullanılarak belirlenen değer olan 2.975 U/mL'den sırasıyla, 0.875 ve 1.000 U/mL daha fazladır. Bu atık kızartma yağlarının enzim üretimi için daha etkin bir substrat olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Şekil 5.60.'da ortam pH'larının zamanla değişimi görülmektedir. Tatlı kızartılmış yağ içeren ortamda pH, 45.saatten sonra azalmıştır.



Şekil 5.59. % 1 konsantrasyonunda atık kızartma yağları için enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (% 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



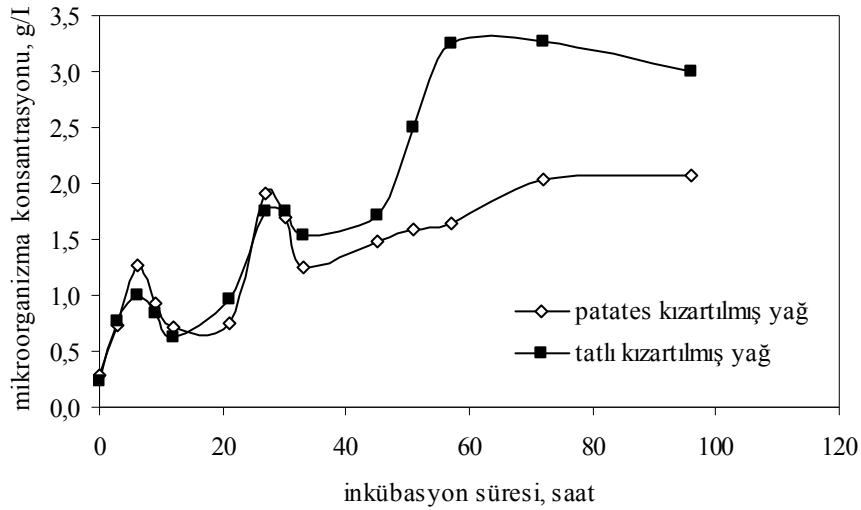
Şekil 5.60. % 1 konsantrasyonunda atık kızartma yağları için ortam pH'larının zamanla değişimi (% 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Elde edilen mikroorganizma konsantrasyonlarının zamanla değişimi Şekil 5.61'de verilmiştir. Tatlı kızartılmış atık yağda mikroorganizma konsantrasyonu daha fazla olup, maksimum 57.saatte 3.257 g/L'dir. Patates kızartılmış yağ için ise maksimum mikroorganizma konsantrasyonu 72.saatte 2.075 g/L olarak belirlenmiştir. Elde edilen toplam protein konsantrasyonları Şekil 5.62.'de gösterilmiştir. En yüksek protein konsantrasyonları birbirine yakın olmakla beraber, patates kızartılmış atık yağ için 30.saatte 0.322 mg/mL, tatlı kızartılmış yağ için 33.saatte 0.317 mg/mL olarak

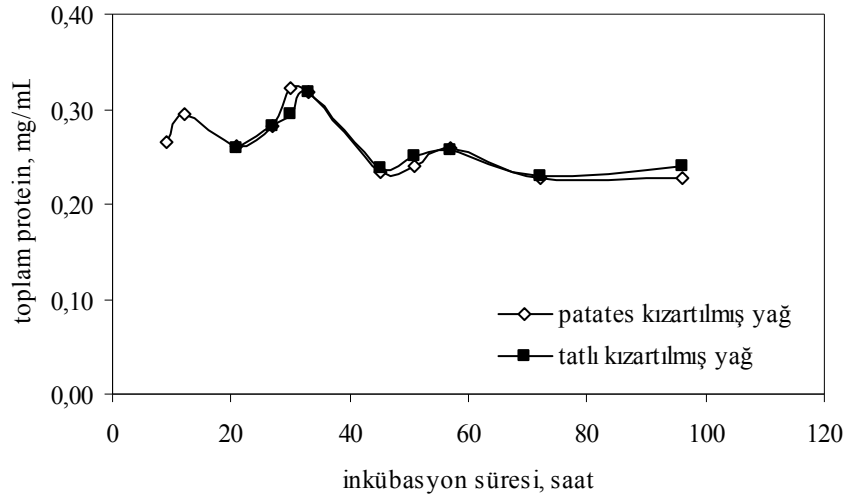
bulunmuştur. Spesifik aktiviteler incelendiğinde, en yüksek spesifik aktiviteler patates ve tatlı kızartılmış yağlar için sırasıyla, 13.007 U/mg ve 15.311 U/mg olarak belirlenmiştir. Tablo 5.15.'de her iki atık yağ için maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi verilmiştir.

Tablo 5.15. Atık patates ve tatlı kızartma yağı içeren fermentasyon ortamlarında maksimum aktivite elde edilmesi durumunda ortam özelliklerinin değişimi

Atık yağ konsantrasyonu (% 1)	Aktivite (U/mL)	Mikroorganizma kons. (g/L)	Protein kons. (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Zaman (saat)	Ortam pH'ı
Patates kızartma yağı	3.850	1.249	0.317	12.150	33	6.62
Tatlı kızartma yağı	3.975	0.963	0.260	15.311	21	6.59



Şekil 5.61. % 1 konsantrasyonunda atık kızartma yağı içeren fermentasyon ortamında mikroorganizma konsantrasyonlarının zamanla değişimi (% 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)



Şekil 5.62. % 1 konsantrasyonunda atık kızartma yağı içeren fermantasyon ortamlarında protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi (% 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Fermantasyon ortamına % 1 oranında karbon kaynağı olarak eklenen atık yağları, mikroorganizmanın hangi miktarda besin kaynağı olarak kullandığını belirlemek için farklı zamanlarda alınan numunelerdeki yağ asitleri konsantrasyonlarının değişimi tespit edilmiştir (Tablo 5.16). Numune alınan tüm saatlerde ham yağın bileşiminde diğer yağ asitlerine göre daha fazla bulunan yağların, yağ asiti analizi ile fermantasyon ortamındaki palmitik asit (16:0), stearik asit (18:0), oleik asit (18:1) ve linoleik asit (18:2) konsantrasyonları belirlenmiştir. % 1 oranında fermantasyon ortamına katılan yağdaki 96 saatlik fermantasyon sonunda *P. fluorescens*'in yağı besin kaynağı olarak tüketmesi sonucu patates kızartılmış atık yağın olduğu fermantasyon ortamında oleik asit (18:1) konsantrasyonu 0.0256 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'ye, linoleik asit (18:2) konsantrasyonu 0.0725 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'ye düşmüştür. Tatlı kızartılmış atık yağ için ise oleik asit (18:1) konsantrasyonu 0.0242 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'ye linoleik asit (18:2) konsantrasyonu 0.0587 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'ye azalmıştır. Analiz edilen diğer yağ asitleri ise tamamen tükenmiştir (Tablo 5.16.).

Tablo 5.16. Fermantasyon ortamında yağ asiti konsantrasyonlarının zamanla değişimi (µg/µL)

Patates kızartılmış atık yağ				
Zaman, saat	Palmitik asit 16:0	Stearik asit 18:0	Oleik asit 18:1	Linoleik asit 18:2
0	0.5344	0.1306	1.3925	3.6149
30	0.2782	0.0470	0.2622	0.5088
45	0.0939	0.0252	0.2103	0.2659
51	0.0726	0.0181	0.1847	0.2263
57	0.0490	0.0171	0.0702	0.0857
72	-	-	0.0286	0.0740
96	-	-	0.0256	0.0725
Tatlı kızartılmış atık yağ				
Zaman, saat	Palmitik asit 16:0	Stearik asit 18:0	Oleik asit 18:1	Linoleik asit 18:2
0	0.3142	0.2230	1.3211	4.4980
30	0.1662	0.0813	0.5199	1.6604
45	0.0563	0.0220	0.1953	0.4197
51	0.0350	0.0214	0.0869	0.1584
57	0.0302	0.0190	0.0827	0.1032
72	-	-	0.0604	0.0740
96	-	-	0.0242	0.0587

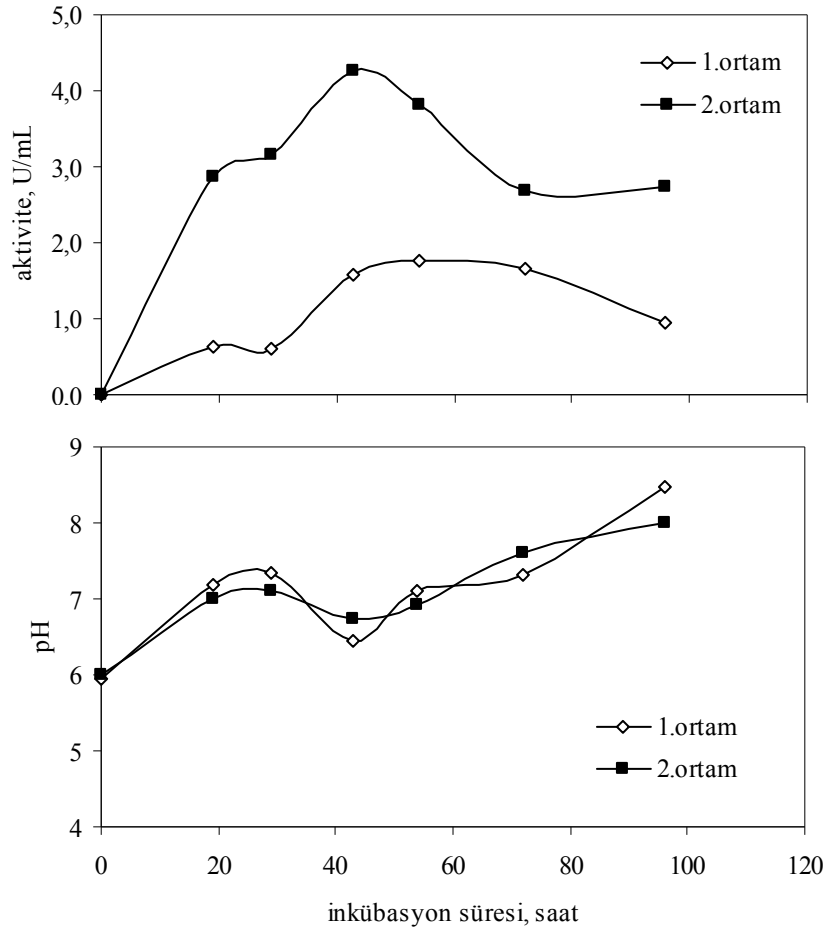
5.7. Katı Substrat Kullanılarak Lipaz Üretimi

Genel olarak katı substrat fermentasyonu için kullanılan substratlar tarımsal veya tarım-sanayi yan ürünleri olan kompozit ve heterojen ürünlerdir. Bu nedenle çalışmanın bu aşamasında katı substrat olarak ayçekirdeği küspesi kullanılmıştır. Ay çekirdeği küspesi kullanılarak enzim üretimi ile hem ucuz karbon kaynağı sağlayarak üretim maliyetini düşürmek, hem de bir tarım-sanayi yan ürününün hammadde olarak kullanılması ile organik bir atığın endüstriyel biyoteknolojide kıymetli bir ürün olan enzim üretiminde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bütün deneylerde sıvı kültürde olduğu gibi ortam parametreleri; pH 6, sıcaklık 30 °C ve karıştırma hızı 150 rpm olarak alınmıştır.

5.7.1. Ortam Seçimi

Ayçekirdeği küspesinin substrat olarak kullanıldığı deneylerde; ilk olarak ay çekirdeği küspesi + musluk suyu (1. ortam) ve ay çekirdeği küspesi + optimize edilen sıvı kültür ortamı (2. ortam) kullanılarak fermentasyon ortamları hazırlanmış ve enzim üretimleri karşılaştırılmıştır. 1. ortamda maksimum aktivite 1.775 U/mL olarak elde edilirken, 2. ortamda 4.275 U/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 5.63).

2. ortamda aktivite daha yüksek olmasına rağmen, ay çekirdeği küspesi + musluk suyu içeren ortamda optimum enzim üretim şartlarını belirlemek ve enzim aktivitesini artırmak için çalışmanın bundan sonraki kısımlarında 1. ortam kullanılmıştır. Ayrıca saf su yerine musluk suyu kullanılması hem maliyeti azaltan bir faktör olması, hem de mikroorganizmanın kullanabileceği mineralleri içermesi açısından faydalıdır. Şekil 5.63’de ortam pH’ larının değişimi de gösterilmiştir.

