T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EKSTRASELÜLER LİPAZ KAYNAĞI OLARAK BAZI MİKROFUNGUSLARIN TARANMASI VE KATI SUBSTRAT FERMANTASYONU İLE ENZİM ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

MELTEM ÇAKMAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: DR. ÖĞRETİM ÜYESİ HALİDE AYDOĞDU

Meltem ÇAKMAK'ın hazırladığı **"Ekstraselüler Lipaz Kaynağı Olarak Bazı Mikrofungusların Taranması ve Katı Substrat Fermantasyonu ile Enzim Üretim Koşullarının Optimizasyonu"** başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Prof. Dr. Zeynep ERDOĞAN	.....
Doç. Dr. Bilal BALKAN	.....
Dr. Öğr. Üyesi Halide AYDOĞDU	.....

Tez Savunma Tarihi: 20 / 06 / 2018

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

(Dr. Öğr. Üyesi Halide AYDOĞDU)

Tez Danışmanı

.....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

22/06/2018

Meltem ÇAKMAK

iii

Yüksek Lisans Tezi

Ekstraselüler Lipaz Kaynağı Olarak Bazı Mikrofungusların Taranması ve Katı Substrat Fermantasyonu ile Enzim Üretim Koşullarının Optimizasyonu

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Trigliseritlerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen lipazlar (E.C.3.1.1.3), çeşitli endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Lipaz üretimi için, mikrobiyal kaynakların taranması önemli bir konudur. Yine bu üretimde çeşitli tarımsal atıkların substrat olarak kullanılabilirliği de biyoteknolojik açıdan önem arz etmektedir. Bu çalışmada, daha önceden izole edilip tanımlanmış olan 85 adet mikrofungus suşunun lipolitik aktivite açısından taranması, en iyi lipaz aktivitesi gösteren suşun tarımsal atıkların substrat olarak kullanıldığı katı substrat fermantasyonu (SSF) yöntemi ile üretilmesi, fungal lipaz üretimi ve SSF kültür ortam koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. En iyi lipaz aktivitesine sahip mikrofungusun *Penicillium aurantiogriseum* olduğu belirlenmiş ve lipaz kaynağı olarak kullanılmıştır. Ayçiçeği, mısır küspesi ve buğday kepeğinin substrat olarak kullanıldığı SSF ortamlarında en iyi katı substratın ayçiçeği küspesi olduğu belirlenmiştir. Lipaz üretimi için SSF kültür ortam koşulları optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimum fermantasyon koşulları; 6 gün inkübasyon süresi, 25 ^{o}C inkübasyon sıcaklığı, nemlendirme sıvısı pH: 5.5 (distile su), başlangıç nem düzeyi %75 (w/v), başlangıç aşı konsantrasyonu 1 ml ($1x10^6$ spor/ml) ve karbon kaynağı olarak %1 susam yağı ilavesi şeklinde belirlenmiştir. Sağlanan optimum koşullar sonucunda volüm aktivite 0,4 U/ml, spesifik aktivite ise 1,13 U/mg olarak kaydedilmiştir. Sonuç olarak tarımsal atıkların substrat olarak kullanıldığı SSF yöntemi ile fungal lipaz üretimi çalışmaları, çevreye ve ekonomiye büyük katkı sağlayacak çevre dostu, ucuz ve kolay enzim üretimine olanak sağlayabilir.

Yıl : 2018

Sayfa Sayısı : 67

Anahtar Kelimeler : mikrofungus, *Penicillium aurantiogriseum*, SSF, lipaz, optimizasyon

Master Thesis

Screening of Some Microfungies as Extracellular Lipase Source and Optimization of Enzyme Production Conditions by Solid Substrate Fermentation

Trakya University Institute of Science

Biotechnology and Genetics of Department

ABSTRACT

Lipases (E.C.3.1.1.3) that catalyze the hydrolysis of ester bonds of triglycerides are widely used in various industrial applications. So it is a important issue that screening of microbial sources for production of lipases. In this production, the availability of various agriculturel wastes as substrates is also biotechnologically important. In this study, it was aimed to screen on 85 microfungus strains that previously isolated and identified for lipolytic activity, to produce of strain showing the best lipolytic activity by solid substrate fermentation (SSF) method which is used as substrate of agricultural wastes, fungal lipase production and, optimization of SSF culture media conditions. *Penicillium aurantiogriseum* was determined as microfungus with the best lipase activity and used as lipase source. It has been determined that the best solid substrate is sunflower pulp in SSF media where sunflower pulp, wheat bran and corn pulp is used as substrate. Optimization of SSF culture medium were performed for lipase production. Optimum fermentation conditions was found as; 6 days of incubation time, 25 ^{o}C incubation temperature, moisturizing liquid pH: 5.5 (distilled water), initial moisture level 75% (w/v), initial inoculum concentration 1 ml ($1x10^6$ spores / ml) and 1% sesame oil as carbon source. As a result of the optimum conditions, the volume activity was recorded as 0.4 U / ml and the specific activity was recorded as 1.13 U / mg. As a result, fungal lipase production studies using SSF as a substrate of agricultural wastes can provide environment friendly, cheap and easy enzyme production which will make great contribution to the environment and economy.

Year : 2018

Number of Pages : 67

Keywords : microfungi, *Penicillium aurantiogriseum*, SSF, lipase, optimization

TEŞEKKÜR

Tüm tez çalışmam boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen, tüm bilgi birikimi ve tecrübesinden yararlandığım, bana yol gösteren, bir hocadan daha fazlasını gördüğüm değerli tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Halide AYDOĞDU'ya,

Bağlı bulunduğum Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı'na, laboratuar çalışmalarımı yaptığım Arda Meslek Yüksekokulu Müdürlüğü'ne,

Enzim çalışmalarım konusunda yaptığı katkılardan dolayı değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hatice PALÜZAR'a,

Hayatımın her alanında maddi ve manevi yanımda olan, beni yetiştiren, bugün bulunduğum yerde olmamda sonsuz katkıları olan, kendime her zaman örnek aldığım canım annem Naciye ÇAKMAK'a ve sevgili babam Cevdet ÇAKMAK'a çok teşekkür ederim.

Meltem ÇAKMAK, 2018

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TÜBAP 2017/89 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBAP Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER x

SİMGELER DİZİNİ xiii

ÇİZELGELER DİZİNİ xv

ŞEKİLLER DİZİNİ xvii

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ 1

BÖLÜM 2 4

GENEL BİLGİLER 4

2.1. Enzimler ve Mikrobiyal Enzim Eldesi 4

2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması 5

2.1.2. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler 6

2.2. Funguslar ve Fungal Enzim Üretimi 8

2.2.1. Fungusların Genel Özellikleri 8

2.2.2. Fungusların Biyoteknolojik Önemi ve Fungal Metabolitler 9

2.3. Lipazlar 11

2.3.1. Lipazların Genel Özellikleri ve Endüstriyel Kullanım Alanları 11

2.3.2. Lipaz Üretimi Üzerinde Etkili Olan Parametreler 14

2.3.3. Lipazların Mikrobiyal Kaynakları 15
2.4. *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx 1901 16
2.5. Katı Substrat Fermantasyonu (SSF) 18
2.5.1. SSF Yönteminde Substratlar 21
BÖLÜM 3 22
KAYNAK ARAŞTIRMASI 22
BÖLÜM 4 26
MATERYAL ve METOD 26
4.1. Ekstraselüler Lipaz Aktivitesi Açısından Mikrofungusların Taranması 26
4.1.1. Kullanılan Tarama Ortamı 27
4.1.2. Mikrofungusların Tarama Ortamına Ekimi ve Üretilmesi 28
4.1.3. En İyi Lipolitik Aktivite Gösteren Mikrofungus Suşunun Belirlenmesi 29
4.1.4. Mikrofungusların Üretimi ve Saklanması 30
4.2. SSF Kültür Ortamının Hazırlanması 30
4.2.1. SSF Kültür Ortamına Mikrofungusların Ekimi, Üretimi ve Lipaz Eldesi 31
4.2.2. Ekstraselüler Lipaz Aktivitesinin Spektrofotometrik Yöntem ile Ölçülmesi 32
4.3. En İyi SSF Kültür Ortamının Belirlenmesi 33
4.4. SSF ile Ekstraselüler Lipaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu 33
4.4.1. Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi 33
4.4.2. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi 34
4.4.3. Optimum Başlangıç Nem Miktarının Belirlenmesi 34
4.4.4. Optimum Aşı Miktarının Belirlenmesi 35
4.4.5. Optimum Başlangıç pH Düzeyinin Belirlenmesi 35
4.4.6. Bitkisel Yağların Etkisinin Belirlenmesi 35

4.4.7. Belirlenen Optimum SSF Kültür Ortamı Koşullarında Spesifik Aktivite Ölçümü 35
4.5. İstatiksel Analiz 36
BÖLÜM 5 37
BULGULAR 37
5.1. En İyi Lipolitik Aktivite Gösteren Mikrofungusun Seçimi 37
5.2. SSF Kültür Ortamındaki Üretim Koşullarının *P. aurantiogriseum* Ekstraselüler Lipaz Sentezi Üzerine Etkileri 39
5.2.1. SSF Kültür Ortamında Kullanılan Substratın Etkisi 39
5.2.2. İnkübasyon Süresinin Etkisi 40
5.2.3. İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi 41
5.2.4. Başlangıç Nem Düzeyinin Etkisi 42
5.2.5. Aşı Miktarının Etkisi 43
5.2.6. Nemlendirme Sıvısı pH'sının Etkisi 44
5.2.7. Bitkisel Yağ İlavesinin Etkisi 45
5.2.8. Belirlenen Optimum SSF Kültür Ortamı Koşullarında Spesifik Aktivite Ölçümü 46
BÖLÜM 6 47
SONUÇLAR ve TARTIŞMA 47
KAYNAKLAR 55
EKLER 62
ÖZGEÇMİŞ 66
TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ ile İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER 67

SİMGELER DİZİNİ

Simgeler

λ:	Dalga boyu (nm)
ml:	Mililitre
mg:	Miligram
µg:	Mikrogram
ε:	Molar absorptivite katsayısı (L/mol.cm)
M:	Molarite
nm:	Nanometre
N:	Normalite
µ:	Özgül çoğalma hızı (st-1)
r.p.m:	Rounds Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
cm:	Santimetre
ºC:	Santigrat derece
U:	Ünite
U/ml:	Ünite/mililitre
U/mg:	Ünite/miligram
%:	Yüzde

Kısaltmalar

CYA:	Czapek Yeast Autolysate Agar
CREA:	Creatine Sucrose Agar
dk:	Dakika
gr:	Gram
MEA:	Malt Ekstrakt Agar
PDA:	Potato Dextrose Agar
pNP:	Para-nitrofenol
pNPP:	Para-nitrofenil palmitat
SSF:	Solid State Fermentation
SmF:	Submerged Fermentation
YEA:	Yeast Extract Sucrose Agar