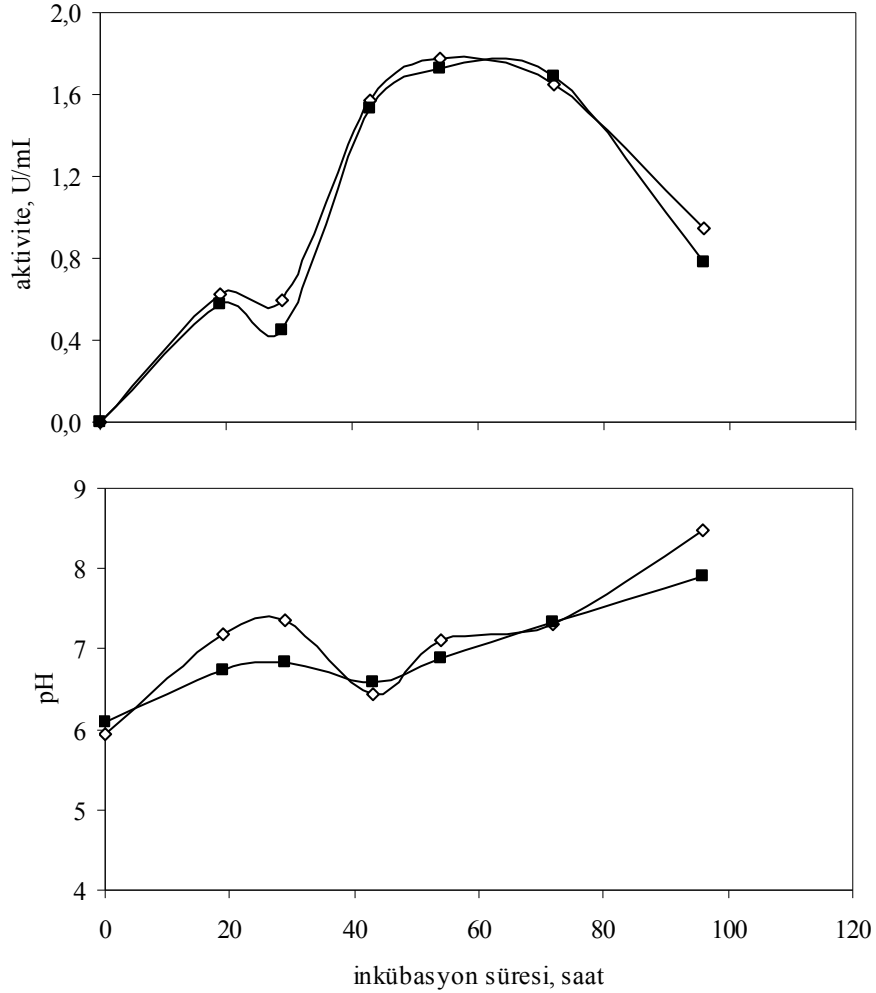


Şekil 5.63. Farklı ortam bileşimlerinde enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi (%5 ay çekirdeği küspesi, partikül boyutu: 20-100 mesh arası, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

5.7.2. Partikül Boyutunun Etkisi

Partikül boyutunun enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için, 20-100 mesh arası ve +20 mesh olmak üzere iki farklı partikül boyutu denenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.64'de verilmiştir. Her iki partikül boyutunda da maksimum enzim üretimi birbirine yakın olmakla beraber, 20-100 mesh arası partikül boyutu için 1.775 U/mL, +20 mesh için ise 1.725 U/mL olarak elde edilmiştir. Katı substratlar genellikle birim hacimleri başına geniş yüzey alanına sahiptir. Daha küçük substrat partikülleri mikrobiyal etkinlik için daha büyük yüzey alanı sağlarken partiküller arasındaki mesafe sınırlamalarına bağlı olarak havalandırmada zorluklara yol açar. Daha büyük partiküller ise daha iyi havalandırma sağlar, ama daha düşük yüzey alanına neden olur. Biyoproses optimizasyonunda bazen maliyet etkinliği için farklı boyutlardaki partikül karışımlarını kullanmak gerekli olabilir

(Flickinger ve Drew, 1999). Bu nenedenle ve ayrıca, 20-100 mesh arası partikül boyutunda kısmen daha yüksek aktivite elde edilmesi nedeniyle daha sonraki deneylerde 20-100 mesh arası partikül boyutu kullanılmıştır.

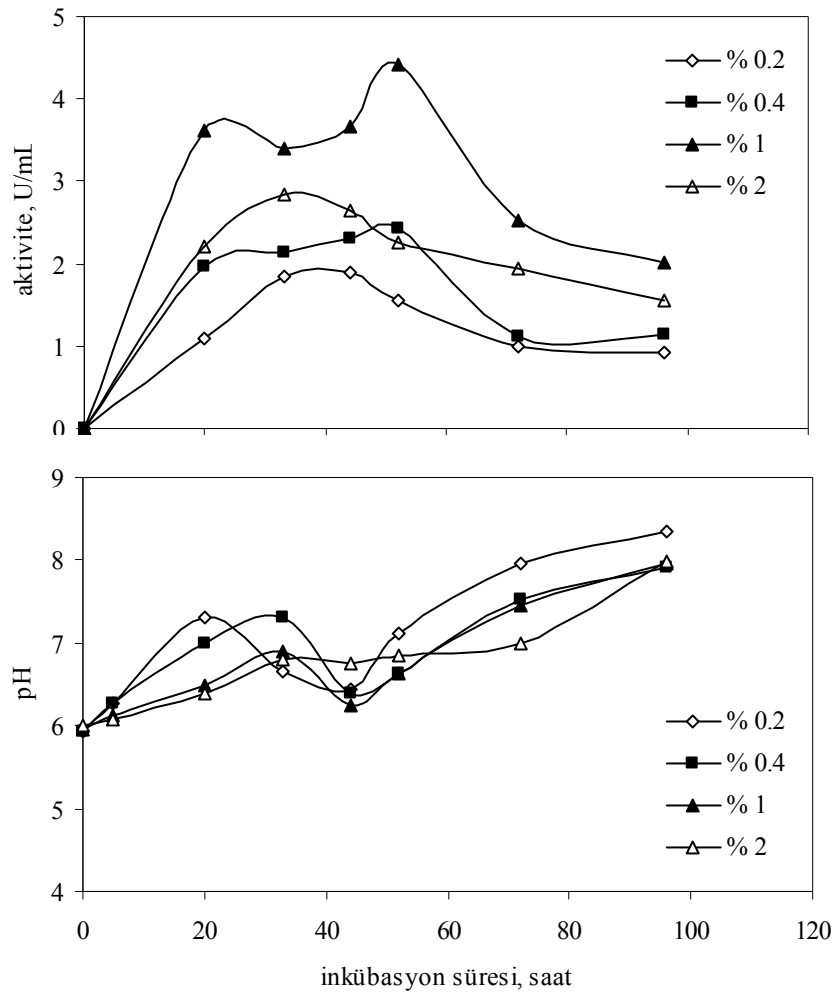


Şekil 5.64. Farklı ayçekirdeği küspesi boyutlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi (%5 ay çekirdeği küspesi, ◇: 20-100 mesh arası ■: + 20 mesh pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

5.7.3. Azot Kaynağının Etkisi

Azot ilavesinin enzim aktivitesi arttırabileceği düşünülerek fermantasyon ortamına azot kaynağı eklenmiştir. Sıvı kültürde en yüksek enzim aktivitesi azot kaynağı olarak pepton kullanıldığı zaman elde edildiğinden, katı substrat fermantasyonunda da pepton kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (% 0.2, 0.4, 1 ve 2) peptonun fermantasyon

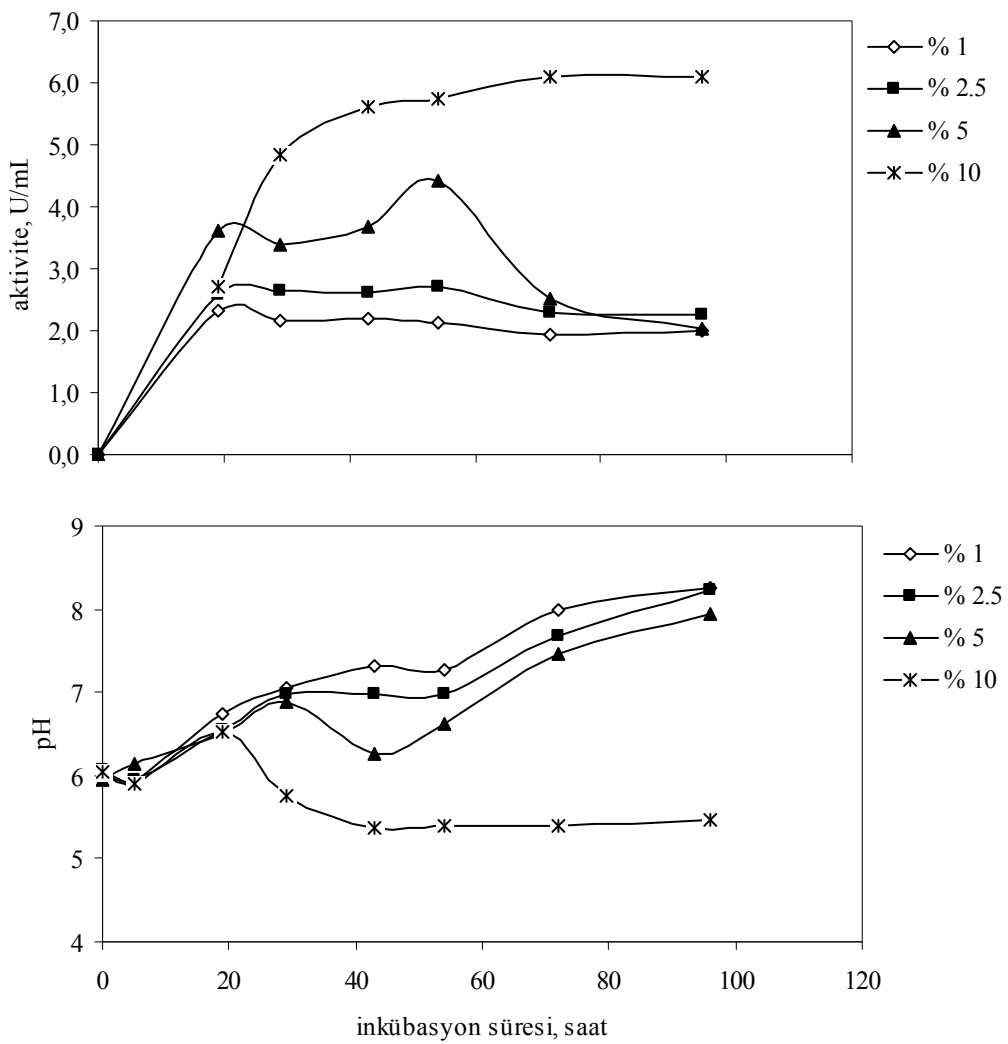
ortamına ilave edilmesi durumunda enzim aktivitelerinin zamanla değişimi Şekil 5.65’de verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi, % 1 pepton konsantrasyonunda 4.425 U/mL olarak elde edilmiştir. % 0.2, 0.4, ve 2 pepton konsantrasyonları için ise maksimum aktiviteler sırasıyla; 1.900, 2.425 ve 2.850 U/mL olarak bulunmuştur. Pepton ilavesi enzim aktivitesinde azot içermeyen ortama göre 2.650 U/mL’lik bir artış sağlamıştır. % 1 pepton konsantrasyonundan düşük konsantrasyonlarda azot kaynağının yetersiz olması nedeniyle enzim aktivitesi daha düşük olurken, daha yüksek konsantrasyonlar ise enzim üretimini bastırmıştır.



Şekil 5.65. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi (%5 ay çekirdeği küspesi, partikül boyutu: 20-100 mesh arası, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

5.7.4. Ayçekirdeği Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi

Substrat miktarının değişimiyle ortamın nem miktarının da değiştiği farklı ayçekirdeği küspesi konsantrasyonlarında (% 1, 2.5, 5, 10) elde edilen sonuçlar Şekil 5.66'da verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi % 10 ayçekirdeği küspesi içeren ortamda 6.100 U/mL olarak elde edilirken, % 1, 2.5 ve 5 ayçekirdeği küspesi içeren ortamlarda sırasıyla, 2.325, 2.725, 4.425 U/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.66. Farklı ayçekirdeği küspesi konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'nın zamanla değişimi (% 1 pepton, partikül boyutu: 20-100 mesh arası, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

% 10 ayçekirdeği küspesi içeren ortamda pH'ın diğer ortamlara göre daha düşük olması ayçekirdeği küspesindeki yağların hücreye bağlı enzimler ile yağın hidrolizi sonucu oluşan

serbest yağ asitleri nedeniyle olabilir. Ayrıca, peptonun parçalanması sonucu serbest kalan amino asitler de pH'ın düşmesine neden olabilir (Alonso vd., 2005).

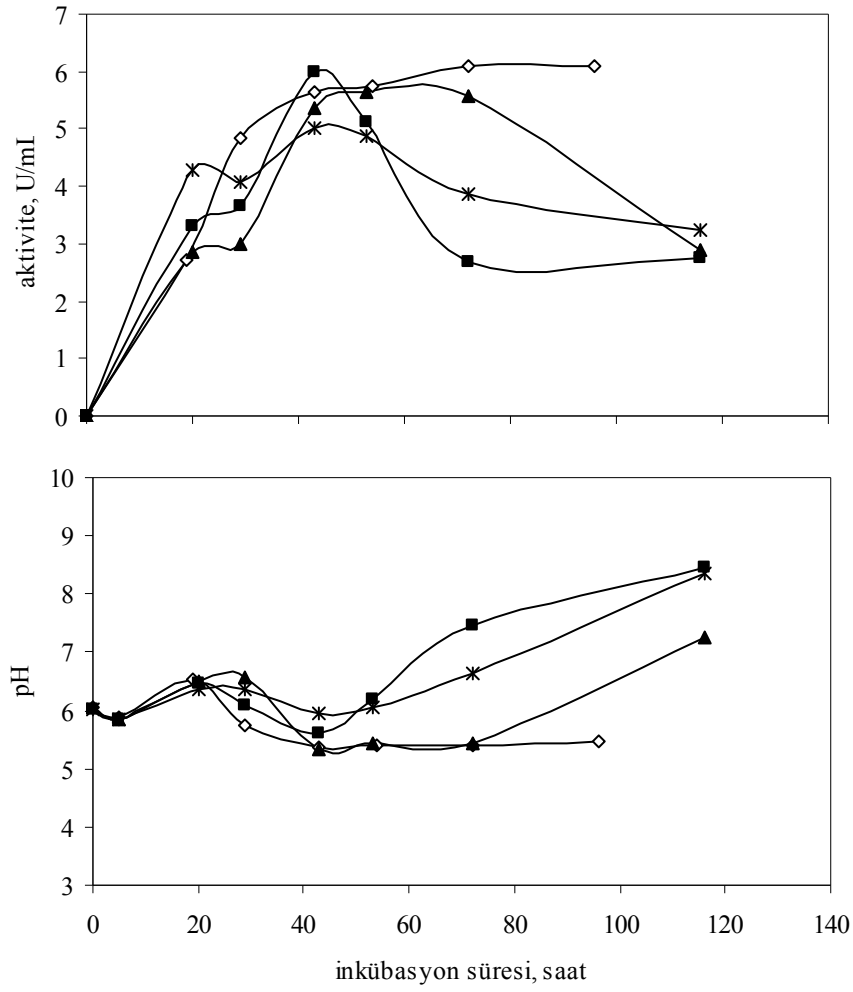
Katı substrat fermantasyonlarında ortamın nem içeriği büyük ölçüde prosesin başarısını belirleyen kritik bir faktördür. Nem seviyesinin azaltılması veya artırılması enzim biyosentezini önemli derecede etkiler. Optimum nem içeriği mikroorganizmaya ve substrata bağlıdır. Yüksek nem seviyesi; substrat porozitesini azaltır, substratın partiküler yapısını değiştirir, yapışkanlık gelişimini ilerletir, gaz hacmini azaltır ve oksijen transferini ve difüzyonu zayıflatırken, düşük nem seviyeleri; yüksek su gerilmesi ve substratın şişmesi sonucunda katı substratın içerdiği nütrientlerin çözünürlüğünü azaltmaktadır (Shu ve Yan, 2008).