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mikrofunguslar tarafından üretilen primer metabolitler ve kullanım alanları 10
Çizelge 2.2. Sekonder metabolitler ve kullanım alanları 11
Çizelge 2.3. Lipazların endüstride kullanım alanlarından bazıları 14
Çizelge 2.4. Lipaz kaynağı olarak kullanılan küfler 15
Çizelge 2.5. SSF'nin avantajları ve dezavantajları 20
Çizelge 4.1. Lipaz'ın spektrofotometrik yöntem ile ölçümünde uygulanan işlemler 32
Çizelge 5.1. Tribütirinli besiyerinde taranan mikrofungus suşlarının 7. gün lipolitik aktivite ölçümleri 38
Çizelge 5.2. SSF kültür ortamında başlangıç pH düzeyinin ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi 44
Çizelge 5.3. Belirlenen optimum ortam koşullarında spesifik aktivite tayini ile protein miktarı 46
Çizelge A.1. Farklı SSF ortamlarının toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları 64
Çizelge A.2. Farklı inkübasyon sürelerinin toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları 64
Çizelge A.3. Farklı sıcaklık derecelerinin toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları 64

Çizelge A.4. Farklı nem düzeylerinin toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları 64
Çizelge A.5. Farklı aşı miktarlarının toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları 65
Çizelge A.6. Farklı pH düzeylerinin toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları 65
Çizelge A.7. Farklı bitkisel yağların toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları 65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Trigliseridin gliserol ve yağ asidine hidrolizi 12

Şekil 2.2. *Penicillium aurantiogriseum* (PDA) besiyerinde 7 günlük koloni görünümü 17

Şekil 2.3. *Penicillium aurantiogriseum* (PDA) besiyerinde 7 günlük koloni görünümü (alttan) 17

Şekil 2.4. *Penicillum aurantiogriseum*'un mikroskobik görünümü 18

Şekil 4.1. Tarama yapılan mikrofungus suşlarının stok kültürleri 27

Şekil 4.2. Besiyerlerinden mantar delici ile kesit alma 28

Şekil 4.3. Lipaz aktivitesinin analiz basamakları 29

Şekil 4.4. 80 °C'de 24 saat kurutululan ayçiçeği küspesi, mısır küspesi ve buğday kepeği 30

Şekil 4.5. Sterilize edilmiş SSF kültür ortamları 31

Şekil 4.6. Kaba enzim kaynağı elde etme hazırlıkları 31

Şekil 4.7. Sırası ile gazlı bez ve filtre kağıdından geçirilen ve kaba enzim kaynağı olarak elde edilen süzüntüler 32

Şekil 5.1. (A) Tributirinli besiyerinde pozitif olarak değerlendirilen suşların görünümü, (B) Tribütirin Agar kontrol besiyeri ve *Penicillium aurantiogriseum* türünün tribütirinli besiyerindeki lipaz aktivitesi 37

Şekil 5.2. Farklı substratlar içeren SSF kültür ortamlarında *P. aurantiogriseum*'un lipaz aktivitesi 39

Şekil 5.3. SSF kültür ortamında inkübasyon süresinin ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi 40
Şekil 5.4. SSF kültür ortamında inkübasyon sıcaklığının ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi 41
Şekil 5.5. SSF kültür ortamında başlangıç nem düzeyinin ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi 42
Şekil 5.6. SSF kültür ortamında başlangıç aşı miktarının ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi 43
Şekil 5.7. SSF kültür ortamına bitkisel yağ ilavesinin ekstraselüler lipaz aktivitesin üzerine etkisi 45

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfüsu ve organik kaynakların buna paralel olarak azalmasıyla birlikte bilim insanları yeni arayışlar içerisine girmiş ve günümüzde adından sıkça bahsettiren 'Biyoteknoloji' bilimi bu arayışlara çare olabileceği umuduyla hızlı gelişim göstermiştir (Baylan, Mazı & Gündoğdu, 2015). Biyoteknolojinin başlangıcı olarak fermantasyon ürünleri gösterilmiştir. Daha sonra, mikroorganizmaların primer ve sekonder ürünleri olarak enzimler, organik asitler, antibiyotikler elde edilmeye başlanmıştır (Ekinci, Akyol, Karaman & Özköse, 2005). Biyoteknoloji teknikleri ile, canlıların genetik materyalinde ıslah metotlarının geliştirilmesi ve doğal olarak üreme-çoğalma zamanlarında elde edilemeyen değişiklikler yapılması da önemli ölçüde mümkün kılınmıştır (Kalaycı, Hukkamlı, Resioğlu, Mısıroğlu & Karaman, 2017).

Enzimler, gıda, tekstil, tıp, eczacılık, kozmetik vb. alanlarda sıkça kullanılan biyolojik moleküllerdir. Enzimler genel olarak bitkisel veya hayvansal kaynaklardan ya da mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için çok değerli olarak görülmekte ve bu da bilim insanlarını mikrobiyal biyoteknoloji alanında yoğun çalışmalar yapmaya yönlendirmektedir (Topal, Pembeci, Borcaklı, Batum & Çeltik, 2000). Günümüzde çok sayıda avantajı nedeni ile birçok alanda mikrobiyal kaynaklı enzim kullanımı yaygın hale gelmiş ve mikroorganizmalardan biyoteknolojik süreçlerle endüstriyel enzimlerin üretimi üzerine araştırmalar da yoğunlaşmıştır (Akkaya & Pazarlıoğlu, 2014).

Mikrobiyal enzim üretiminde; su olmayan ya da az bulunan ortamda katı ve az sulu materyal üzerinde mikroorganizmaların gelişimi olarak tanımlanan ve "katı substrat fermantasyonu veya yüzey kültür tekniği (solid state fermentation-SSF)" adı verilen fermantasyon yöntemi (Hashemi vd., 2010; Pandey, Soccol & Mitchell, 2000; Singhaniaa, Patel, Soccol & Pandey, 2009) ve "derin kültür tekniği (Submerged Fermentation-SmF)" kullanılabilmektedir. Endüstriyel üretimlerde SmF tekniği tercih edilmesine rağmen; SSF'in keşfedilmesi, birçok araştırmacının enzim üretiminde SSF üzerinde yoğunlaşmalarına sebep olmuştur. SSF'in SmF'e göre üstün özellikleri arasında; bu yöntemde çok çeşitli endüstriyel atıkların kullanılabilmesi, katabolik represyon ve proteazlar tarafından proteinlerin yıkımı olaylarının çoğunlukla SSF'de az oranda veya hiç oluşmaması olarak gösterilebilir (Kar, Datta & Ray, 2010).

Günümüzde artan nüfus gıda, tekstil, deterjan, ilaç, kozmetik, kimya gibi sanayilerin de genişlemesine neden olmaktadır. Sanayileşmenin artması ile bu sektörlerde sıkça kullanılan enzimlere olan ihtiyaç da giderek artmakta ve bunun yanı sıra endüstriyel atıklar da ortaya çıkmaktadır. Lipazlar, tüm bu alanlarda en yaygın kullanılan enzimler arasında yer almaktadır.

Lipazlar (E.C.3.1.1.3), yağların yağ asitleri ve gliserole parçalanmasını sağlayan hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Lipaz üretimi için yeni kaynakların özellikle de üretimin daha kolay, ucuz ve hızlı olduğu mikrobiyal kaynakların yaratılması da önemli bir konudur. Yine bu üretim için atıkların substrat olarak kullanılabilirliği de biyoteknolojik açıdan önem arz etmektedir. Bakteri, maya ve fungus gibi mikroorganizma gruplarının lipazları sentezlediği bilinmektedir (Gopinath, Periasamy, Thangavel & Azariah, 2013; Pacheco vd., 2015). Ancak mikrofungus türleri pH, sıcaklık gibi faktörlere karşı dayanıklı oldukları ve fungal biyokütleden enzim ekstraksiyonları daha ucuz olduğu için lipaz üretiminde diğer mikroorganizmalara göre daha çok tercih edilmektedirler (Gül, 2013; Sharma, Sharma & Saxena, 2016). *Aspergillus, Candida, Humicola, Mucor, Rhizopus* gibi mikrofungus türlerinden lipaz üretimi daha önce yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Sethi, Rout, Das, Nanda & Sahoo, 2013). Fungal lipazlar gıda, kimya ve farmosötik endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Rodrigues vd., 2016; Sumathy, Vijayalakshmi & Deecaraman, 2012).

Bu çalışma ile; daha önceden izole edilip tanımlanmış mikrofungusların lipolitik aktivite açısından taranması, en iyi lipaz aktivitesi gösteren suşların seçilmesi, seçilen bu suşların katı substrat fermantasyonu yöntemi ile lipaz enzimi üretmesinin sağlanması ve SSF ortamında enzim üretimi için optimum koşulların (pH, sıcaklık, nem vb.) belirlenmesi amaçlanmıştır. Tüm bunlar ile fungal enzimin biyoteknolojik yöntemlerle üretilerek; endüstride kullanılan lipaz enzimi için fungal kaynak oluşturulabileceği, SSF yöntemi ile çeşitli atıkların kullanılabilirliği saptanarak bunların lipaz enzimi üretiminde değerlendirilmesine katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler ve Mikrobiyal Enzim Eldesi

Genel olarak enzimler canlılarda bulunan biyolojik katalizörler olarak tanımlanır. Hücrelerde yaşamsal olan tüm aktiviteler enzimlerin aktivitelerine bağlıdır, yani kısaca ifade edilecek olursa; enzimler, yaşamın anahtarıdır (Aran, 2010).

Enzimler, katalitik aktiviteye sahip büyük çoğunluğu protein yapısında olan bileşiklerdir. Sadece proteinden ibaret olan bir kısım enzim mevcut olsa da; enzimler genel olarak apoenzim denen protein kısmı ve kofaktör olmak üzere iki farklı kısımdan meydana gelirler. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlarda tepkimeye katılan kimyasal moleküllere 'substrat' adı verilmektedir. Bir enzim yalnızca aktif bölgesinin üç boyutlu yapısına uygun olan substrat ile tepkimeye girebilmektedir. Dolayısıyla her enzim sadece belirli tip bir substrata etki edebilir (Akkaya & Pazarlıoğlu, 2014; Aran, 2010; Demiralp, Büyük, Aras & Duman Cansaran, 2015).

Enzimlerin aktivitesi; bulunduğu ortamın iyonik ağırlığı, pH, metal iyonları, sıcaklık gibi etkenler ile substratların ve inhibitörlerin var oluşlarından etkilenebilmektedir (Aran, 2010).

Pasteur'ün buluşları, biyoteknolojik ilerlemelere bir yenisi olarak enzim teknolojilerini başlatmıştır. Enzim teknolojileri; enzim üretimini, saflaştırılmasını, immobilizasyonunu ve aynı zamanda endüstriyel olarak kullanılmasını da içeren geniş kapsamlı bir teknolojidir (Özgen, Emiroğlu, Yıldız, Taş & Purutçuoğlu, 2007).

Endüstriyel birçok alanda kullanılan enzimlerin %80'i hidroliz amaçlı olup bunların %60'ını proteazlar, %30'unu karbonhidrazlar, %30'unu lipazlar oluşturur (Aran, 2010).

Biyolojik olarak enzimler herhangi bir canlı organizmadan elde edilebilmekte ve ticari enzim üretiminde bu organizmalar kaynak olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin çoğu mikrobiyal kaynaklıdır. Mikroorganizmaların enzim üretme yetenekleri, önemli endüstriyel avantajlar sağlamaktadır ve mikrobiyal enzimlerin kullanımı yalnızca gıda endüstrisinde bile, tek başına %50 olarak ifade edilen büyük bir paya sahiptir (Korcan, Özkara, Akyıl, Ciğerci & Konuk, 2007).

2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB)'nin önerisi ile Enzim Komisyonu tarafından enzimler genel olarak 6 gruba ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre enzimler altı ana fonksiyonel sınıfa ayrılmış ve sırası ile tepkime türü, spesifik tepkime, substrat veya substratları niteleyen dört basamaklı bir numara ile tanımlanmışlardır. Bu rapora göre enzimlerin sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Akkaya & Pazarlıoğlu, 2014; Akyıl, 2014).

1. Oksidoredüktazlar: Bu grupta bulunan enzimler redoks tepkimelerini katalizler. Bu büyük ve önemli grup dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar vs. gibi geleneksel isimlerle de anılmaktadır.

2. Transferazlar: Hidrojen haricinde bir atomun, bir molekülden diğer bir moleküle transferini sağlayan enzim grubudur. Bunlar fonksiyonel grupları transfer ederler. Tek karbon taşıyan grupları, aldehidik ve ketonik grupları transfer edenler bu enzim sınıfına giren gruplara örnek olarak verilebilir.

3. Hidrolazlar: Su molekülü vasıtası ile moleküllerin yıkımını sağlayan enzimlerdir. Kısaca hidrolitik reaksiyonları katalize ederler. Ester, eter, peptit, glikozid, asit anhidrit, C-C, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bu enzim grubunda lipazlar, ribonükleazlar, fosfatazlar, pirofosfatazlar, glikozidazlar yer almaktadır

4. Liyazlar: Su molekülü açığa çıkarmadan diğer molekülleri yıkan enzimlerdir. Çifte bağlara grup ekleyen veya grupların yer değiştirmesi ile çift bağ oluşumunu katalizeyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

5. İzomerazlar: Molekül içi değişikliğine sebep olarak o molekülün uzaydaki ifadesini değiştirebilen enzimlerdir. Örnek olarak Rasemazlar ve Epimerazlar bu gruba verilebilir. Rasemaz; L-Alanini, D-Alanine, UDP epimeraz; Alanin UDP Glukozu, UDP Galaktoza çevirmektedirler.

6. Ligazlar (Sentetazlar): Enerji kullanmak suretiyle substrat moleküllerinin birbirlerine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir. ATP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının parçalanması ile açığa çıkan enerji yardımı ile iki bileşik arasında bağ oluşumunu sağlarlar. (Akkaya & Pazarlıoğlu, 2014; Bingöl, 1977; Korkmaz, Tınkılıç, Özen & Güder, 2012).

Günümüzde enzimler farklı şekillerde sınıflandırılabilmektedir. Bunlardan biri de enzimleri aktif oldukları yere göre sınıflandırmadır. Buna göre enzimler hücre dışı ekzoenzimler (ekstraselüler enzimler) ve hücre içi endoenzimler (intraselüler) olarak 2 grupta da incelenebilirler. Endoenzimler; hücre içinde rol oynarlar. Büyük bir enerji formu oluşturarak bu formu hücrede direkt olarak kullanabilirler. Ekzoenzimler ise hücre dışında rol oynarlar ve hidrolitik işlev yaparlar. Az miktarda serbest enerjiyi harekete geçirme yeteneğindedirler (Akyıl, 2014; Topal, 1985).

2.1.2. Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler

Mikrobiyal kaynaklı endüstriyel enzimler, farklı kaynaklardan enzim eldesine göre (bitki-hayvan gibi) daha avantajlıdır. Hayvansal ve bitkisel kaynaklı dokuların miktarları kısıtlıdır. Bunlar kullanılabilir toprak alanına, işgücü gereksinimine, mevsim, iklim şartlarına bağlı olarak değişmekte ve elde edilen ürünün kalitesi de bu faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca bitkisel kaynaklardan ekonomik olarak üretilen enzim sayısı çok azdır. Mikrobiyal kaynaklardan üretilen enzim sayısı ve miktarı ise oldukça fazladır (2500 civarı). Uygun suş seçimi ile istenen enzimin çok yüksek verimde eldesi sağlanabilir. Mikroorganizmalardan enzim üretiminde, kullanılan fermantasyon

yöntemleri geliştirildikçe ve çevresel şartların kontrolü sağlandığı sürece verimlilik artış gösterecektir. Mikroorganizmalardan kaynak olarak yararlanılması, yeterli olmayan potansiyelin tamamlanması bakımından ilk ve en büyük avantajdır. Bir diğer büyük avantaj ise mikroorganizmalardan çok sayıda enzimin ekonomik olarak elde edilmesidir. İyi seçilmiş ve planlanmış organizma suşları ile herhangi bir enzim üretimi gerçekleştirilebilir. (Hammamchi, 2014; Topal, 1985).

Enzim üretiminde diğer kaynaklara göre mikroorganizmaların daha çok tercih edilmesinin nedenleri;

- Üretim maliyetlerinin düşük olması,
- Üretimleri için büyük alanlara gerek duyulmaması, mevsim ve iklim şartlarından etkilenmemeleri,
- Bitki ve hayvanlarla kıyaslandığında çok daha kısa sürede üremeleri,
- Enzim üretiminin kolay ve tahmin edilebilir olması,
- Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimlerin daha kararlı olması,
- Mikrobiyal enzim üretiminde kullanılan hammaddenin çeşitliliği ve kolay bulunabilirliği,
- Diğer kaynaklara göre daha sağlıklı bir canlıdan üretilmiş olması,
- Ekstraksiyon yöntemlerinin daha kolay olması olarak verilebilir (Marul, 2007).

Mikrobiyal kaynaklı enzimler; birçok bakteri, maya veya küflerden birçok farklı yöntemler ile hem ekonomik hem de endüstriyel boyutlarda elde edilebilmektedir. Enzimlerin mikroorganizmalardan üretilen miktarları, cins ve türlere göre değişkenlik göstermektedir. Dolayısıyla enzim üretiminde ilk olarak, üretilmek istenilen enzimi en çok hangi mikroorganizma türü veya suşunun ürettiği araştırılmalıdır. Bunun için doğadan tarama (screening) yöntemi ile mikroorganizma seçimi en çok tercih edilen yöntem olmaktadır. Önemli bir diğer konu ise bir mikroorganizmadan elde edilebilen belli bir enzim miktarı, mikroorganizmanın tüm yaşamı boyunca aynı olabileceği anlamına gelmemektedir. Zaman veya diğer çeşitli etkenlerle değişebilen mikrobiyal enzim üretme yeteneğinde olduğu unutulmamalıdır (Aslan & Sekin, 1985).

Aslında enzim teknolojisinin tarihi yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Fermantasyon ile enzimatik faaliyetler sonucu üretilen bira, şarap ve peynir gibi ürünler çok eski bir

geçmişe sahiptir. Bütün fermantasyonlar, canlı organizmaların metabolizmaları doğrultusunda gerçekleştirdikleri enzimatik değişim reaksiyonlarıdır. Çeşitli değişimlerden sorumlu olan biyokatalitik enzimlerin etkilerinin anlaşılmasından ve geliştirilmesinden sonra daha uygun, etkili ve ucuz enzim eldesi üzerine yoğunlaşılmıştır (Topal, 1985).

Ticari enzimler küf, maya veya bakterilerden olmak üzere üretim amacına yönelik olarak her üç mikroorganizma grubundan da üretilmektedir. *Bacillus subtilis* bakterisinden proteaz ve amilaz üretimi, *Saccharomyces cerevisiae* mayasından invertaz ve laktaz üretimi, *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* gibi küf türlerinden lipaz ve daha birçok enzim üretimi örnek olarak verilebilir. Günümüzde deterjan ve nişasta sanayii, endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmakla birlikte, ayrıca tekstil, ilaç, kâğıt üretimi, deri endüstrisi, kozmetik sektöründe ve biyosensör üretimi gibi çok çeşitli alanlarda da endüstriyel enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır (Şükran Şengel, 2007; Topal vd., 2000).

2.2. Funguslar ve Fungal Enzim Üretimi

2.2.1. Fungusların Genel Özellikleri

Funguslar çok geniş yaşama alanlarında bulunabilen mikroorganizma grubudur. Fungusların yaşamı, atmosferden sağlanan az miktarda oksijen ve karbondioksit molekülleri dışındaki bütün element ve bileşikler için ortam veya substrata bağlıdır. Funguslar bu bileşik ve elementlerden yararlanarak yaşamları ve hücreleri için gerekli enerjiyi sağlarlar. Ökaryotik mikroorganizma grubunu temsil eden mikrofunguslar, funguslar aleminin büyük bir kısmını oluşturmaktadırlar. Mikrofunguslar, ipliksi (flamentli) hiflerden meydana gelen çok hücreli küfler ve tek hücreli canlılar olan mayaları içermektedir. Çok sayıda mikrofungus türü vardır. Genellikle gelişmeleri için başlıca etkenler; sıcaklık, yeterli miktarda su veya rutubet, oksijen, karbondioksit, asitlik-alkalilik, hava basıncı, ışık ve radyasyondur. Fotosentetik olmayıp, beslenmelerini kemoheterotrofik olarak gerçekleştirmektedirler. Bu canlı grubunun büyük bir kısmı, karmaşık polimerik molekülleri emilebilir yapı haline getirmektedirler. Çok küçük parçalara ayırabilmek için ise birçok farklı hidrolitik enzim salgılama yeteneğindedirler.

Çoğu saprotiftir ve hayvan ölüleri, bitki artıkları gibi yapıları kullanmaktadırlar. Bazıları bitki ya da hayvan parazitidirler. Bir kısım mikrofunguslar ise farklı canlılarla simbiyotik ve farklı ilişkiler içinde bulunabilirler Gelişen teknoloji ile günümüzde endüstriyel amaçlı kullanımı az olan küflerin kullanım alanı giderek artmaktadır. Funguslar; Oomycota, Zygomycota, Ascomycota ve Basidiomycota olmak üzere dört bölümde toplanabilirler. (Arda, 1980; Çolakoğlu, 2001; Sümer, 2006; Waites, Morgan, Rockey & Higton, 2015).