5.7.5. Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi

Farklı fosfat konsantrasyonlarının (% 0.025, 0.1, 0.2 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4) enzim üretimi üzerine etkisi Şekil 5.67' de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek aktivite, % 0.025 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 içeren enzim üretim ortamında, 5.975 U/mL olarak bulunmuştur. Diğer fosfat konsantrasyonlarında ise maksimum aktiviteler, %0.1 için 5.625 ve % 0.2 için 4.875 U/mL olarak elde edilmiştir. Belirlenen maksimum aktivite, $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ içermeyen ortamda elde edilen en yüksek aktivite değerine (6.100 U/mL) yakın olmakla beraber, 0.125 U/mL düşük olmuştur.

Daldırmalı fermantasyonda yapılan deneylerde maksimum enzim üretimi, % 0.1 KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 içeren ortamda elde edilmişti. Katı substrat ortamında fosfat ilavesinin aktiviteyi fazla etkilememesi, ayçekirdeği küspesinin mikroorganizmanın enzim üretimi ve gelişmesi için ihtiyaç duyduğu fosforu sağlaması sebebiyle olduğu tahmin edilmektedir. Yüksek fosfat konsantrasyonlarında aktivitenin azalması, fosforun ortamda fazla bulunması nedeniyle, mikroorganizmanın gelişmesi ve enzim üretimine inhibitör etki yapmasına bağlanmıştır.

Ortamda aşırı bulunan iyonlar aminoasit, protein vb. maddelerle veya oluşan ürünlerle kompleksleşerek biyodönüşüm işlemini olumsuz olarak etkileyebilmektedir (Pekin 1980).

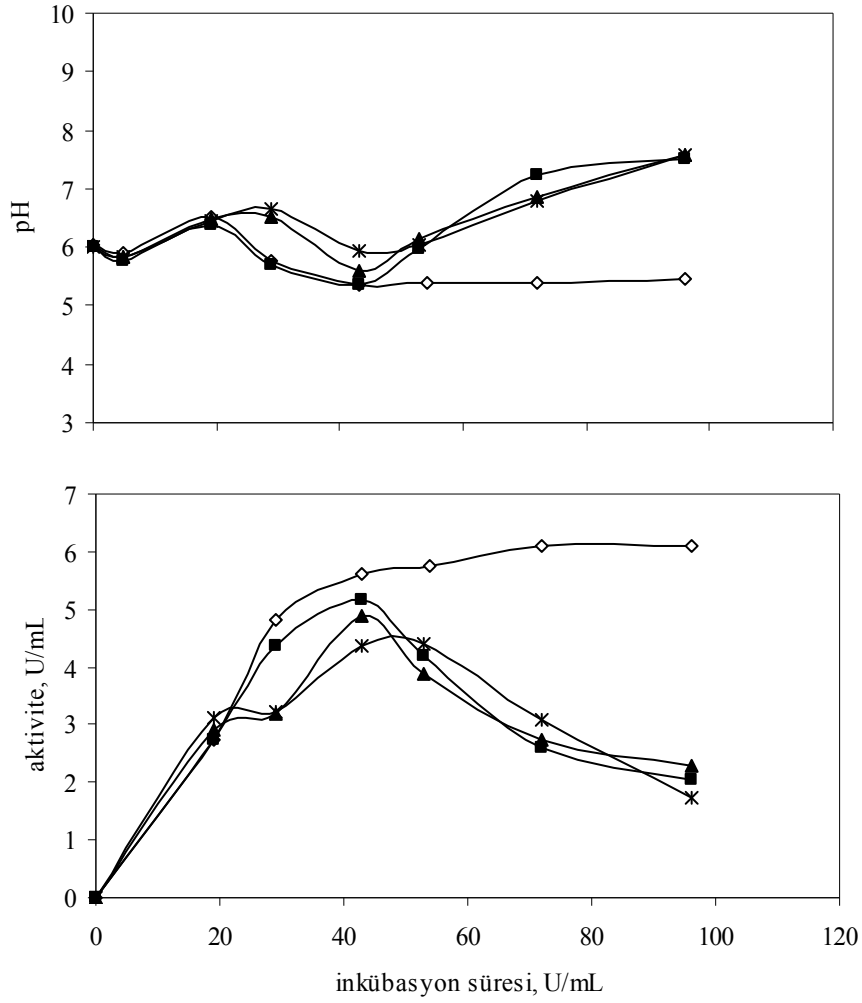


Şekil 5.67. Farklı fosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'ının zamanla değişimi (◇: % 0, ■: % 0.025, ▲: % 0.1 * : % 0.2 KH₂PO₄ ve K₂HPO₄, % 10 ayçekirdeği küspesi, partikül boyutu: 20-100 mesh arası, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

5.7.6. Ca⁺⁺ İlavesinin Etkisi

Daldırmalı kültürde enzim üretimini arttıran Ca⁺⁺ ilavesinin, katı substrat içeren fermentasyon ortamında etkisini incelemek için; CaCl₂.2H₂O % 0.01, 0.02 ve 0.03 konsantrasyonlarında fermentasyon ortamına eklenmiştir. Şekil 5.68'den görüldüğü gibi Ca⁺⁺ ilave edilmeyen ortamda elde edilen maksimum enzim aktivitesi daha yüksek olmakla beraber (6.100 U/mL), artan Ca⁺⁺ konsantrasyonu ile birlikte enzim aktiviteleri de (%0.01, 0.02 ve 0.03 için sırasıyla, 5.175, 4.875 ve 4.400 U/mL) düşmektedir. İlave edilen CaCl₂.2H₂O'nun enzim üretimini azaltması, kullanılan ayçekirdeği küspesi ve musluk suyunun Ca⁺⁺ ihtiva etmesi ve ihtiva ettiği Ca⁺⁺ miktarının enzim üretimi için yeterli

olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca daha önceden ifade edildiği gibi ortamda aşırı bulunan iyonlar aminoasit, protein vb. maddelerle veya oluşan ürünlerle kompleksleşerek biyodönüşüm işlemini olumsuz olarak etkileyebilmektedir.



Şekil 5.68. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin ve ortam pH'nın zamanla değişimi (◇: % 0, ■: % 0.01, ▲: % 0.02, *: % 0.03 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, % 10 ayçekirdeği küspesi, partikül boyutu: 20-100 mesh arası, pH: 6, T: 30 °C, KH: 150 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

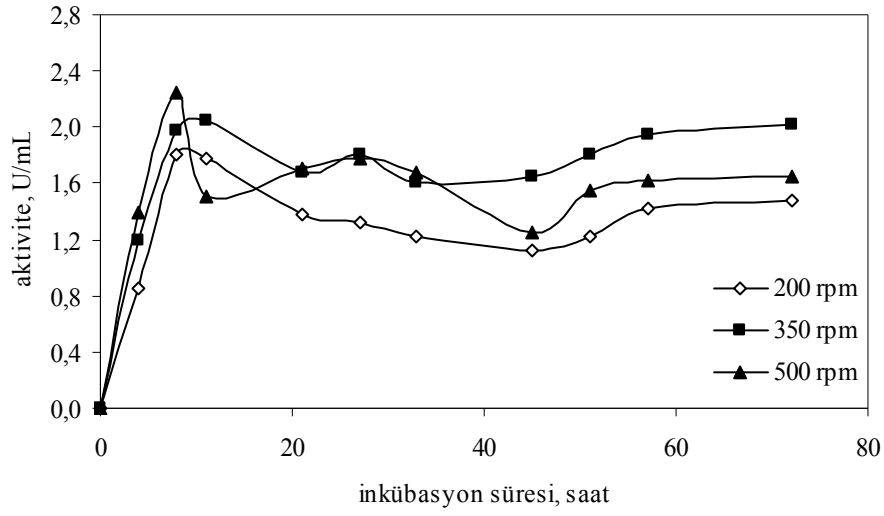
5.8. Biyoreaktörde Lipaz Üretimi ve Oksijen Tüketim Hızı ve Sıvı Faz Hacimsel Kütle Transfer Katsayısının Belirlenmesi

Optimize edilen daldırmalı fermentasyon ortamında enzim üretimi üzerine karıştırma hızı ve hava akış hızının etkisini belirlemek için 5 L çalışma hacminde 6 L'lik laboratuvar ölçekli biyoreaktör kullanılmıştır. Kesikli sistem uygulanarak gerçekleştirilen fermentasyon sırasında oksijen tüketim hızları ve sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayılarının değişimi incelenmiştir.

5.8.1. Karıştırma Hızının Enzim Üretimine Etkisi

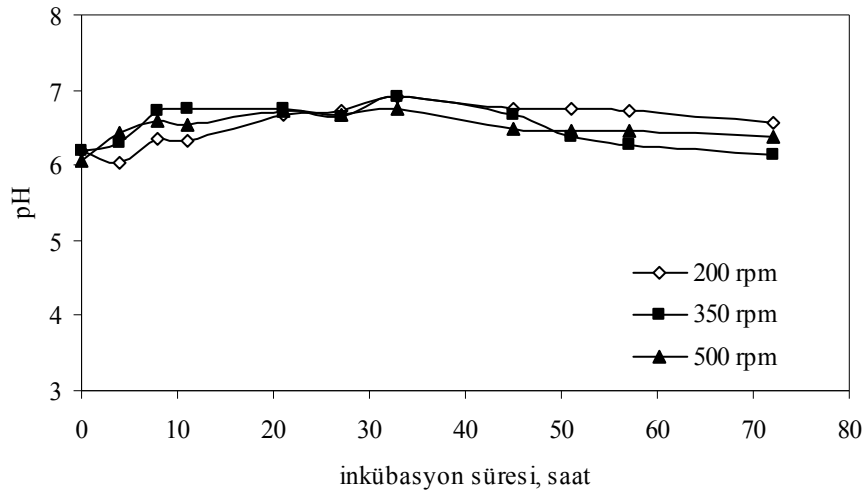
Optimize edilen fermentasyon ortamı kullanılarak (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, % 0.1 KH_2PO_4 , % 0.1 K_2HPO_4 , % 0.0005 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.2 vvm hava akış hızında, farklı karıştırma (200, 350, 500 rpm) hızlarının lipaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen lipaz aktivite sonuçları Şekil 5.69.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, karıştırma hızı arttıkça elde edilen maksimum aktivite değerleri de artmaktadır. 200, 350 ve 500 rpm için en yüksek aktivite değerleri sırasıyla 1.800, 2.050, 2.250 U/mL olarak bulunmuştur. Aynı fermentasyon ortamı kullanılarak erlenlerde yapılan deneylerde olduğu gibi iki pik halinde en yüksek aktiviteler elde edilmiştir. Erlenlerde yapılan deneylerde maksimum aktivite ikinci pikte 51. saatte 2.975 U/mL olarak elde edilmişti. İlk pikte ise en yüksek aktivite 12. saatte 2.925 U/mL olarak bulunmuştu. Biyoreaktörde elde edilen en yüksek aktivite değerleri ise ilk pikte 8-11. saatler arasında elde edilmiştir. İkinci pikte ise en yüksek aktivite değerlerine 51-72. saat arasında ulaşılmıştır. Bu duruma değişen ortam şartları (karıştırma hızı, havalandırma, çalışma hacmi gibi) neden olabilir.

Yüksek karıştırma hızında maksimum enzim aktivitesi elde edildikten sonra diğer karıştırma hızlarına göre aktivite hızlı bir şekilde düşmüştür. Bu durum kayma gerilimi etkilerinden dolayıdır (Elibol vd., 2008).