2.2.2. Fungusların Biyoteknolojik Önemi ve Fungal Metabolitler

Geleneksel fermantasyonların endüstriyel işçileri olan funguslar, moleküler biyoteknolojinin ön saflarında yer almaktadır (Bennett, 1998).

Çok eski zamanlardan itibaren hem filamentöz funguslar hem de mayalar bira, şarap, ekmek ve peynir gibi ürünler üretmek için kullanılmıştır. Funguslar ayrıca birçok endüstriyel proseste de kullanılmaktadır. Özellikle enzim, vitamin, polisakkarit, alkol, pigment, lipid ve glikolipid üretimi gibi alanlarda funguslardan çokça faydalanılmaktadır. Bu ürünlerden bazıları ticari olarak, bazıları da biyoteknolojik süreçlerde kullanılmaktadır. Funguslardan üretilen sekonder metabolitlerden bir kısmı ise besin değeri yüksek ve sağlığa faydalı ürünlerdir (Adrio & Demain, 2003; Akkara & Tosun, 2014).

Fungusların bir grubu olan mayalar da fırıncılık ve fermantasyon endüstrisinin temelini oluşturmaktadır. Fırıncılık mayası üretimi, gıda amaçlı olarak bir mikroorganizmanın kullanımına en temel örnektir. Mayalar alkollü içki üretiminin de başlıca kullanılan kaynaklarındandır. Buna ek olarak, sitrik asidin endüstriyel olarak üretiminde ve bazı peynirlerin hazırlanmasında da küfler yaygın olarak kullanılır. Penisilin gibi birçok yararlı antibiyotiğin, bazı vitaminlerin (thiamin, biyotin vb); ergotamin, kortizon gibi önemli ilaçların üretiminde de mikrofunguslar kullanılmaktadırlar. Birçok enzim ve gibberellin gibi hormonlar da funguslardan yararlanılarak üretilmektedir. Funguslar ayrıca genetik çalışmalarda da kullanılmaktadırlar (Akkara & Tosun, 2014; Ghorai vd., 2009).

Funguslardan elde edilen primer ve sekonder olmak üzere iki farklı metabolit grubu vardır. Primer metabolitler doğal büyümede, gelişimde ve üremede doğrudan yer alan ve

üretilen bileşiklerdir, yaşam için üretilmeleri mutlaka zorunludur. Primer metabolitlere örnek olarak; amino asitler, nükleotidler, mikrobiyal hücreler, organik çözücüler (etil alkol), organik asitler (sitrik asit ve asetik asit) ve enzimler verilebilir (Çizelge 2.1). Mikrobiyal üremenin log fazında üretilen bu metabolitler birçok proseste kullanılmaktadır (Akkara & Tosun, 2014; Topal vd., 2000; Waites vd., 2015).

Çizelge 2.1. Mikrofunguslar tarafından üretilen primer metabolitler ve kullanım alanları (Waites vd., 2015; Aran, 2010)

Funguslar	**Primer Metabolitler**	**Kullanım Alanları**
Saccharomyces cerevisiae *Candida* türleri, *Mucor* türleri *Rhizopus* türleri *Aspergillus* türleri	Organik Çözücüler (Etil Alkol)	Gıda Endüstrisi (bira, şarap, ekmek üretimi), Kimya Endüstrisi (temizlik malzemesi üretimi), Yakıt Eldesi (biyoetanol üretimi)
Aspergillus niger	Organik Asitler (Sitrik Asit)	Gıda Endüstrisi (katkı maddesi olarak [E-330]), Kimya Endüstrisi (deterjan üretimi)
Aspergillus niger *Aspergillus oryzae* *Penicillium* türleri *Saccharomyces cerevisiae*	Enzimler (amilaz, pektinaz, invertaz)	Gıda Endüstrisi (şekerleme, nişasta ve fırın ve bira, meyve suyu ürünleri) Kimya Endüstrisi (deterjan üretimi)
Aspergillus türleri *Candida* türleri *Mucor* türleri *Penicillium* türleri *Rhizopus* türleri	Enzimler (proteaz)	Kimya Endüstrisi (deterjan üretimi) Tekstil Endüstrisi (derilerin yumuşatılması) Gıda Endüstrisi (etin yumuşatılması ve kemikten uzaklaştılmasında, peynir imalatında süt proteinini olgunlaştırmada)
Aspergillus türleri *Rhizopus* türleri *Penicillium* türleri *Mucor miehei* *Humicula languinosa*	Enzimler (Lipaz)	Kimya Endüstrisi (biyolojik deterjanlar) Tekstilde (deri işleme-yağın uzaklaştırılması, Gıda Endüstrisi (süt ve et ürünlerinde olgunlaşmasında)

Sekonder metabolitler log fazının sonuna doğru vaya durgun fazda oluşan ürünlerdir. Primer metabolizma ürünlerine göre iz miktarlarda sentezlenirler. Mikroorganizmaların büyüme ve üremesi için zorunlu değildirler. Sekonder metabolitler, primer metabolizma ürünlerinden sentezlenmektedirler. Funguslar

tarafından üretilen ve endüstriyel öneme sahip sekonder metabolitlere örnek olarak; alkaloidler, antibiyotikler, toksinler ve bazı pigmentler verilebilir (Çizelge 2.2) (Cantürk, 2015; Waites vd., 2015).

Çizelge 2.2. Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları

Fungus	**Sekonder Metabolit**	**Kullanım Alanları**
Aspergillus sydowi *Claviceps fusiformis* *Claviceps fusiformis* *Claviceps purpurea* *Claviceps purpurea* *Claviceps purpurea*	Alkaloidler (Agroklavin, Ergometrin, Liserjik Asit, Ergosin, Ergotamin vb.)	İlaç Endüstrisi (morfin üretiminde) Stephacidin B üretiminde
Penicillium chrysogenum *Cephalosporium acremonium*	Antibiyotikler (beta laktamlar; penisilinler ve sefalosporinler gibi geniş spektrumlu tetrasiklinler)	İlaç Endüstrisi

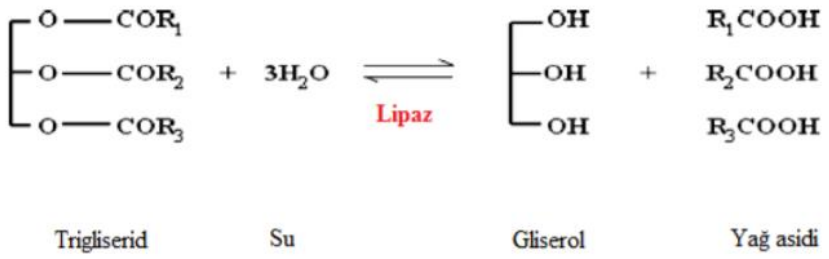
2.3. Lipazlar

2.3.1. Lipazların Genel Özellikleri ve Endüstriyel Kullanım Alanları

Lipazlar mikroorganizmalardan biyoteknolojik olarak elde edilebilen ve endüstride en yaygın kullanım alanına sahip önemli enzimlerden biridir. Normal şartlar altında yağları parçalayan ve yağ asitlerine ayırabilen hidrolazlar olarak tanımlanmalarına rağmen, susuz ortamda esterifikasyon ve transesterifikasyon tepkimelerinin aktivitelerini de arttırdığından biyodönüşüm ile ilgili çalışmalarda lipazların kullanımı oldukça fazla tercih edilmektedir (Özarslaner & Albayrak, 2013).

Lipazlar (E.C.3.1.1.3), triaçilgliserollerin sulu ortamda diaçilgliserin ve monoaçilgliserin, gliserin ve serbest yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen enzimler olarak tanımlanır (Şekil 1.5). Lipazların aktivitesini arttırdığı bu reaksiyonlar, genel olarak tersinirdir. Lipazların doğal substratları olan uzun zincirli yağ asitlerinin 6 gliserin esterleri suda oldukça az çözünürler. Lipazlar, enzimin çözündüğü sulu faz ve su ile karışmayan substrat fazı arasındaki ara yüzeyde ester bağlarının hidrolizini arttırır. Ayrıca lipazların suda çözünebilen esterlere karşı aktiviteleri oldukça da düşüktür. Lipazlar, enzim sınıflandırmasında sırası ile hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar

(E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) ve triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar (Özarslaner & Albayrak, 2013; Singh & Mukhopadhyay, 2012).



Şekil 2.1. Trigliseridin gliserol ve yağ asidine hidrolizi (Özarslaner & Albayrak, 2013).

Lipazlar aynı zamanda esterleşme, transesterleşme, interesterleşme, alkoloziz amiloziz ve asidoliziz gibi tepkimeleri de hızlandırmaktadır. Lipazlar, kabaca karboksilesterazlar ve gerçek lipazlar olmak üzere iki grupa ayrılabilir. Karboksilesterazlar, suda kısmen çözünebilen kısa zincirli karboksilik asit esterlerini parçalarken, gerçek lipazlar ise suda çözünmeyen uzun zincirli açilgliserolleri hidrolize etmektedir. Katalitik potansiyelleri çok yüksektir. Triaçilgliserollerin hidrolizi ile birlikte, yağ asitleri ve gliserolü oluşturan lipazlar, lipid ve su ara yüzeyinde aktif olurken, suda çözünmeyen uzun zincirli trigliseritlere karşı maksimum aktivite gösterirler (Akyıl, 2014).

Lipaz enzimlerinin substratları genel olarak bitkilerden veya hayvanlardan elde edilebilen yağlardır. Bunlara örnek olarak zeytinyağı, tereyağı ve sentetik gliseritler verilebilir. Herhangi bir yağın hidrolizlenebilme hızı kullanılan lipaz ile direkt ilişkilidir. Lipazların enzim aktivitesini ifade edebilmeleri için substratı olan yağın su içinde karışmış olması gerekir. Araştırılan ve çalışılan ya da endüstride kullanılabilen yağların yapısındaki yağ asitlerinin doymuşluk veya doymamışlık düzeyleri enzimlerin hidrolizi için büyük ölçüde önem teşkil etmektedir (Al-Taweel & Sungur, 1995).

Lipaz enziminin hidrolizleme aktivitelerini ölçerken 2 yöntem kullanılmaktadır. Bunlar titrimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerdir (Schmidt & Bornscheuer, 2005). Spektrofotometrik yöntemde lipaz aktivitesi ölçülürken, renk oluşturabilen substratlar arasında özellikle para-nitrofenil (PNP) esterleri çokça kullanılmaktadır (Furutani, Su, Ooshima & Kato, 1995). ParaNitrofenil esterlerinin enzim hidrolizine dayalı olarak

kullanılan spektrofotometrik yöntemin; kolay, kullanışlı ve güvenilirliğinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Gupta, Rathi, Gupta & Bradoo, 2003; Palomo vd., 2005).

Mikrobiyal lipazlar genel olarak birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Son yıllarda doğal ürünlerin gündeme gelmesi ile birlikte gıda sanayinde uygulanan kimyasal işlemlerin yerine enzimler kullanılmaya başlanmıştır. Lipaz enziminin yüksek katalitik aktivitesi, mükemmel bir kimyasal yapısının olması, çevre dostu oluşu, ılımlı ortam koşullarına sahip olması ve bölgesel seçiciliği nedeni ile önemli sanayi potansiyeli haline gelmiştir. Dolayısıyla gıda, kozmetik, deri, deterjan, kimya ve ilaç endüstrileri gibi alanlarda lipazlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Çizelge 2.3). Özel yağların sindirimine yardımcı olan ilaçların üretiminde, deri gibi ürünlerin üretiminde, emülgatörlerin sentezinde yüzey aktif maddelerin ortamdan uzaklaştırılmasında deterjan ve temizlik maddeleri gibi kimyasalların üretiminde sıkça kullanılmaktadırlar. Gıda sanayinde genel olarak; kakao yağı ve margarinde transesterifikasyon amacı ile, et ürünlerinden yağın uzaklaştırılması ve lezzet geliştirilmesinde, unlu mamullerde raf ömrünün uzatılmasında ve istenilen lezzetin elde edilmesinde, mayonez ve soslarda kalitenin arttırılmasında, içeceklerde aromanın zenginleştirilmesinde, ekmekte hacim arttırma ve ekmek içi yapısının iyileştirilmesinde, süt ürünlerinde tereyağının ve kremanın farklılaştırılmasında, peynirin pıhtılaştırmasını kolaylaştırmada ve peynir benzeri ürünlerin eldesinde kullanılmaları yanında ayrıca lipazla modifiye edilmiş kremalar kahve beyazlatıcılarına, şekerlemelere, çorbalara ve unlu mamullere süt tadı katması amacı ile ilave edilmektedir. Lipazlar aynı zamanda lipidlerin yıkımı için ihtiyaç duyulan ucuz ve çok faktörlü katalizörler şeklinde kullanılabilmektedirler (Akyıl, 2014; Aran, 2010; Öztürk, 2002).

Çizelge 2.3. Lipazların Endüstride Kullanım Alanlarından Bazıları (Gül, 2013).

Endüstriyel Alan	Reaksiyon	Ürün Uygulama Alanı
Süt	Süt, yağ ve peynir hidrolizi	Peynir ve tereyağı aroması
İçecekler	Aroma arttırıcı	Alkollü içkiler
Sağlıklı Yiyecekler	Transesterifikasyon	Sağlıklı yiyecekler
Et ve Balık	Aroma arttırıcı	Yağı uzaklaştırılmış et ve balık ürünleri
Katı ve Sıvı Yağlar	Transesterifikasyon Hidroliz	Kakao yağı ve margarin Gliserol, mono ve digliseritler
Kozmetik	Esterifikasyon	Deri ve güneş kremleri, güneş yağları
Temizlik	Biyoparçalayıcı suşları azaltmada	Giyeceklerin temizliği
Zirai Kimyasallar	Esterifikasyon	Herbisitler
Farmasötikler	Alkollerin hidrolizi	İlaç yapımında kullanılan ara ürünlerin üretimi
Petrol Endüstrisi	Transesterifikasyon	Biyodizel üretimi
Kirlilik Kontrolü	Hidroliz ve yağların transesterifikasyonu	Zararlı suşların uzaklaştırılması ve atık yağların hidrolizi

2.3.2. Lipaz Üretimi Üzerinde Etkili Olan Parametreler

Lipidler suda çözünmeyen maddelerdir. Bazıları hücre için besin görevi yapacaksa, emilimini arttırabilmek amacı ile hücrenin dışında daha polar yapılara uğramaları gerekmektedir. Bu sebepledir ki, lipazların birçoğu hücrenin dışına salgılanmaktadırlar. Lipazların sıcaklık ve lipid kaynakları, pH, azot, karbon, çalkalanma, çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi çok çeşitli çevresel faktörlerden etkilendikleri bilinmektedir. Lipaz üretiminde kullanılan ve lipazların substratı olan birçok lipidin, enzim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Lipaz üretimi ortamda bulunan trigliseridlerin varlığına bağlıdır. Lipaz aktivitesini arttıran diğer maddeler ise hidrolizlenebilen esterler, serbest yağ asitleri, safra tuzları ve gliseroldür (Elibol, Yaşa, Karaçancı, Çoban & Özsoy, 2008).

2.3.3. Lipazların Mikrobiyal Kaynakları

Lipaz kaynağı olarak bakteriler, mayalar ve küfler kullanılabilmektedir. Lipaz kaynağı olarak kullanılan bakterilerden bazıları *Bacillus, Staphylococcus, Lactobacillus, Micrococcus, Pseudomonas, Choromobacterium, Acinetobacter*; mayalardan bazıları ise; *Candida, Yarrowia, Saccharomyces, Torulaspora, Trichosporon*'dur. (Marul, 2007). Lipaz kaynağı olarak kullanılan küfler Çizelge 2.4.'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Lipaz kaynağı olarak kullanılan küfler

FUNGUSLAR	**REFERANS**
Acremonium murorum	(Cardenas vd., 2001)
Monascus mucoroides	(Cardenas vd., 2001)
Arthroderma ciferrii	(Cardenas vd., 2001)
Fusarium poae	(Cardenas vd., 2001)
Aspergillus niger	(Manoorkar & Gachande, 2015)
Aspergillus flavus	(Manoorkar & Gachande, 2015)
Aspergillus fumigatus	(Manoorkar & Gachande, 2015)
Aspergillus terreus	(Manoorkar & Gachande, 2015)
Aspergillus parasiticus	(Manoorkar & Gachande, 2015)
Alternaria alternata	(Manoorkar & Gachande, 2015)
Penicillium chrysogenum.	(Manoorkar & Gachande, 2015)
Penicillium aurantiogriseum	(Lima, Kieger, Mitchell & Fontana, 2004)
Rhizopus microsporus	(Iftikhar vd.,2011)
Trichophyton sp.	(Iftikhar vd.,2011)
Fusarium semitectum	(Iftikhar vd.,2011)
Penicillium candidum	(Pandey vd., 1999)
Penicillium citrinum	(Pandey vd., 1999)
Penicillium expansum	(Pandey vd., 1999)
Penicillium roquefortii	(Pandey vd., 1999)
Penicillium solitum	(Pandey vd., 1999)
Penicillium simplicissimum	(Pandey vd., 1999)
Penicillium cyclopium	(Pandey vd., 1999)
Penicillium urticae	(Pandey vd., 1999)
Rhizomucor miehei	(Pandey vd., 1999)
Penicillium camemberti	(Pandey vd., 1999)
Rhizopus sp.	(Pandey vd., 1999)
Rhizopus delemar	(Pandey vd., 1999)

Bu çalışmada fungal lipaz kaynağı olarak, Arda MYO Gıda İşleme Bölümü Küf Koleksiyonundan temin edilen *Penicillium aurantiogriseum* kullanılmıştır.

2.4. *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx 1901

Ascomycota bölümüne ait Trichocomaceae familyasında yer alan *Penicillium* cinsine ait yaygın bir türdür.

Makromorfolojileri; Czapek Yeast Autolysate Agarda (CYA) 25 °C'de mavi yeşilden gri yeşile değişen veya koyu mat yeşil renklerde konidiler üreterek oldukça sınırlı bir üreme göstermektedir (7 gün sonra 11-32 mm çapında). Koloniler granüllü veya fasikulat olup açık renklerden kahverengiye kadar değişebilen eksuda oluşumu gözlenmektedir. Koloni tersi besiyerine de diffüze olabilen turuncu, kahverengi, sarı tonlarındadır. Uzun süre besiyerinde muhafaza edilen suşlar tersten sarı-turuncu renge sahip olur. Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerinde konidiler yoğun mavi yeşil renktedir ve velutinöz koloniler, tersten bakıldığında genellikle agara diffüze olan sarı renge sahiptir (Şekil 2.2). Yeast Extract Sucrose Agarda (YES) sporulasyon derecesi değişir, tersten bakıldığında sarı tonlarındadır (Şekil 2.3). Koloniler orta derecede hızlı büyümektedir (7 gün sonra 24-46 mm çapında). Creatine Sucrose Agarda (CREA) büyüme zayıf fakat asit üretimi güçlüdür (birkaç izolatta zayıf asit üretimi).

Mikromorfolojileri; konidiyoforlar renksiz, tümü baskılanmış tervertisillat penisilya yapısına sahiptir, konidiyofor düz duvarlı veya hafifçe pürüzlü, metulalar silindirik, 10-13 x 2.8-3.5 µm boyutunda ve 5-8 fiyalid içermektedir. Fiyalidler silindirik uçlu ve belirgin bir boyun kısmına sahiptir. Konidiler yuvarlak veya yuvarlağa yakın şekillerde, 3-4 x 2.5-3.5 µm boyutlarında, turkuaz renkli ve düzdür (Şekil 2.4).

Moleküler markerlar; β-tubulin: AY 674296; AY674297; AY674298.

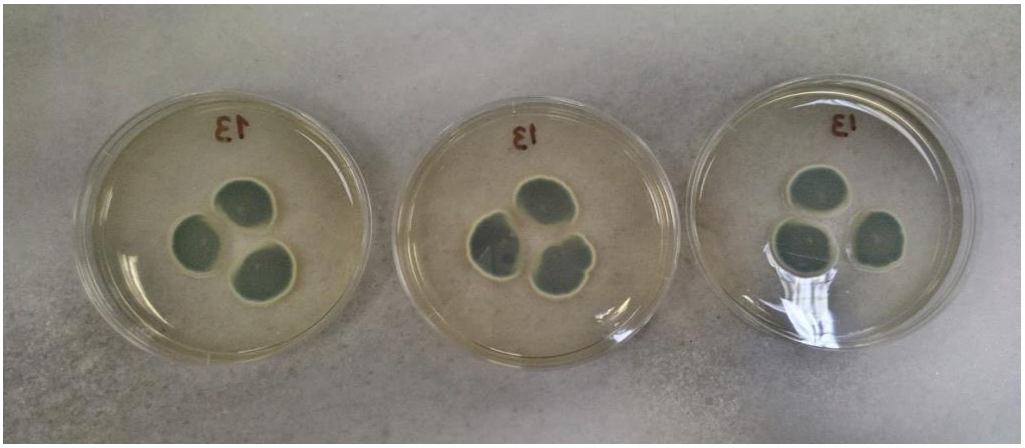
Kimyasal markerlar; anasin, aurantiamin, aurantin, dehidropenisillik asit, penisillik asit, nefrotoksik glikopeptitler, psörotin, terrestrik asit, verrukosidin, viridikatik asit.