Şekil 5.69. Farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, hava akış hızı: 0.2 vvm, aşı oranı: % 10 v/v)

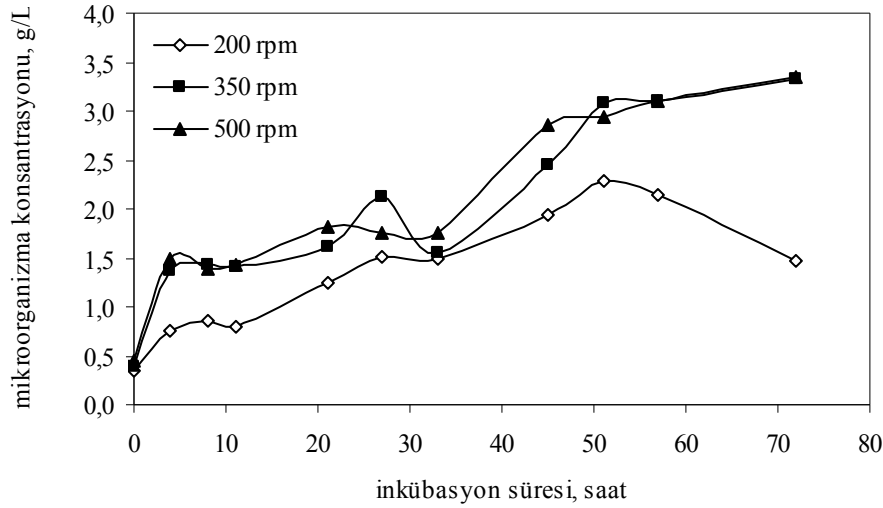
Şekil 5.70’de ortam pH’larının zamanla değişimi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi tüm karıştırma hızlarında ortam pH’larının değişimi birbirine benzemektedir.



Şekil 5.70. Farklı karıştırma hızlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, hava akış hızı: 0.2 vvm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.71’de farklı karıştırma hızlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi gösterilmiştir. 200 rpm karıştırma hızında daha düşük mikroorganizma konsantrasyonu elde edilirken, 350 ve 500 rpm karıştırma hızlarında mikroorganizma konsantrasyonları birbirine yakın olmuştur. 200, 350 ve 500 rpm için elde edilen en yüksek

mikroorganizma konsantrasyonları sırasıyla; 2.276, 3.321 ve 3.342 g/L'dir. Optimize edilen ortamda erlenlerde yapılan deneylerde en yüksek mikroorganizma konsantrasyonu, 3.511 g/L olarak elde edilmişti. Biyoreaktörde özellikle 200 rpm karıştırma hızında mikroorganizma konsantrasyonunda düşme olmuştur. Bu durum karıştırma hızının düşük olması nedeniyle oksijen transferinin düşük olmasına bağlanabilir.



Şekil 5.71. Farklı karıştırma hızlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, hava akış hızı: 0.2 vvm, aşı oranı: % 10 v/v)

5.8.1.1. Oksijen Transfer Parametreleri

Oksijen tüketim hızı, r_o ve hacimsel kütle transfer katsayısı, k_La , Bölüm 3.9.'da anlatılan Dinamik Metot kullanılarak belirlenmiştir.

Oksijen, metabolik yolu ve metabolik akışları etkileyerek aerobik fermantasyon prosesinde ürün oluşumu üzerinde farklı etkiler göstermektedir. Aerobik mikroorganizmanın solunum hızının, belli bir kritik çözünmüş oksijen seviyenin üstünde, çözünmüş oksijenden bağımsız olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, bu seviyenin altında, çözünmüş oksijende küçük bir değişiklik hücre metabolizmasında önemli fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Büyüyen hücre popülasyonuna oksijen sağlanması, birçok aerobik fermantasyon prosesinde, oksijen transfer hızı, kültür ortamında oksijenin zayıf çözünürlüğüne bağlı olarak, hız sınırlayıcı adımdır ve aerobik fermantasyon proseslerinin ölçeklendirilmesinde en önemli parametre olan hacimsel oksijen transfer katsayısı (k_La) ile

yönetilmektedir. Hacimsel kütle transfer katsayısı, k_{La} , reaktörlerin ve havalandırma sistemlerinin tasarımında kritik bir parametredir. Volumetrik kütle transfer katsayısı, k_{La} , biyoreaktörün geometrik özellikleri, karıştırma hızı, sıcaklık, fermantasyon ortamının akışkanlık özellikleri, mikroorganizma mevcudiyeti ve kütle transfer alanındaki ince partiküllerin varlığı gibi işletme şartlarına bağlı olan, fiziksel bir parametredir. Hücre konsantrasyonlarındaki artış, kütle transferine direnci arttırmaktadır. Diğer taraftan yüksek hücre konsantrasyonları, volumetrik kütle transfer katsayısını pozitif olarak etkileyen daha yüksek oksijen tüketim hızlarına sebep olmaktadır. Bu iki parametrenin karşılıklı etkisi fermantasyon prosesi boyunca k_{La} özelliklerinin eğilimini belirlemektedir (Korkmaz, 2007).

Karıştırma hızının; oksijen tüketim hızı, r_o ve hacimsel kütle transfer katsayısı, k_{La} , üzerine etkisini incelemek için 200, 300 ve 500 rpm karıştırma hızları kullanılmıştır. 300 ve 500 rpm karıştırma hızları için hesaplanan en yüksek k_{La} değerleri sırasıyla 0.0168, ve 0.0591 s^{-1} olarak bulunmuştur. Karıştırma hızının artmasıyla k_{La} değerleri de artmıştır (Tablo 5.17).

200 rpm karıştırma hızında ortamdaki oksijen konsantrasyonu düşük olduğundan bu saatler arasında k_{La} ve r_o değerleri hesaplanamamıştır. Karıştırma hızının düşük olması sonucu oksijen çözünürlüğünü azaltması ve mikroorganizmanın logaritmik büyüme fazlarında oksijeni hızlı tüketmesi ortamda çözünmüş oksijen miktarının az olmasına neden olmuştur.

k_{La} 'da gözlenen artışlar, fermantasyon süresince sabit olan sıcaklık ve karıştırma hızı kadar metabolitlerin salgılanması nedeniyle kültürasyon ortamındaki vizkozitenin azalması sonucu olabilir. Benzer şekilde k_{La} değerindeki azalmalar, metabolitlerin kullanımına bağlı olarak kültürasyon ortamının vizkozitesinin artması nedeniyle olabilir.

Oksijen tüketim hızı, r_o , mikroorganizmanın büyüme fazlarına bağlıdır. Logaritmik büyüme fazlarında oksijenin daha hızlı tüketimine bağlı olarak değeri daha yüksek olmaktadır. 350 ve 500 rpm için en yüksek oksijen tüketim hızı değerleri sırasıyla; 0.0207 ve 0.0148 mg/L/s olarak elde edilmiştir (Tablo 5.17). 350 rpm karıştırma hızında 4. saatte elde edilen 0.0207 oksijen tüketim hızı değeri, 500 rpm'de elde edilen maksimum değerden daha yüksek olmuştur. Buna ortamın çözünmüş oksijen konsantrasyonlarındaki farklılıklar neden olabilir. 350 rpm karıştırma hızında 4. saatte ölçülen çözünmüş oksijen konsantrasyonu % 57.4 iken, aynı saatte 500 rpm için % 84.4 olarak ölçülmüştür. Bu nedenle oksijen tüketiminin fazla olduğu logaritmik fazın başında, 350 rpm karıştırma

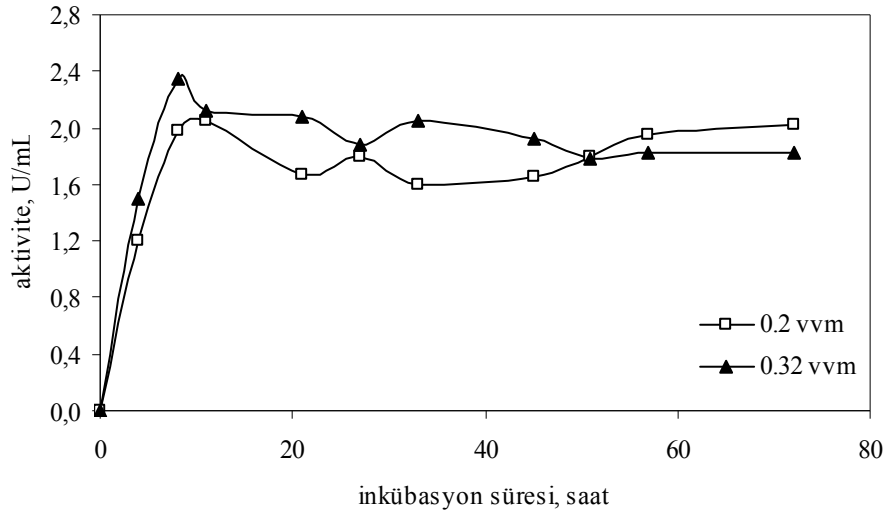
hızında, oksijen konsantrasyonunun daha kısa sürede azalması nedeniyle oksijen tüketim hızı daha yüksek elde edilmiştir.

Tablo 5.17. Farklı karıştırma hızlarında k_{La} ve r_o değerlerinin değişimi

Karıştırma hızı, rpm	Zaman, st	k_{La} , s ⁻¹	r_o , mg/L/s
350	4	0.0150	0.0207
	8	0.0120	0.0055
	11	0.0121	0.0044
	21	0.0136	0.0029
	27	0.0137	0.0026
	33	0.0130	0.0028
	45	0.0165	0.0130
	51	0.0131	0.0149
	57	0.0153	0.0160
	74	0.0124	0.0160
500	4	0.0223	0.0094
	8	0.0222	0.0044
	21	0.0295	0.0042
	27	0.0304	0.0037
	33	0.0327	0.0035
	45	0.0331	0.0037
	51	0.0443	0.0148
	57	0.0591	0.0135
	72	0.0285	0.0102

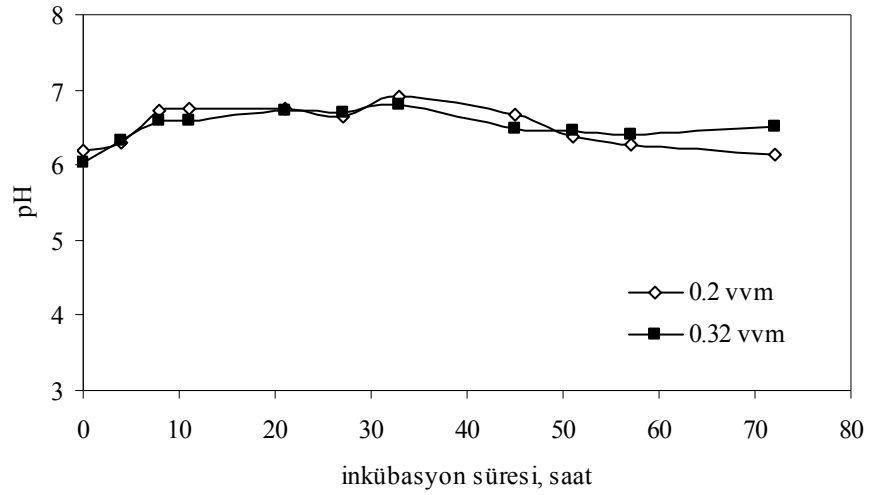
5.8.2. Hava Akış Hızının Enzim Üretimine Etkisi

Hava akış hızının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, 0.2 ve 0.32 vvm hava akış hızlarında çalışılmıştır. Karıştırma hızı olarak, 350 ve 500 rpm’de enzim aktivitesi ve mikroorganizma konsantrasyonları birbirine yakın olduğu için 350 rpm seçilmiştir. Farklı havalandırma hızlarında elde edilen lipaz aktivite sonuçları Şekil 5.72.’de verilmiştir. Şekilden’de görüldüğü gibi, hava akış hızının arttırılması elde edilen maksimum aktiviteyi de arttırmaktadır. 0.2 ve 0.32 vvm hava akış hızları için en yüksek aktivite değerleri sırasıyla 2.050, 2.350 U/mL olarak bulunmuştur.



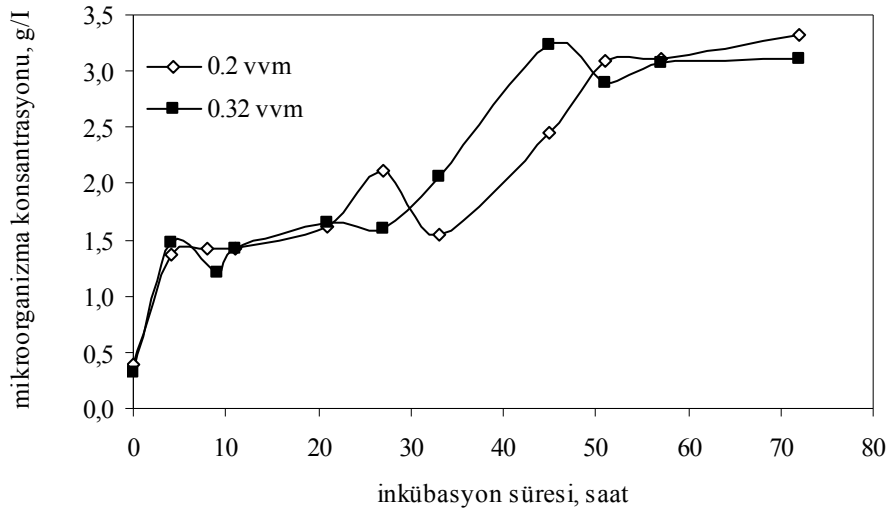
Şekil 5.72. Farklı hava akış hızlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 350 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.73.'de ortam pH'larının zamanla değişimi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi her iki hava akış hızında ortam pH'larının değişimi birbirine benzemektedir.



Şekil 5.73. Farklı hava akış hızlarında ortam pH'ının zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 350 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

Şekil 5.74.'de farklı karıştırma hızlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi gösterilmiştir. Elde edilen mikroorganizma konsantrasyonları birbirine yakın olmakla beraber, 0.32 vvm hava akış hızında 33-45. saatlerde mikroorganizma konsantrasyonları daha yüksek olmuştur. 0.2 ve 0.32 vvm hava akış hızları için elde edilen en yüksek mikroorganizma konsantrasyonları sırasıyla; 3.321 ve 3.232 g/L'dir.