Ürettiği önemli mikotoksinler; dehidropenisillik asit, nefrotoksik glikopeptitler, penisillik asit, verrukosidin.

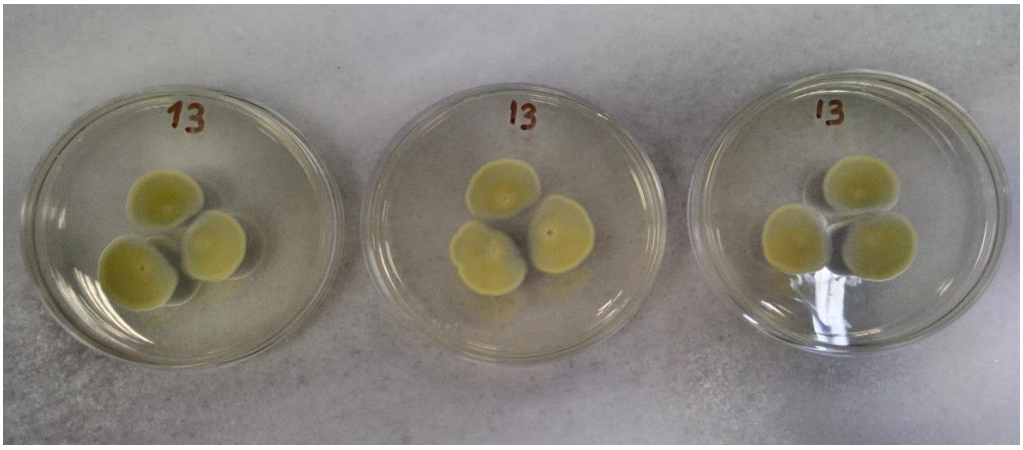
Habitat ve yayılış; Gıdalar. *P. aurantiogriseum* ılıman bölgelerde yaygın bir türdür. Tahıllar, tahıl bazlı yemler, soğan, sarımsak, bezelye ve toprakta bulunur.

Fizyolojisi; *P. aurantiogriseum* halotoleranttır. Düşük sıcaklıklarda iyi gelişir, 30 ºC'de oldukça iyi büyür ancak 37 ºC'de üreyemez. Düşük pH değerlerini ve oldukça

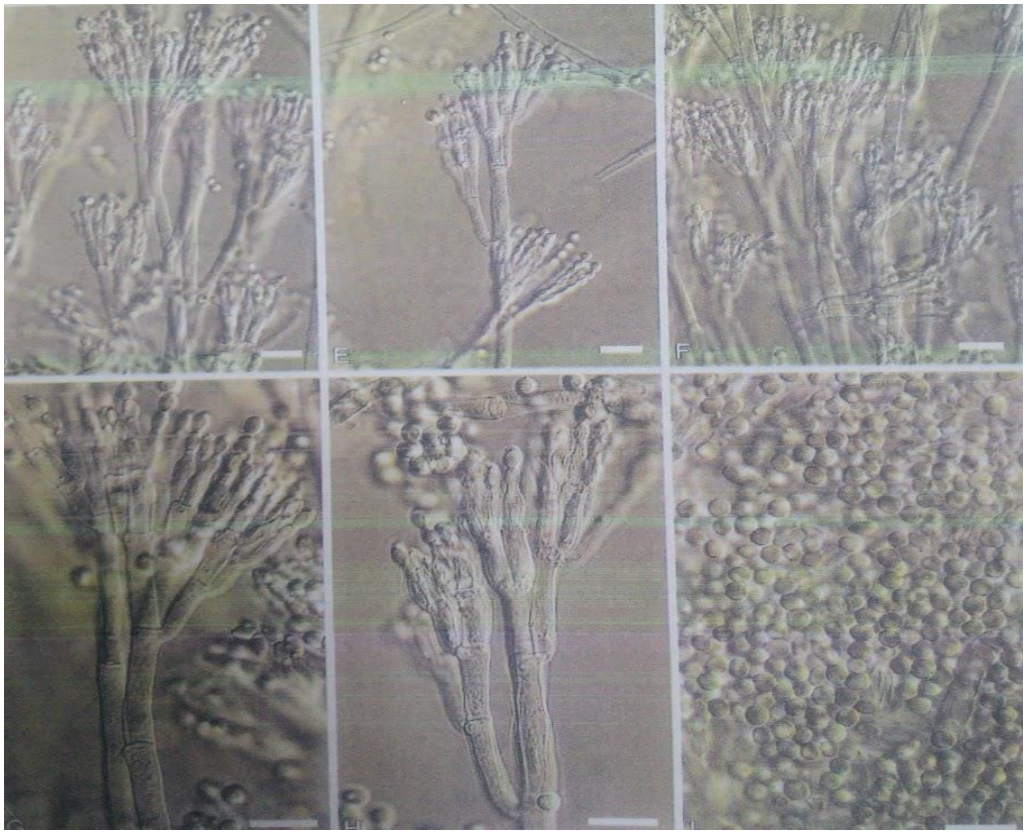
düşük su aktivitelerini tolere edebilir (Samson, Houbraken, Thrane, Frisvad & Andersen, 2010).



Şekil 2.2. *Penicillium aurantiogriseum* (PDA) besiyerinde 7 günlük koloni görünümü



Şekil 2.3. *Penicillium aurantiogriseum* (PDA) besiyerinde 7 günlük koloni görünümü (alttan)



Şekil 2.4. *Penicillium aurantiogriseum*'un mikroskobik görünümü (Samson vd., 2010)

2.5. Katı Substrat Fermentasyonu (SSF)

Katı substrat fermentasyonu, nemli ve katı substratta mikroorganizmanın (genellikle funguslar için) büyütülmesini içeren, tıbbi ilaç, enzim, hayvan yemi, fermente yiyecek üretimi için kullanılan bir üretim işlemidir. SSF, hem karbon hem de enerji kaynağı olarak kullanılabilen inert taşıyıcılar veya çözünmeyen substratlar üzerinde nemli katı destekler üzerindeki mikroorganizmaların yetiştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. SSF'nin amacı, çözünmeyen substrat ile birbirlerine sıkıca bağlanabilen bakteri veya mantar kültürünü oluşturmak ve böylece fermentasyon için yüksek substrat konsantrasyonu elde etmektir. Kullanılan katı substrat çözünebilir bir yapıda olmak zorunda değildir. Mikroorganizma bu substratı karbon kaynağı veya enerji kaynağı olarak kullanabilir. Fermantasyon, susuz ortamda veya az su olan ya da nemli ortamda meydana gelir. Dolayısı ile bu ortam, mikroorganizmanın kendi doğal büyüme ortamına yakın olur (Hölker, Höfer & Lenz, 2004; Yarkın, 2007).

SSF'de gereken su miktarı, kullanılan substrata bağlı olarak emilir ve büyüme için çok büyük önem taşır. Bu şekilde mikroorganizmanın gelişmesi için şişkinlik derecesi ile gaz hacmini optimum düzeye getirerek gereken oksijen miktarı karşılanmış olur. Genellikle SSF yöntemi, katı substrat ile sıvı faz ayrılmadan substratın doygunluğa ulaşması ile diğer yöntemlerden ayırt edilir (Yarkın, 2007).

SSF uygulamaları genel olarak; katı atıklardan doğal gübre ve hayvan yemi üretiminde, zehirli bileşenleri iyileştirmede, sanayi atıklarının çevreye verdiği toksik etkileri de kapsayan çevresel tedbir uygulamaları ve doğal atıkların kullanılabilirliğinde, fermente gıda ürün kalitesini iyileştirmede, enzim üretimi gibi bazı primer metabolitlerin üretiminde olmak üzere farklı alanlarda yer almaktadır. Zengin organik doğalarından dolayı tarımsal atıklar (buğday kepeği gibi), katma değerli ürünlerin üretiminde mikrobiyal işlemler için ideal substratlar olarak kullanılabilir. Katı hal fermantasyonu çoğunlukla biyolojik dönüştürme işlemleri için kullanılmıştır. Biyolojik işlemlerde tarımsal sanayi kalıntılarının uygulanması bir yandan alternatif substratlar sağlarken, diğer yandan kirlilik problemlerinin çözülmesine yardımcı olur, aksi takdirde atılmalarına neden olabilir (Pandey vd., 2000; Yarkın, 2007).

Doğal katı substrat, SSF'de kritik faktörlerden biridir. Substratın seçimi ile ilgili olarak iki önemli husus olabilir; ilki, miktarının ve substrat içeriğinin madde üretimine uygun olmasıdır. İkincisi, uygun bir alt tabakadan belirli bir ürün üretme hedefi ile ilişkilidir. Bu durumda, çeşitli alt tabakaları taramak ve en uygun olanı seçmek gerekli olacaktır. İdeal bir katı substrat, uygun işlevler için mikroorganizmaya ihtiyacı olan tüm besin maddelerini sağlamalıdır. Her kullanılan katı substrat, mikroorganizmanın ihtiyacına yönelik olmayabilir. Eğer katı substratın mikroorganizma için yeterli besin maddelerini sağlayamadığı eksiklikleri var ise SSF ortamına sonradan besin ilave edilerek de bu yöntem uygulanabilir (Pandey, 2003; Yarkın, 2007).

Bakteriler, mayalar ve küfler katı substratlar üzerinde büyüyebilir ve SSF işlemlerinde kullanılabilirler. Filamentöz funguslar, SSF için en uygun mikroorganizmalardır. Fungal büyümenin hifsel yapısı, düşük su aktivitesine ve yüksek ozmotik basınç koşullarına iyi toleransları, mantarları katı substratların biyo-dönüştürülmesi için hazırlanan doğal mikroflorada avantajlı kılar (Balkan & Ertan, 2007).

SSF yöntemini oluşturan aşamaları etkileyen faktörler arasında uygun türün seçimi, üretimi yapılacak işlemin çevresel veya kimyasal parametrelerinin optimum şartlarının sağlanması yer almaktadır. Ayrıca belirli bir alt tabakadaki mikrobiyal büyüme ve aktivite için parçacık boyutu, nem düzeyi ve su aktivitesi en kritik noktalardandır. Genellikle, daha küçük alt tabaka parçacıkları, mikrobiyal üreme için daha büyük yüzey alanı sağlayacaktır. Aynı zamanda daha büyük parçacıklar daha iyi solunum ve havalandırma efekti sağlar (partikül aralıklarının artması nedeniyle) ancak büyüme için sınırlı yüzey oluşturur. Bu nedenle, belirli bir süreç için optimum parçacık boyutuna ulaşılması gerekecektir (Pandey vd., 2000).

SSF ve SmF yöntemini karşılaştıracak olursak SSF çok daha fazla avantaja sahiptir. SSF'in avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırılması Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. SSF'nin avantajları ve dezavantajları (Karataş, 2008).