Şekil 5.74. Farklı hava akış hızlarında mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, pH: 6, T: 30 °C, KH: 350 rpm, aşı oranı: % 10 v/v)

5.8.2.1. Oksijen Transfer Parametreleri

Biyoreaktöre hava giriş hızının, oksijen tüketim hızı, r_o ve hacimsel kütle transfer katsayısı, k_La , üzerine etkisini incelemek için, 0.2 ve 0.32 vvm hava giriş hızları kullanılmıştır. 0.2 ve 0.32 vvm hava giriş hızları için hesaplanan en yüksek k_La değerleri sırasıyla, 0.0167, ve 0.0423 s^{-1} olarak bulunmuştur. Hava akış hızının artmasıyla k_La değeri de artmıştır.

0.2 ve 0.32 vvm hava giriş hızları için, oksijen tüketim hızı, r_o , değerleri ise en yüksek 4. saatte elde edilmiş olup, sırasıyla; 0.0207, ve 0.0273 mg/L/s'dir (Tablo 5.18). Hava akış hızının artmasıyla, r_o , değeri de yükselmiştir.

Tablo 5.18. Farklı hava akış hızlarında $k_L a$ ve r_o değerlerinin değişimi

Hava Akış hızı, vvm	Zaman, st	$k_L a$, s ⁻¹	r_o , mg/L/s
0.2	4	0.0150	0.0207
	8	0.0120	0.0055
	11	0.0121	0.0044
	21	0.0136	0.0029
	27	0.0137	0.0026
	33	0.0130	0.0028
	45	0.0165	0.0130
	51	0.0131	0.0149
	57	0.0153	0.0160
	74	0.0124	0.0160
0.32	4	0.0393	0.0273
	9	0.0367	0.0061
	11	0.0286	0.0017
	21	0.0314	0.0041
	27	0.0423	0.0047
	33	0.0401	0.0129
	49	0.0263	0.0124
	51	0.0207	0.0061
	57	0.0229	0.0184
	69	0.0228	0.0140

5.9. Lipaz Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Sıvı kültürde maksimum enzim aktivitesinin elde edildiği ortamdan (% 1 mısır yağı, % 0.4 pepton, % 0.1 KH_2PO_4 % 0.1 K_2HPO_4 , % 0.0005 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ % 0.03 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 9.saatte alınan numune santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı ham lipaz kaynağı olarak kullanılarak standart ölçüm şartları altında enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık belirlenmiştir.

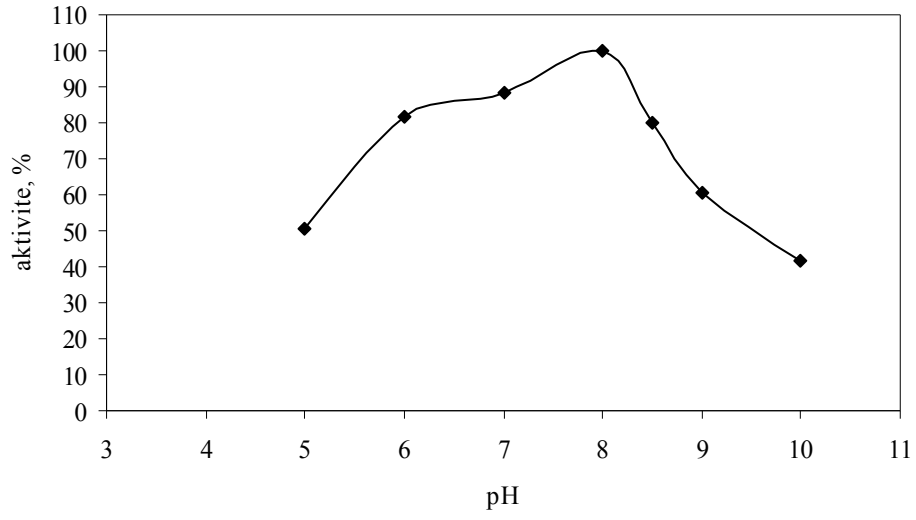
Enzim aktivitesinin optimum olduğu pH'ı belirlemek için, pH 5.0-10.0 aralığında değiştirilmiştir. Bunun için 0.1 M olan farklı tampon çözeltiler hazırlanmıştır. pH 5.0'de sitrat, 6.0 ve 7.0 'de fosfat, 8.0, 8.5 ve 9.0 'da Tris-HCl, 10.0'da glisin-NaOH tamponları kullanılmıştır.

Lipaz aktivitesi için optimum pH, Tris-HCl tamponunda pH 8.0'de, 3.425 U/mL olarak bulunmuştur. Değişik pH'larda kalan aktiviteler 37 °C'de pH 8.0'deki aktivite % 100 alınarak hesaplanmıştır (Şekil 5.75).

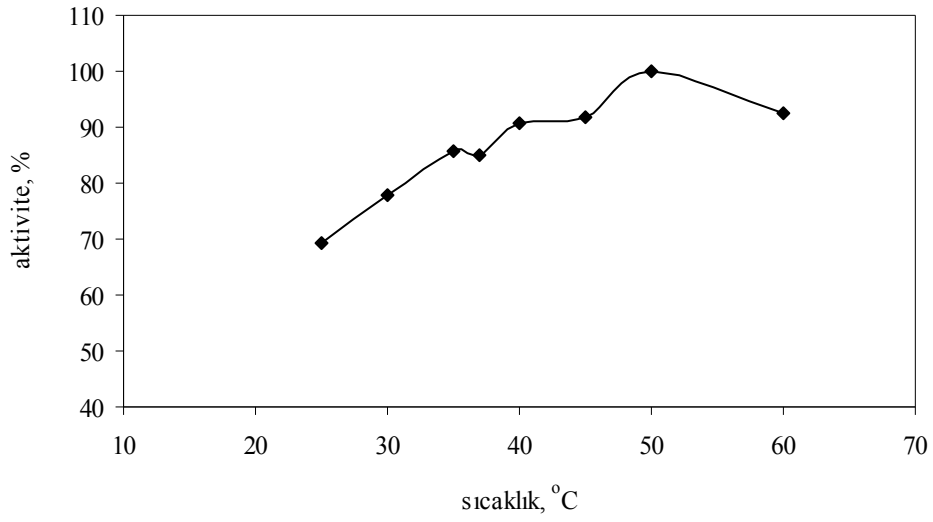
Bu alkali optimum pH değeri, lipazın yağ/su arafazına adsorpsiyonu için uygun olduğunu gösterir ve hidrolizin aktivasyon enerjisini düşürmek için lipazın aktif alanları kapatan engelleri aşmasına yardım eder (Sharma, 2009).

Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için değişik sıcaklıklarda (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 60) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Lipaz aktivitesi için optimum sıcaklık 50 °C'de (4.025 U/mL) bulunmuştur. Değişik sıcaklıklarda kalan aktiviteler 50 °C'de pH 8.0'deki aktivite % 100 alınarak hesaplanmıştır (Şekil 5.76).

P.fluorescens kullanılarak elde edilen ham lipazın, nispeten yüksek sıcaklıkta aktivitesinin yüksek olması, bu lipazın ısıya dayanıklı olduğunu gösterir.



Şekil 5.75. Enzim aktivitesi üzerine pH'nin etkisi



Şekil 5.76. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, bir gram (-) bakteri olan *P.fluorescens* kullanılarak lipaz üretimi gerçekleştirilmiş ve şu genel sonuçlar elde edilmiştir.

Kesikli daldırmalı fermantasyon ortamına eklenen farklı karbon kaynakları içerisinde en yüksek aktivite, % 1 mısır yağı konsantrasyonunda elde edilmiştir. Diğer karbon kaynaklarına göre, glukoz içeren ortamda en düşük aktivite belirlenmiştir. Bu nedenle glukozun enzim üretimi üzerine baskılayıcı bir etki yaptığı söylenebilir.

Azot kaynağı değiştirildiği zaman, mikroorganizma organik azot kaynaklarında hem daha iyi büyüme hem de daha yüksek aktivite göstermiştir. Denenen azot kaynakları içerisinde en yüksek aktivite % 0.4 pepton içeren fermantasyon ortamında elde edilmiştir.

Fermantasyon ortamında bulunan fosfat miktarı değiştirilmiş ve artan fosfat konsantrasyonunun (% 0.1 KH_2PO_4 + % 0.1 K_2HPO_4) enzim üretimini artırdığı bulunmuştur.

Ortam bileşenlerinin değiştirilmesi sonucu glukoz içeren ortamda başlangıçta 0.800 U/mL olan lipaz aktivitesi, 2.975 U/mL'ye ulaşmıştır.

Metal iyonlarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için Ca^{++} ve Na^+ iyonları optimum enzim üretim ortamına eklenmiş ve Ca^{++} 'un enzim üretimini artırdığı ve % 0.03 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda 3.425 U/mL'ye yükselttiği tespit edilmiştir. NaCl eklendiğinde en yüksek enzim aktivitesi % 0.01 NaCl içeren fermantasyon ortamında 3.075 U/mL olarak elde edilmiştir. Na^+ , optimize edilen ortama göre (2.975 U/mL) enzim aktivitesini fazla etkilememekle beraber, 0.100 U/mL artırmıştır.

Optimize edilen fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak atık kızartma yağları kullanıldığı zaman, en yüksek enzim aktiviteleri patates ve tatlı kızartılmış atık yağlar için sırasıyla, 3.850 ve 3.975 U/mL olarak elde edilmiştir. Bu da atık kızartma yağlarının enzim üretimi için daha etkin bir substrat olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca fermantasyon ortamında bulunan yağ asitlerinin analizi sonucu 96 saatlik fermantasyon sonunda *P. fluorescens* 'in yağ asitlerinin tamamına yakınının tükettiği belirlenmiştir.

Daha sonra karbon kaynağı olarak, bir katı substrat olan ayçekirdeği küspesi kullanılmış ve *P.fluorescens*'in lipaz enzimi üretilebilirliği araştırılmıştır. Mikroorganizmanın fermantasyon ortamı; musluk suyu, % 10 ayçekirdeği küspesi ve % 1 pepton içerdiği zaman maksimum 6.100 U/mL lipaz enzimi ürettiği belirlenmiştir. Doğal bir substrat olan

ayçekirdeği küspesi kullanıldığında enzim aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Daldırmalı fermentasyonda yapılan deneylerde maksimum enzim üretimi % 0.1 KH_2PO_4 , % 0.1 K_2HPO_4 ve % 0.03 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ içeren ortamda elde edilmişti. Katı substrat ortamında fosfat ve kalsiyum ilavesinin aktiviteyi fazla etkilememesi, ayçekirdeği küspesi ve musluk suyunun mikroorganizmanın enzim üretimi ve gelişmesi için ihtiyaç duyduğu fosforu ve kalsiyumu sağlaması sebebiyle olabilir. Ortamda aşırı bulunan iyonlar; aminoasit, protein vb. maddelerle veya oluşan ürünlerle kompleksleşerek biyodönüşüm işlemini olumsuz olarak etkileyebilmektedir.

Biyoreaktörde yapılan deneylerde en yüksek enzim aktivitesi 350 rpm karıştırma hızı ve 0.32 vvm hava akış hızında 2.350 U/mL olarak elde edilmiştir. Bu değer, aynı fermentasyon ortamı kullanılarak erlenlerde elde edilen en yüksek aktivite değeri olan, 2.975 U/mL enzim aktivitesine göre düşüktür. Bu durum, değişen ortam şartlarından (karıştırma hızı, havalandırma, çalışma hacmi gibi) kaynaklanabilir.

Biyoreaktörde yapılan deneylerde, ayrıca, oksijen tüketim hızı, r_o , ve hacimsel kütle transfer katsayısı, k_{La} , değerleri hesaplanmıştır. Karıştırma ve havalandırma hızlarının k_{La} değerini değiştirdiği görülmüştür. k_{La} değeri, karıştırma ve hava giriş hızının artmasıyla yükselmiştir. En yüksek k_{La} değeri 0.2 vvm hava akış hızı ve 500 rpm karıştırma hızında 0.0591 s^{-1} olarak hesaplanmıştır. Hücre büyümesine bağlı olan r_o değeri, en yüksek 0.32 vvm hava akış hızı ve 350 rpm karıştırma hızında 0.0273 mg/L/s olarak bulunmuştur.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerde hava ve karıştırma hızları ile enzim miktarının arttığı, dolayısıyla da lipaz üretim prosesinde oksijen transferlerinin önemli olduğu görülmüştür.

Daha sonra yapılacak çalışmalarda ise enzim saflaştırılabilir. Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapılabilir. Saflaştırılan enzim farklı amaçlarla kullanılabilir (biyodizel üretimi gibi). Mikroorganizma tutuklanarak enzim üretimi araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Atasağungil, M.**, 1965, Enzimler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 8, 140 s. Ankara.
- Adams, D.M., Barach, J.T., Spech, M.L.**, 1975. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin, *Journal Dairy Science*, 58, 828-834.
- Alonso, F.O.M., Oliveira, E.B.L., Dellamora-Ortiz, G.M., and Pereira-Meirelles, F.V.**, 2005. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels, 22, (1), 9-18.
- Amara A.A., and Salem S.R.**, 2009. Degradation of castor oil and lipase production by *Pseudomonas aeruginosa*, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5, 4, 556-563.
- Babu, I.S., Rao, G.H.**, 2007. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate, *Res. J. Microbiol.*, 2, 469–474.
- Balaji, V., Ebenezer, P.**, 2008. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation, *Indian Journal of Science and Technology*, 1, 7, 1-8.
- Bandyopadhyay, B., Humphrey, A.E.**, 1967. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems, *Biotechnology and Bioengineering*, IX, 533-544.
- Barbaro, S.E., Trevors, J.T., Inniss, W.E.**, 2001. Effects of low temperature, cold shock, and various carbon sources on esterase and lipase activities and exopolysaccharide production by a psychrotrophic *Acinetobacter* sp., *Can J Microbiol*, 47:194–205.
- Bowers, D.**, 2008. Medical statistics from scratch, an introduction for health professionals, 2nd Edition, Jon Wiley&Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, England.
- Brozzoli, V., Crognale, S., Sampedro, I., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli, M.**, 2009. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor, *Bioresource Technology*, 100, 13, 3395-3402.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E.**, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eight edition, 1268 p., U.S.A.
- Chander, H., Ranganathan, B., Singh, J.**, 1979, Role of some fatty acids on the growth and lipase production by *Streptococcus faecalis*, *J. Food Sci.*, 44:1566-7.

- Christie, W.W.**, 1990, Gas Chromatography and Lipids. pp. 302, The Oil Press, Glaskow.
- Cordova, J., Nemmaoui, M., Ismaili-Alaoui M., Morin, A., Roussos, S., Raimbault, M., Benjlali, B.**, 1998, Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse, J. Mol Catal., B: Enzym, 5, 75-78.
- Couto, S.R., Sanroman, M.A.**, 2005, Aaplication of solid state fermentation to ligninolytic enzym production, Biochemical Engineering Journal, 22, 211-219.
- Çoşkun, B., Şeker, E., İnal, F.**, 2003, Yemler ve Teknolojisi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Çadircı, B.H., Yaşa, İ.**, 2010. An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 64, 155-161.
- Dharmsthiti, S., Luchai, S.**, 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027, FEMS Microbiology Letters, 179, 241-246.
- Dong, H., Gao, S., Han, S., and Cao, S.**, 1999. Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. Lipase and its properties in non-aqueous media, Biotechnol. Appl. Biochem., 30, 251–256.
- Edwinoliver, N.G., Thirunavukarasu, K., Naidu, R.B., Gowthaman, M.K., vd.**, 2010. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis, 10, 6791-6796.
- Eisenberg, J.D.**, 2002. Producing Scalable Vector Graphics with XML, First Edition, U.S.A.
- El-Gammal, S.M., Rizk, M.I.**, 1989, Effect of cations, sodium chloride and sodium deoxycholate on lipase production by some yeasts. Egypt J. Bot., 29-30:1-9.
- Elibol M., Ekiz, H.İ., Çağlar,A.**, 1997. The solvents effects of ethly acetate on the hydroysis of triacetin and tributyin by a Candidal lipase, Chimica Acta Turcica, 25, 177-180.
- Elibol, M., Özer D.**, 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*, Process Biochemistry, 36, 4, 325-329.
- Elibol, M., Yaşa, İ., Karaçancı, Ş., Çoban, I., Özsoy, G.**, 2008. Zeytinyağı işletmeleri katı (pirina) ve sıvı (karasu) atıklarından mikrobiyal lipaz üretimi, TÜBİTAK Proje No: 106M464, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Ellaiah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B., Thaer, A.T., Adinarayana, K.**, 2004. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*, Process Biochemistry, 39, 5, 525-528.

- Ergün, A., Çolban, İ., Yıldız, G., Küçükeraslan, S., Tuncer, Ş.D., Yalçın, S., Küçükeraslan, M.K., Şehu, A., 2004,** Yemler, Yem Hijyeni ve Teknolojisi, Ankara.
- Esakkiraj, P., Rajkumarbharathi, M., Palavesam, A., Immanuel, G., 2010.** Lipase production by *Staphylococcus epidermidis* CMST-Pi 1 isolated from the gut of shrimp *Penaeus indicu*, Ann Microbiol, 60, 37-42.
- Espinosa, E., Sanchez, S. and Farres, A., 1990.** Nutritional factor affecting lipase production, Biotech. Letter, 12, 209-214.
- Fang, Y., Lu Y., Lv, F., Bie, X., Zhao, H., Wang, Y., and Lu, Z., 2009.** Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 by directed evolution, Enzyme and Microbial Technology, 44, 2, 84-88.
- Flickinger, M.C., Drew, S.W., 1999.** Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation, John Wiley & Sons. Inc., Volumes 1-5, Canada.
- Gaur, R., Gupta, A., Khare, SK., 2008.** Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. Process Biochemistry, 43,1040-1046
- Gebre, E.A., Humbert, E.S., Blankenagel, G., 1980.** Heat stable psychrotrophs in milk, J.food.Prot., 43, 709-712.
- Ghanem, E. H., Al-Sayed H. A. and Saleh K. M., 2000.** An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16, 459-464.
- Gilbert, E.J., Drozd, J.W., Jones, C.W., 1991,** Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2., J.Gen Microbiol. 137, 215-221.
- Gordillo, M.A., Obradors, N., Montesinos, J.L., Valero, F., Lafuente J.C., 1995** Stability studies and effect of the initial oelic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 38-41
- Gözükara, M.E., 2001.** Biyokimya, 4. Baskı, Cilt 2, Nobel Tıp Kitapevleri, Malatya.
- Gupta, R., Gupta N., and Rathi, P., 2004.** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 6, 763-781.
- Han, J., 2003.** Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Hericium erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value, International Journal of Food Microbiology, 80, 61–66.
- Hernandez-Rodriguez, B., Cordova, J., Barzana, E., Favela-Torres, E., 2009.**Effect of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant

- fungi in solid-state fermentation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61, 136-142.
- Hara, A., Radin, NS.**, 1978, Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent *Analitical Biochemistry* (90) 1: 420-426.
- Hasan F., Shah, A.A., Hameed, A.**, 2006. Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235–251.
- Hasan F., Shah, A.A., Hameed, A.**, 2009. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review, *Biotechnology Advances*, 27, 6, 782-798.
- Hong-wei, Y., Jun, H., ning, L., Xiao-sha Q.**, 2009. Ying-min J., Fermentatation performance and characterization of cold-adapted lipase produced with *Pseudomonas* Lip35, *Agricultural Sciences in China*, 8(8), 956-962.
- Iftikhar, T., Niaz, M., Afzal, M., Haq, I., and Rajoka, M.I.**, 2008. Maximization of Intracellular Lipase Production in a. Lipase-Overproducing Mutant Derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: A Kinetic Study, *Food Technol. Biotechnol.*, 46, (4), 402–412.
- Izumu, T., Nakamura K., and Fukase, T.**, 1990. Purification and Characterisation of a Thermostable Lipase from Newly Isolated *Pseudomonas* sp. KW1-56, *Agricultural Biology Chemistry*, 54 (5), 1253-1258.
- Janssen, P.H., Monk, C.R., Morgan, H.W.**, 1994. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity, *FEMS Microbiology Letter*, 120:195-200.
- Juffs, H.S., Hayward, A.C., Doelle, H.W.**, 1968, Growth and proteinase production in *Pseudomonas* spp. cultivated under various conditions of temperature and nutrition, *Journal of Dairy Research*, 35, 385-393.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, P., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A. M.**, 2000. *Biyokimya*, 2.Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, 654 s., Ankara.
- Kambiranda, D.M., Asraful-Islam, S.Md., Cho, K.M., Renukaradhya, K. M., Lee Y. H., Kim H., Yun H.D.**, 2009. Pesticide Biochemistry and Physiology, Expression of esterase gene in yeast for organophosphates biodegradation, 94, 1, 15-20.
- Kamimura E., S., Mediate; O., Rodriguest M.I., Francisco M.**, 2001. Studies on lipase-affinity adsorption using response-surface analysis, *Biotechnology and Appliedm Biochemistry*, 33, 3, 153-159.
- Kargı, F., Çevre Mühendisliğinde Biyoprosesler**, 1995, 2.Baskı, 9 Eylül Üniversitesi Müh. Fak. Yayınları, No:234, İzmir.
- Khyami-Horani, H.**, 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12,4, 399-401.

- Kıran Ö.E., Çömlekçioğlu U., Dostbil N., 2006.** Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1),12-19.
- Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, et al., 2008.** Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057), Bioprocess and Biosystems Engineering, 31, 483-492.
- Kok, R.G., Thor, J.J.V., Roodzant, I.M.N., Brouwer, M.B.W., Egmond, M.R., Nudel, C.B., Vosman, B., Hellingwe, K.J., 1995,** Characterization of the extracellular lipase lipA of *Acinetobacter colcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene, Mol Microbiol, 15, 803-18.
- Kojima, Y., Shimizu, S., 2003.** Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380, Journal of Bioscience and Bioengineering, 96, 3, 219-226.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D., and Schmid, R.D., 1991.** Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data, Journal of Bacteriology, 173(15), 4836-4841.
- Korkmaz, N., 2007.** Recombinant Therapeutic Protease Production by *Bacillus* sp., Middle East Technical University, Chemical Engineering, Master Theses, 225 s.
- Krastanov, A., Govindarajan, A., Daniel, D., 2008.** Studies on lipase fermentation using *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 in a stirred tank bioreactor, Bulgarian Journal of Agricultural Science, 14,3, 290-299.
- Kulkarni, N., and Gadre, R.V., 2002.** Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W, J. of Industrial Microbiology&Biotechnology, 28, 344-348.
- Lee, Y. P., Chung, G. H., Rhee, J. S., 1993.** Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed as in *Escherichia coli*, Biochimica et Biophysica Acta, 1169 (2), 156-164.
- Lima, V.M.G., Krieger N., Inez, M. Sarquis, Mitchell, D.A., Ramos, L.P., and Fontana, J.D., 2003.** Production of Lipase by *Penicillium aurantiogriseum*, Food Technol. Biotechnol., 41 (2), 105–110.
- Lin, S.F., Chiou, C.M., Tsai, Y.C., 1995,** Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111, Biotechnol Letter, 17, 959-62.
- Lin, E.S., Wang, C.C., Sung, S.C., 2006.** Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture, 39, 98-102.

- Litthauer, D., Ginster, A., Skein, E.E.,** 2002. *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue Pseudomonas lipase family, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 2, 209-215.
- Liu, C.H., Lin, Y.H., Chen, C.Y., Chang, J.S.,** 2009. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40, 4, 359-363.
- Lopez, J.L.C., Porcel, E. M. R., Alberola, I. O., Martin, M.M.B., Perez, J. A. S., Sevilla, J.M.F., and Chisti, Y.,** 2006, Simultaneous determination of oxygen consumption rate and volumetric oxygen transfer coefficient in pneumatically agitated bioreactors, *Ind. and Eng. Chemistry Research*, 45, 1167-1171.
- Lowry, O., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.,** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Mahadik, N. D., Bastawde, K.B., Puntambekar, U.S., Khire, J.M., Digambar, V.G.,** 2004. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation, *Process Biochemistry*, 39, 2031-2034.
- Mahler, G.F., Kok, R.G., Cordenons, A., Hellingwerf, K.J., Nudel, B.C.,** 2000. Effects of carbon sources on extracellular lipase production and lipA transcription in *Acinetobacter calcoaceticus*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnology*, 24, 25-30.
- Maia, M.M.D., Heasley, A., Camargo de Morais M.M., Melo, E.H.M.,** 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation, *Bioresource Technology*, 23-27.
- Makhzoum, A., Knapp, J.S., Owusu, R.K.,** 1995. Factor affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D, *Food Microbiology*, 277-290.
- Mateos Diaz J.C., Rodríguez, J.A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J.,** 2006. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 5, 1042-1050.
- Mates, A., Sudakevitz, D.,** 1973. Production of lipase by *S.aureus* under various growth conditions, *J.Apppl. Bacteriology*, 36, 219-226.
- Mckellar, R.C.,** 1989. Regulation and control of synthesis, In *Enzymes of psychrotrophs in raw foods* (Ed. R.C. McKellar), Florida, CRC press, 153-172.
- Meghwanshi, G.K., Agarwal, L., Dutt, K., Saxena, R.K.,** 2006. Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40, 127-131.

- Miller, G.L.**, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Miller, M. and Litsky W.**, 1976. *Industrial Microbiology*, McGraw-Hill Book Company, 465 p.
- Moataza, M. S., Amany, Kansoh L., and Gadallah, M. A.**, 2005. Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*, *Arab J. Biotechnology*, 8, 1, 19-28.
- Nagy, V., Töke, E.R., Keong, L.C., Szatzker, G., vd.**, 2006. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation, 39, 141-148.
- Nahas, E.**, 1988. Control of lipase by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions, *J. of General Microbiology*, 134, 227-233.
- Narasaki, T., Tamura, G., Amira, K.**, 1968. Studies on the lipoprotein lipases of microorganism, II. effect culture conditions on the production of lipoprotein lipase by *Pseudomonas* spp., *Agricultural. Biology and Chemistry*, 32, 1453-1457.
- Nashif, S.A., Nelson, F.E.**, 1953, The lipase of *Pseudomonas fragi* II: factors affecting lipase production, *J. Dairy Science*, 36, 471-480.
- Ochoa, F.G., Gomez, E.**, 2009, Bioreactor scale-up ve oxygen transfer rate in microbial processes: An overview, *Biotechnology Advances*, 27, 153-176.
- Oh, B.C., Kim, H.K., Lee, J.K., Kang, S.C., Oh, T.K.**, 1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning, *FEMS Microbiology Letters*, 179, 2, 385-392.
- Ohnishi, K., Yoshida, Y., Sekiguchi, J.**, 1994, Lipase production of *Aspergillus oryzae*, *J. Fermentation and Bioengineering*, 77, 490-5.
- Okeke C.N., Okolo, B.N.**, 1990. The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*, *Biotechnology Letter*, 12, 747-50.
- Omar, C.I., Nishio N., Nagai, S.**, 1987. Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-com step liquor medium. *Agricultural. Biology and Chemistry*, 51 (8), 2145-2151.
- Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A.**, 1995. Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 669-677.
- Pamuk, F.**, 2000. *Biyokimya, Birinci Baskı*, Gazi Kitabevi, 353 s., Ankara.
- Pandey, A.**, 2003. Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84.

- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C., 2008.** Enzyme Technology, Springer, 749 p., Delhi.
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C., 2008.** Current Developments in Solid-State Fermentation, Springer, Delhi.
- Pokorny, D., Friedrich, J., Cimerman, A.,** Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. Biotechnology Letter, 1994, 16, 363-6.
- Pratuangdejkul, J., Dharmsthiti, S., 2000.** Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009, Microbiological Research, 155, 95-100.
- Papaparaskevas D., Christakopoulos, P., Kekos D., and Basil, J. M., 1992,** Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*, Biothechnology Letters, 14, 5, 397-402.
- Pekin, B., 1980,** Biyokimya Mühendisliği, Birinci Kitap, İkinci Kısım, Ege Üni., İzmir.
- Pimentel, M.C., Krieger N, Coelho, L.C., Fontana, J.O., Melo, E.H., Ledingham, W.M., Lima F.J.L., 1994,** Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. Appl. Biochemical Biotechnology, 49, 59-74.
- Raimbault, M., 1998,** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, EJB Electronic Journal of Biotechnology, 1, 3, 174-188.
- Rajmohan, S., Dodd, C.E., Waites, W.M., 2002.** Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage, Journal of Applied Microbiology, 93 (2), 205–213.
- Rao, D.G., 2010.** Introduction to biochemical engineering, Second edition, Tata McGraw Hill Education, New Delhi.
- Rao, P.V., Jayaraman, K., Lakshmanan, C.M., 1993.** Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 2: Medium optimization and effect of aeration, Process Biochemistry, 28, 391–395.
- Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R., 2001.** A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation, Process Biochemistry, 37, 2, 187-192.
- Ratledge, C., Kristiansen, B., 2006.** Basic Biothechnology, Third edition, Cambridge Univercity Press.
- Reed, G., 1981.** Industrial Microbiology, Fourth Edition, 883 p., U.S.A..
- Rosu, R., Uozaki, Y., Iwasaki Y., and Yamane T., 1997.** Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil, J. American Oil Chemists Society, 74, 4, 445-450.

- Rotticci, D., Torbjörn N., Hult, K., Martinelle M.,** 2000. An active-site titration method for lipases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1483, 1, 132-140.
- Ruchi, G., Anshu, G., Khare, S.K.,** 2008. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application, *Bioresource Technology*, 99, 11, 4796-4802.
- Salleh, A.B., Musani, R., Razak, C.N.A.,** 1993, Extra and Intracellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production, *Canadian Journal Microbiology*, 39, 978-81.
- Schuepp, C., Kermasha, S., Michalski, M.C., and Morin M.,** 1997. Production, partial purification and characterisation of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037, *Process Biochemistry*, 32, 3, 225-232.
- Sekhon, A., Dahiya, N., Tewari, R.P, Hoondal, G.S.,** 2006. Production of extracellular lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 in submerged fermentation, *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 179-183.
- Sharma R., Chisti, Y., Banerjee,** 2001. U.C., Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, 19, 8, 627-662.
- Sharma R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Jolly, R.S., Gupta, L.K., Gupta, J.K.,** 2002, Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus sp.*, RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Indian Journal of Microbiology*, 42, 49-54.
- Sharma, A., Bardhan, D., Patel, R.,** 2009. Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter sp.* BGCC#490, *Indian Journal of Biochemistry&Biophysics*, 46, 178-183.
- Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H. I. and Kato, Y.,** 1998. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, 5, 304-307.
- Sharon, C., Nakazato, M., Ogawa, H.I., Kato, Y.,** 1998. Lipase-induced hydrolysis of castor oil: effect of various metals, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21, 292-295.
- Shu, C.Ha., Xu C.J., Lin, G.C.,** 2006. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*, *Process Biochemistry*, 41, 3, 734-738.
- Stoecklein, W., Sztajer, H., Menge, U., Schmid, R.D.** 1993, Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1168, 181-189.
- Sugihara, A., Tani, T., Tominaga Y.,** 1991, Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.*, *The Journal of Biochemistry*, 109, 211-216.

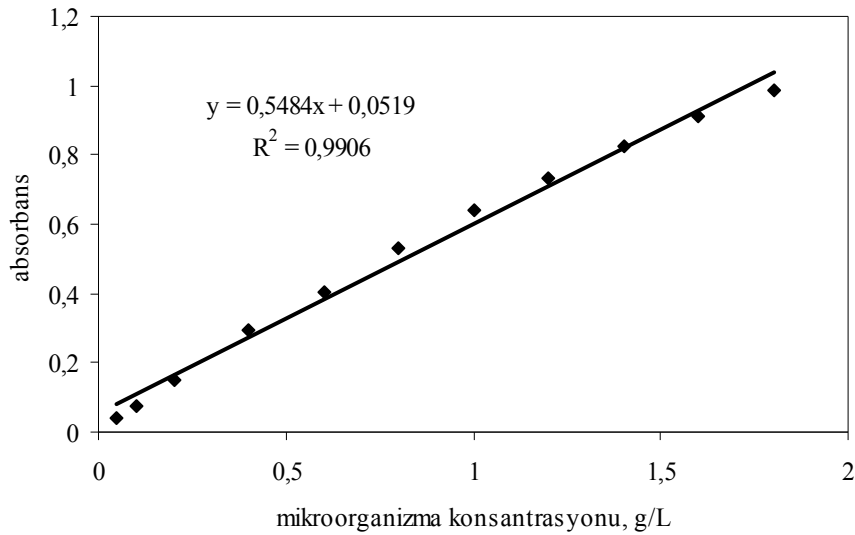
- Sztajer, H., Maliszewska, I.,** 1989, The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*, *Biotechnology Letter*, 11, 895–898.
- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank A., and Marilene H.V.,** 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, *Process Biochemistry*, 40, 1, 321-326.
- Soataert, W., Vandamme, E.J.,** 2010., *Industrial Biotechnology*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, Germany.
- Sun, S.Y., Xu, Y.,** 2008. Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme, *Process Biochemistry*, 43, 219-224.
- Treichel, H., Oliveria D., Mazutti, A., Luccio, M., Oliveria, J.V.,** 2010, A Review on Microbial Lipases Production, *Food Bioprocess Technology*, 3, 182-196.
- Tüzün, C.,** 1997. *Biyokimya, Üçüncü Baskı*, Palme Yayınları, 487 s., Ankara.
- Ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M.I.,** 2002. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 37, 637–641.
- Uvarani, G., Jaganathan, L., Shridas, P., Boopathy, R.,** 1998. Purification and characterization of lipase from *Rhizomucor miehei*, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 57, 607–610.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., and Haas, M.J.,** 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 4-6, 113-148.
- Yang Sun, S., Xu, Y.,** 2008. Solid-state fermentation for “whole-cell synthetic lipase” production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*, 43, 219-224.
- Wang Y, Srivastava KC, Shen G-J, Wang HY,** 1995, Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). *Journal and Fermentation Bioengineering*, 9, 433-438.
- Wiseman, A.,** 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*, Second Edition, Chapter 3, The Application of Enzymes in Industry, 274-373.
- Winkler, U. K., Stuckmann M.,** 1979, Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens* *Journal of Bacteriology*, 663-670.

URL-1, www.microbugs.org

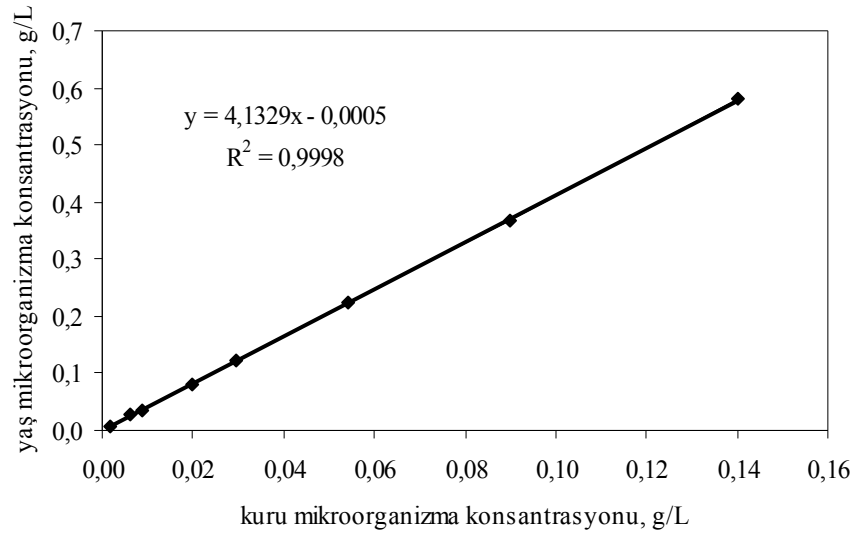
8. EKLER

EK 1. Mikroorganizma Konsantrasyonu Kalibrasyon Doğrusu

Mikroorganizma konsantrasyonu spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bunun için öncelikle 0.05-1.8 g/L arasında konsantrasyonlarda hazırlanan mikroorganizma çözeltilerinin uygun dalga boyu olarak seçilen 400 nm’de absorbanslarının okunmasıyla yaş mikroorganizma kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur (Ek Şekil 1.1.). Verilerin değerlendirilmesinde kuru mikroorganizma ağırlığı kullanıldığından, yaş ve kuru ağırlık arasındaki ilişkiyi belirlemek için mikroorganizma sıvı ortamda üretilip santrifüjlenerek ayrılmış, ayrılan mikroorganizmalar değişik ağırlıklarda tartılarak, 60 °C’de etüvde sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları saptanmıştır. Kuru ağırlığa karşı yaş mikroorganizma ağırlığı grafiğe geçirilerek *P.fluorescens* için kuru mikroorganizma kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir (Ek Şekil 1.2.).



Ek Şekil 1.1. Yaş mikroorganizma kalibrasyon doğrusu

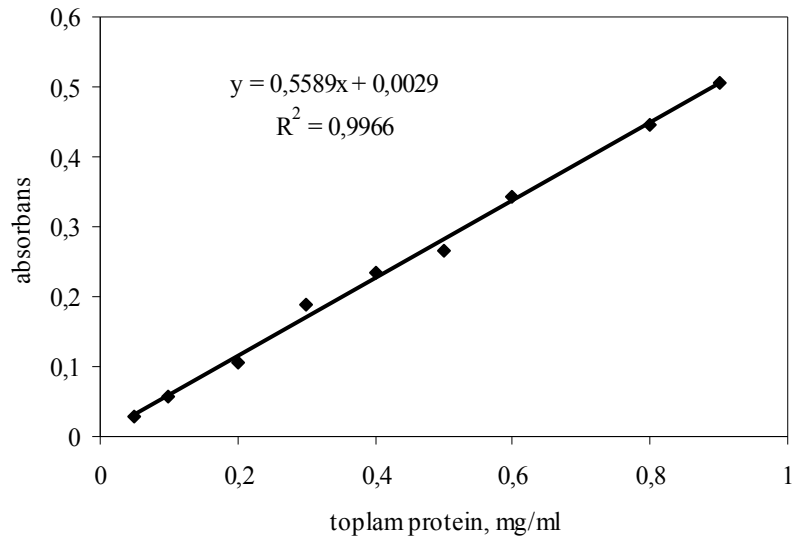


Ek Şekil 1.2. Yaş-kuru ağırlık kalibrasyon doğrusu

Analiz için, fermantasyon ortamından alınan 5 mL örnek 5000-6000 rpm’ de 10 dakika santrifüjlenmiş, tüpte kalan mikroorganizma kütlesi mikroorganizmanın gelişimine bağlı olarak su ile seyreltilerek 400 nm’de suya karşı absorbans okunmuş ve çalışma doğruları kullanılarak kuru mikroorganizma ağırlığı saptanmıştır.

EK 2. Toplam Protein Konsantrasyonu Kalibrasyon Doğrusu

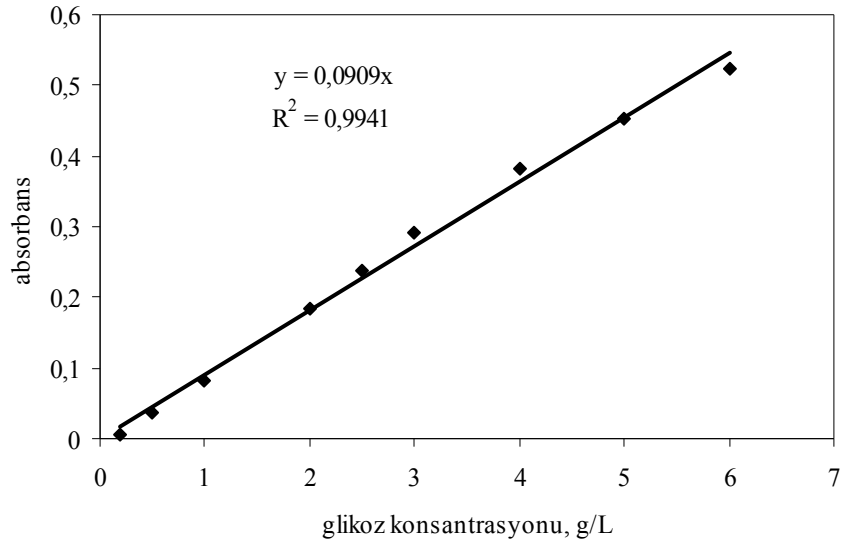
Bovine serum albuminin (BSA) distile suda hazırlanan 1 mg/mL’lik standart stok çözeltisinden belli konsantrasyonlarda hazırlanan protein çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon grafiği Ek Şekil 2.1.’de verilmiştir.