SSF'in avantajları	**SSF'in dezavantajları**
- Düşük maliyet - Daha yüksek üretim kapasitesi - Maksimum iyi oksijen transferi - Minimum enerji ihtiyacı - Enerji ve maliyetin azaltılması - Basit teknoloji - Deneysel problemlerin az olması - Doğal yaşam ortamı olması	- pH, sıcaklık, nem, aşı ve besin miktarı gibi parametrelerin kontrol güçlüğü - Reaksiyonun denge güçlüğü - Etkin karışım düşüklüğü - Sıcaklık artışı - Daha yüksek saf olmayan kirli maddelerin üretimi

Ticari enzim üretimine ihtiyacın artması ile SSF günümüzde çok çeşitli tarımsal kaynaklardan meydana gelen atıklar ile yapılmaya başlanmıştır. Fiyat ve ulaşılabilirlilik önemli ölçütlerdir ve dolayısıyla SSF sürecinde önemli rol oynarlar. SSF genellikle daha basit aşamaları gerektirir ve SmF'den daha az enerji ihtiyacına gereksinim duyar (Karataş, 2008).

SSF yöntemi kullanılarak lipaz enziminin üretilmesine uygun olan mikrofunguslardan bazıları: *Candida, Aspergillus, Rhizopus, Neurospora, Penicillium ve Mucor*'dur (Pandey vd., 2000).

2.5.1. SSF Yönteminde Substratlar

Dünyadaki nüfusun giderek artması ile birlikte tüketim miktarı da artmaktadır. Buna bağlı olarak artan gıda, tekstil, ilaç vb. gibi alanlarda oluşan atıklar da önemli bir problem haline gelmiştir. Atık miktarını azaltmak için ise en az düzeyde atık üretecek yöntemlerin oluşturulması ve atıkların geri dönüşümlerinin yapılması gerektirmektedir (Yaman, 2012). Ülkemizin tarımsal üretim potansiyeli yüksek olduğundan, bitkisel atıkların yeniden değerlendirilmesi ve geri dönüşümü çok büyük önem arz etmektedir. Ayrıca gıda, ilaç, kozmetik ve tekstil endüstrisinde önemsiz olan atıklar da çeşitli alanlarda hammadde olarak kullanılabilmektedir (Çerçioğlu, 2011; Çıtak, Sönmez & Öktüren, 2006; Yaman, 2012). Biyoteknolojik süreçlerde bu atıkların substrat olarak kullanımına; meyve ve sebze atıklarından etil alkol, metan, laktik asit, sitrik asit, sürfektan, mantarlar, enzimler, gıda bileşenleri ve özellikle aroma maddeleri üretimi, yağ endüstrisinden meydana gelen birçok atıklardan (katı ve sıvı atıklar) biyoteknolojik geri-dönüşüm yolu ile değerli ürünler (örnek: δ- ve γ-dekalakton), biyodizel ve enzim (örneğin ot, mısır koçanı, ayçiçeği sapı ve buğday samanı kullanılarak ksilinaz enzimi eldesi) üretimi, şeker fabrika atığı olan melastan etanol, ekmek mayası üretimi, tahıl endüstrisinden elde edilen atıklardan biyoteknolojik üretim yolu ile etil alkol, tek hücre proteini (THP), laktik asit üretimi örnek olarak verilebilir (Behçet, Aydın & Çakmak, 2012; Kocabaş, Gümüştaş & Gönek, 2017; Şener & Ünal, 2008)

Bizim çalışmamızda *Penicillium aurantiogriseum*'dan lipaz elde edebilmek amacı ile substrat olarak tarımsal atıklardan; ayçiçeği küspesi, mısır küspesi ve buğday kepeği kullanılmıştır.

BÖLÜM 3

KAYNAK ARAŞTIRMASI

Roberts (1987), ayçiçeği tohumlarından extraselüler lipaz enzimi üreten fungus türlerini izole ederek; *Aspergillus, Eurotium, Penicillium, Rhizopus* türleri ve daha birçok türde lipaz aktivitesini göstermiştir. Ayrıca parametrelerin optimizasyonu çalışmalarını da elde ettikleri lipaz aktivitesini arttırmak amacı ile yapmıştır.

Ferrer, Jplou, Nuero, Reyesve ve Ballesteros (2000), *Penicillium chrysogenum* ile yaptıkları çalışmada bu fungustan lipaz üretiminde optimum pH'nın 7.9 ile 8,1 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Cardenas vd. (2001), yaptıkları çalışmada, substrat olarak zeytinyağı kullanarak fungal ve maya lipazları için tribütirinde aktivite tayini yapmışlardır. *Aspergillus, Fusarium, Penicillium* türlerine ait enzim aktiviteleri elde etmişlerdir.

Maia (2001), *Fusarium solani* suşunu kullanarak kesikli fermantasyon yöntemi ile lipaz aktivitesini elde etmeyi amaçlamıştır. Substrat olarak mısır, hindistan cevizi, zeytin, palmiye ve susam yağı kullanmıştır. Tüm substratlarda kayda değer bir aktivite elde etmiştir.

Vanot, Deyris, Guilhem, Luu ve Comeau (2001)'nun *Penicillium cyclopium* ile yaptıkları lipaz üretimi çalışmasında, *Penicillium cyclopium* için optimum pH'nın 5.5 olduğu gösterilmiştir. Ayrıca enzim üretimi üzerine kültür koşullarının önemli olduğunu ve optimize edilmesi gerektiğini söylemişlerdir.

Orhan (2002), *Rhizopus arrhizus* ile SSF yöntemini kullanarak yaptığı lipaz üretimi çalışmasında kayda değer aktivite gözlemlemiştir. Ayçiçeği küspesini besiyeri olarak kullanmış ve lipaz üretiminin arttığını bildirmiştir.

Lima vd. (2003), yaptıkları çalışmada *Penicillium aurantiogriseum*'un farklı karbon ve azot kaynaklarında üretimini gerçekleştirerek enzim aktivitelerine bakmışlardır. Zeytin, mısır, soya ve ayçiçeği yağları karbon kaynakları olarak test edilmiş olup, %1 zeytinyağı, bu çalışmada elde edilen en yüksek enzim üretiminin belirlendiği karbon kaynağı olmuştur. Enzim üretiminin, 26 ila 32 °C arasında test edildiği aralıkta 29 °C'de en iyi aktivite gözlemlenmiştir.

Cihangir ve Sarıkaya (2004), topraktan izole ettikleri mantarları ekstraselüler lipolitik aktivite açısından taramışlardır. En yüksek lipaz üretimini *Aspergillus sp.*'de kaydetmişlerdir. *Aspergillus sp.*'den hücre dışı lipazın büyümesini ve üretimini belirleyen bazı optimal parametreleri araştırılmışlardır. En iyi lipaz üretimi, kültürün pH: 5.5 ve 30 °C'de inkübasyonunun 4. gününde olduğunu bildirmişlerdir. Ortam, karbon kaynağı olarak zeytinyağı ve azot kaynağı olarak pepton kullanılarak hazırlandığında, daha iyi lipaz üretimi elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Alkan, Baysal, Doğru ve Uyar (2005)'ın yapmış oldukları ekstrasellülar lipaz enzimi üretimi çalışmasında, kavun kabuğu substrat olarak kullanılarak *Bacillus coagulans* bakterisinden lipaz üretilmiş ve bazı optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzimin en iyi üretildiği süre 24 saat, optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla pH: 7.0 ve 37 °C olarak bulunmuştur. %2 zeytinyağının enzim üretimini artırdığı gözlenmiş, farklı azot, karbon kaynakları ve surfaktantların etkisi incelenmiştir. Sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum nitrat (NH_4NO_3), nişasta ve maltoz enzim üretimini artırmıştır. Metal iyonların etkisi sonucu magnezyum ve nikelin enzimi sırasıyla %32 ve %26 düzeyinde inhibe ettiği, kalsiyum iyonlarının ise enzim aktivitesini %105 artırdığı tespit edilmiştir.

Kempka vd. (2008), yaptıkları çalışmada substrat olarak soya fasulyesi kepeği kullanarak *Penicillium verrucosum* tarafından elde edilen ham enzimatik ekstraktların lipaz üretimi ve kısmi karakterizasyonunu araştırmışlardır. Sıcaklığın enzim üretimini etkileyen ana faktörlerden olduğunu belirtmişlerdir. Optimize edilmiş üretim sıcaklığı 27.5 °C olarak tespit edilmiştir.

Rajan ve Nair (2011), yeni bir izolat olan *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657'den alkali lipaz üretimi için SSF ve SmF'nin substrat olarak yağsız pirinç kepeği kullanılarak karşılaştırmalı bir çalışmasını yapmışlardır. İnkübasyon süresi, başlangıç pH'si ve inkübasyon sıcaklığı gibi farklı işlem parametreleri, alkali lipazın maksimum üretimi elde etmek için optimize edilmiştir. Maksimum enzim üretimi (8.13 U / mL), 30 °C'de olduğunu bildirmişlerdir.

Iftikhar vd. (2011), Faisalabad'ın çeşitli bölgelerinden elde edilen fungal suşlarla hücre dışı lipazları üretmeyi hedeflemişlerdir. *Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum, Rhizopus microsporus, Mucor mucedo, Alternaria alternata, Trichophyton sp., Fusarium semitectum, Curvularia sp., Aspergillus flavus, Mucor* sp. ve tanımlayamadıkları birkaç türden ekstraselüler lipaz üretimi gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Lipaz üretimini gerçekleştiren suşlar için pH, sıcaklık, inokulum büyüklüğü, substrat miktarı ve inkübasyon süresi gibi farklı çevresel parametreler optimize edilmiştir. En iyi lipaz üretiminin *Trichophyton sp*. tarafından 48 saatte, pH:7'de ve 30 °C'de olduğunu tespit etmişlerdir.

Malilas vd. (2013), *Penicillium camembertii* KCCM 11268 ile yaptıkları çalışmada SSF ortamında lipaz üretimi ve optimizasyonunu araştırmışlardır. *P. camembertii* KCCM 11268 lipaz üretimi için substrat olarak buğday kepeği kullanılarak SSF'de yetiştirilmiştir. Optimum aşı miktarı 10^5 olarak bildirilmiştir.

Oliveira vd. (2013), *Fusarium sp*. ile üretilen lipazlar için fermantasyon koşullarını karşılaştırmışlardır. Krema, keten tohumu, mısır, palmiye, zeytin, soya fasulyesi ve tavuk yağını SmF ve SSF ortamlarında ayrı ayrı kullanarak *Gibberella fujikuroi* suşunu yetiştirmişlerdir. En iyi aktiviteyi SSF ile krema yağını kullandıkları ortamdan elde etmişlerdir.