Ek Şekil 2.1. Toplam protein kalibrasyon grafiği

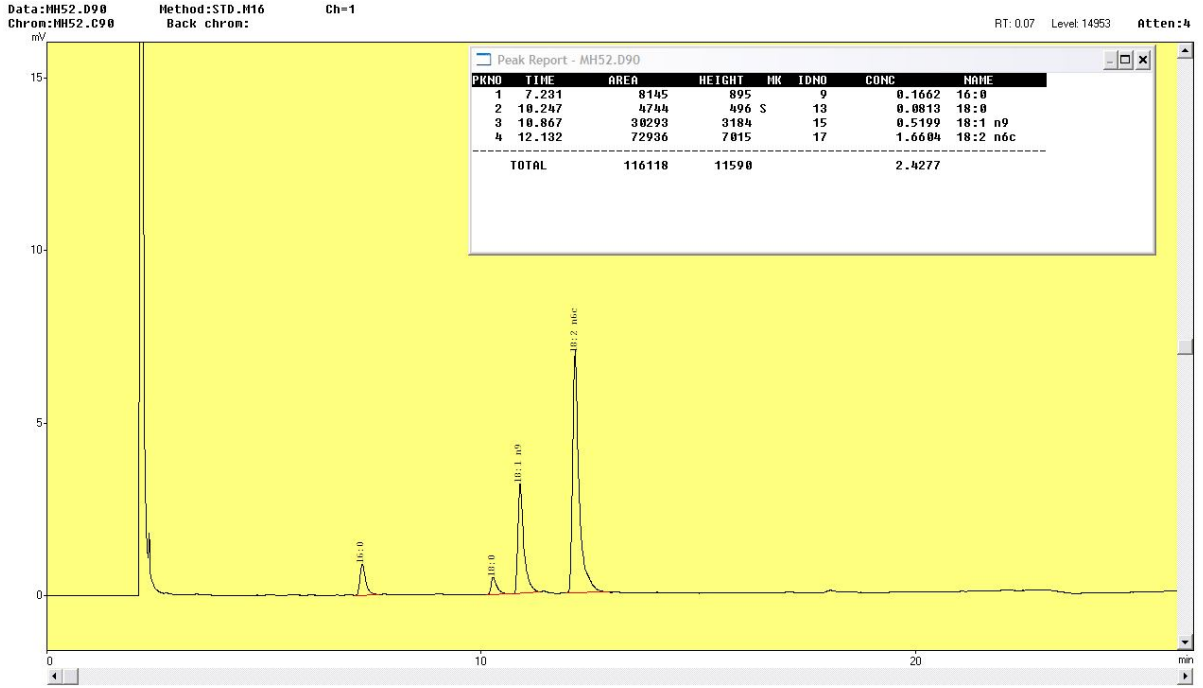
EK 3. Glukoz Tayini İçin Kalibrasyon Doğrusu

10 g/L'lik glukoz içeren standart stok çözeltiden belli konsantrasyonlarda hazırlanan glukoz çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon grafiği Ek Şekil 3.1.'de verilmiştir.

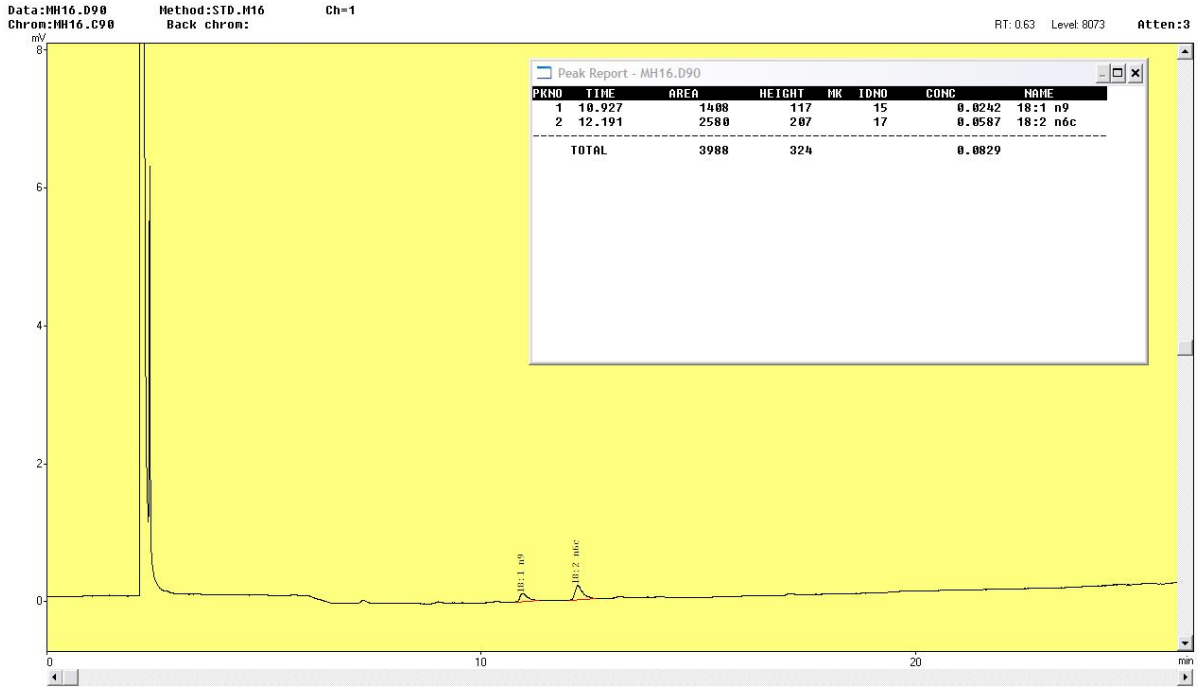


Ek Şekil 3.1. Glukoz kalibrasyon grafiği

EK 4. Yağ asidi metil esterlerinin örnek gaz kromatogramları



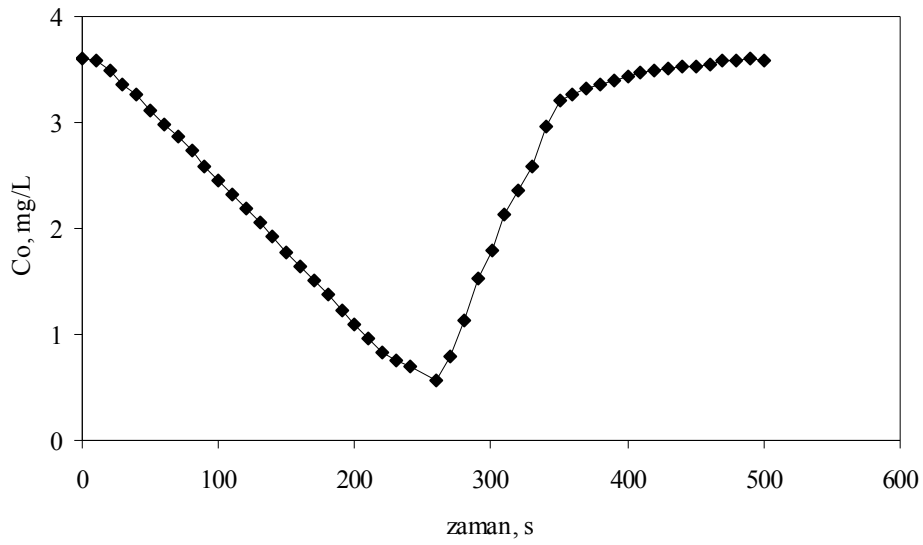
Ek Şekil 4.1. Tatlı kızartılmış yağ için 30. saatte alınan numunedeki gaz kromatogramı



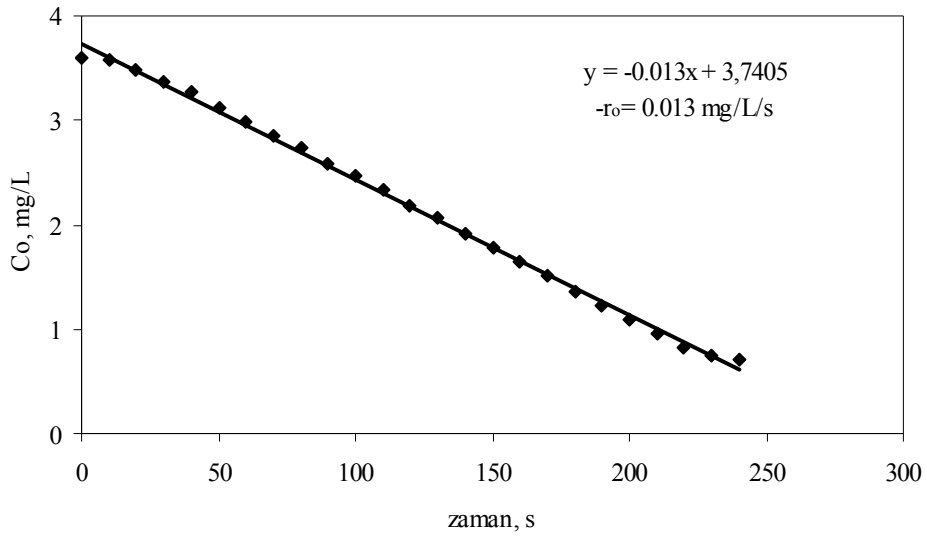
Ek Şekil 4.1. Tatlı kızartılmış yağ için 96. saatte alınan numunedeki gaz kromatogramı

EK 5. Sıvı Faz Hacimsel Kütle Aktarım Katsayısı ve Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının Dinamik Metot ile Belirlenmesi

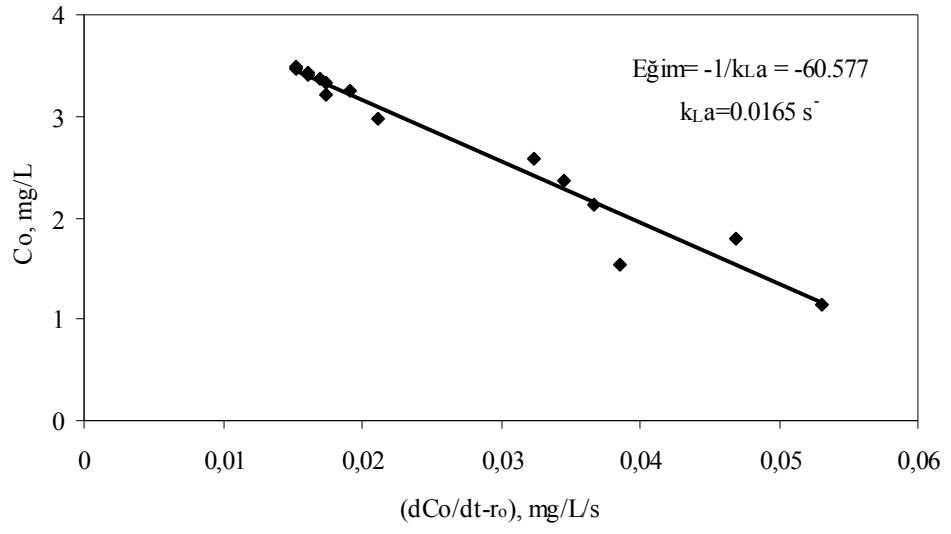
Biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi sonucunda çözünmüş oksijen konsantrasyonunda azalmanın gözlemlendiği (t , C_o) grafiğinde, azalan doğrusal ilişkiden r_o değeri bulunmuştur. $\{(dC_o/dt-r_o); C_o\}$ grafiği çizilerek buradaki eğimden $-1/k_L a$ değeri bulunmuş ve $k_L a$ değeri hesaplanmıştır. Aşağıda 0.2 vvm hava giriş hızı ve 350 rpm karıştırma hızı için 45.saatteki r_o ve $k_L a$ değerlerinin hesabı gösterilmiştir.



Ek Şekil 5.1. Çözünmüş oksijen derişiminin zamanla değışimi



Ek Şekil 5.2. Mikroorganizma oksijen tüketim hızı eğrisi



Ek Şekil 5.3. Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısının (k_{La}) belirlenmesi

EK 6. Ayçekirdeği Küspesi Bileşimi (Ergün vd., 2004, Coşkun vd., 2004, Doğa Gıda)

Nem	%7
Protein(KM)	% 28
Yağ	% 1.5
Kül	%7.7
Nişasta	-
Metabolik Enerji (ME)	2240 kcal/kg
Mineral İçeriği	
Kalsiyum	% 0.48
Fosfor	% 1.0
Potasyum	% 1.5
Klor	% 0.12
Magnezyum	% 0.63
Kükürt	% 0.39
Sodyum	% 0.04
Demir	282 ppm
Çinko	88 ppm
Mangan	45 ppm
Vitamin İçeriği	
Kolin	2900 mg/kg
Niasin	220 mg/kg
Riboflavin	3.1 mg/kg
Tiamin	-
Biotin	-
Karoten	-
Aminoasit içeriği (% protein)	
Arjinin	8.18
Histidin	2.6
izolöysin	4.09
Löysin	6.41
Lizin	3.56
Metiyonin	2.29
Treonin	3.72
Valin	4.95
Fenilalanin	4.62

ÖZGEÇMİŞ

11.04.1980 tarihinde Elazığ'da doğdu. İlk ve orta eğitimini Elazığ'da tamamladı. Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünden 2001 yılında mezun olduktan sonra, aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başlamış ve 2004 yılında mezun olmuştur. Halen Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında Doktora öğrencisidir.