Akyıl (2014), yaptığı çalışmada, topraktan izole edilmiş yeni bir fungal kaynaktan lipaz üretimini ve optimizasyonunu amaçlamıştır. Lipaz kaynağı olarak, *Trichoderma citrinoviride* olduğu saptanan fungus kullanılmıştır. Lipaz üretiminde önem taşıyan üretim ortamı koşulları ile reaksiyon ortam parametreleri incelemiştir. Çeşitli karbon ve azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisini araştırmış ve lipaz üretimi için en uygun karbon kaynağının glukoz en uygun azot kaynağının ise pepton olduğunu tespit etmiştir. Karbon kaynağı olarak kullanılan yağlardan ise en iyi aktivitenin zeytinyağı kullanılan

ortamda olduğunu belirtmiştir. Lipaz üretiminde en uygun pH: 5.5, sıcaklık 30 °C ve inkübasyon süresini 4 gün olarak bildirmiştir.

Keklikçioğlu, Çakmak ve Açıkel (2015), *Candida utilis* mayasıyla yaptıkları lipaz üretimi ve optimizasyonu çalışmalarında, en iyi aktiviteyi pH:4'te, karbon kaynağı olarak kullanılan bitkisel yağlardan ise en iyi aktiviteyi soya yağından elde etmişlerdir. Ayrıca metal iyonlarının da farklı etkileri olduğunu bildirmişlerdir.

Manoorkar ve Gachande (2015), lipaz enzim üretimi ve enzim üretimine fiziksel faktörlerin etkisi çalışmalarında; ayçiçeği küspesi ve soya yağını substrat olarak kullanarak *Aspergillus niger, A. flavus, A. fumigatus, A. terreus, A. parasiticus, Fusarium moniliformae, F. oxysporum, Alternaria alternata, Curvularia lunata* ve *Penicillium chrysogenum* cinslerinde lipaz aktivitesi gözlemlemişlerdir. Ayrıca lipaz üretimi üzerine pH, sıcaklık ve inkübasyon sürelerinin de etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Rodrigues vd. (2016), Brezilya'daki Espirito Santo Federal Üniversitesi'ndeki bir restoranın yağ atıklarından *Aspergillus, Beauveria, Botrytis, Cladosporium, Colletotrichum, Fusarium, Geotrichum, Penicillium, Rhizomucor* ve *Verticillium* cinslerine ait olan 20 filamentöz fungus izole etmişlerdir. Fungal lipaz aktivitesi ve biyokütle üretimi ölçülmüştür. En iyi extraselüler lipaz aktivitesi, *Penicillium* sp.'den elde edilmiştir.

Yapılan literatür taramasında fungal lipaz üretiminin endüstride kullanımına olanak sağlanması açısından temel bilgilerin araştırılması hedeflenmiştir. Bunun yanında endüstriyel atıkların substrat olarak kullanılması konusunda literatür bilgisi araştırılmıştır. Değerlendirilen literatürler doğrultusunda; lipaz enzimi üreten yeni mikrofungus suşlarının elde edilebileceği, bununla birlikte lipaz üretiminde kullanılan substrat kaynaklarının denenebilirliği ve enzim üretiminde katı atıkların kullanılabilirliğini SSF ile arttırmaya yönelik bir gereksinim olduğu gibi varsayımlara ulaşılmıştır. Yapılacak çalışmada incelenen literatürdeki çalışmalardan yararlanılarak, yeni fungal lipaz kaynaklarının bulunabilmesi ve atıkların substrat kaynağı olarak kullanımının arttırılması ile daha ucuz, çevreye yararlı bir sonuç elde edilmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM 4

MATERYAL VE METOD

4.1. Ekstraselüler Lipaz Aktivitesi Açısından Mikrofungusların Taranması

Bu çalışmada, Trakya Üniversitesi Arda Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü mikrofungus koleksiyonunda yer alan 20 cinse *(Alternaria, Aspergillus, Arthrinium, Acremonium, Beuveria, Cladosporium, Cochliobolus, Dendryphyon, Fusarium, Geotrichum, Gibberella, Penicillium, Phoma, Ramichloridium, Rhizopus, Scopulariopsis, Talaromyces, Trichothecium, Trichoderma, Verticillium)* ait 62 tür olmak üzere, 85 adet mikrofungus suşu (Şekil 4.1) ekstraselüler lipaz üretme yetenekleri açısından taranmıştır.



Şekil 4.1. Tarama yapılan mikrofungus suşlarının stok kültürleri

4.1.1. Kullanılan Tarama Ortamı

Kültürlerdeki lipolitik aktiviteyi test edebilmek için tribütirinli lipaz besiyeri hazırlanmıştır. Besiyerinin içeriği şu şekildedir:

800 ml distile su,

2 gr pepton from meat,

2 gr pepton from kazein,

2.4 gr yeast extract,

9.6 gr agar agar

Tüm içerik bir araya getirildikten sonra ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar tutulmuştur. Daha sonra 121˚C'de 15 dk süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri yaklaşık 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine aseptik koşullarda 0.8 ml tribütirin ilave edilmiştir. Pipet yardımı ile daha

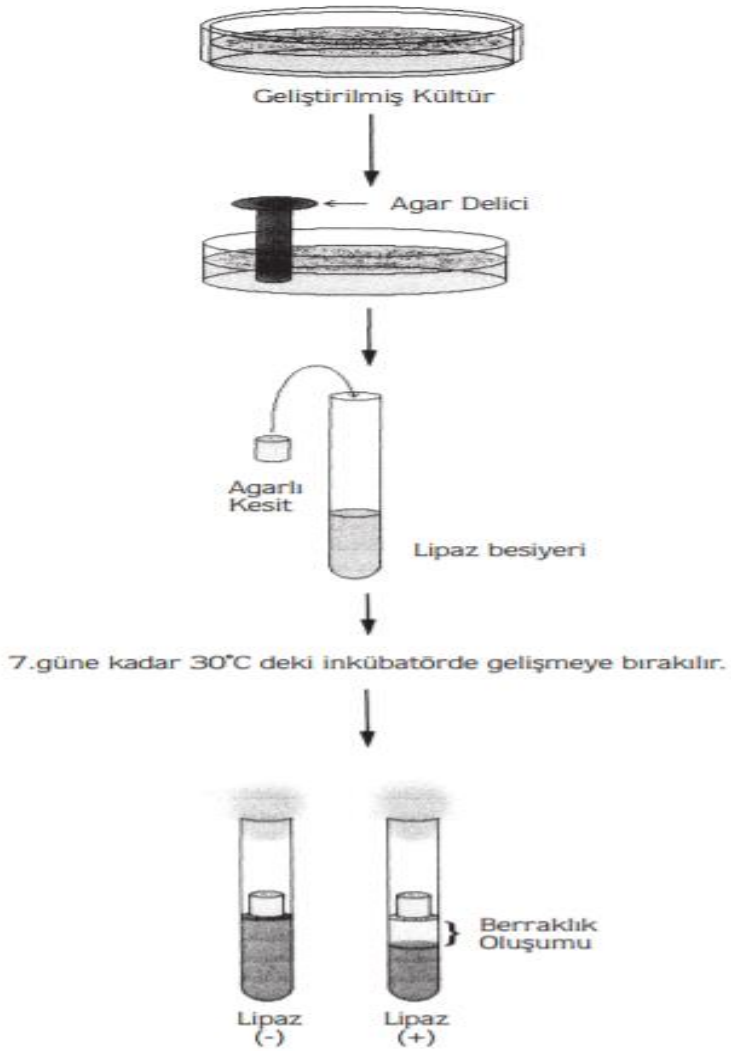
önceden steril edilmiş cam tüplere 7'şer ml olarak dağıtılmıştır. Dik olarak dondurulmaya bırakılmıştır. (Topal vd., 2000).

4.1.2. Mikrofungusların Tarama Ortamına Ekimi ve Üretilmesi

Potato Dextrose Agar (PDA) besiyeri bulunan petri kaplarında 25 °C'de 7 gün inkübe edilmiş test kültürlerinden steril mantar delici yardımı ile kesitler alınmış (Şekil 4.2) ve tüplerde hazırlanmış olan tribütirinli lipaz besiyerinin üzerine bırakılmıştır. Besiyerleri bu şekilde 25 °C'de 7 güne kadar inkübe edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Besiyerlerinden mantar delici ile kesit alma



Şekil 4.3. Lipaz aktivitesinin analiz basamakları (Topal vd., 2000).

4.1.3. En İyi Lipolitik Aktivite Gösteren Mikrofungus Suşunun Belirlenmesi

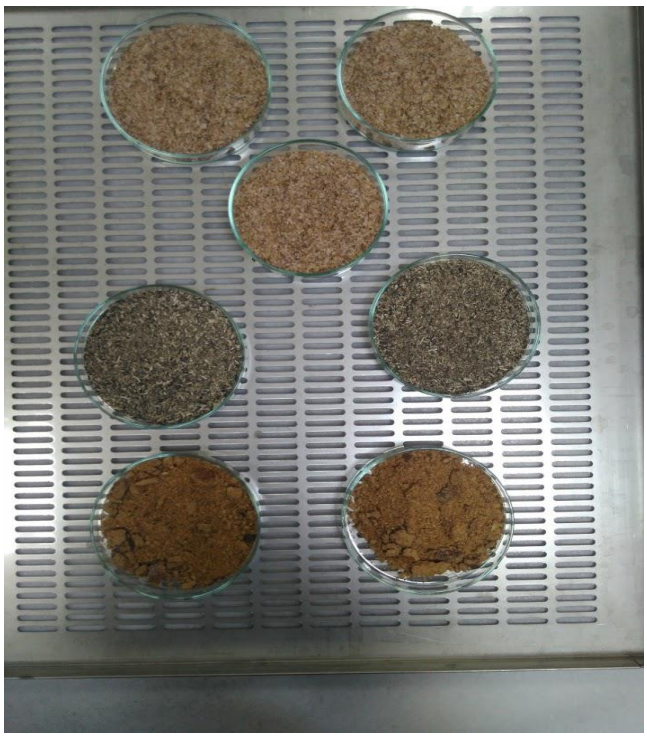
İnkübasyon süresi sonunda mikrofungusların tribütirinli besiyerinde berraklık oluşturmalarına göre değerlendirmeleri yapılmıştır. Lipazlar tarafından tibütirinin hidrolize edilmesi sonucu oluşan berraklık lipaz (+), besiyerinde değişiklik meydana getirmeyenler ise lipaz (-) olarak kaydedilmiştir. Lipolitik aktivitelerinin değerlendirilmesi için berraklığın derinliği 3. günden itibaren cetvelle ölçülmüştür. Ölçme işlemi 7. güne kadar yapılmıştır (Topal vd., 2000). En yüksek aktivite gösteren mikrofungus ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.1.4. Mikrofungusların Üretimi ve Saklanması

Tribütirinli besiyerinde en iyi aktivite gösteren mikrofungus kültürleri tekrar tekrar pasaj yapmanın mikrofunguslar üzerine olumsuz etkilerinden kaçınmak ve tüm çalışma boyunca aynı kültürden çalışmak üzere çok sayıda yatık agarlı PDA besiyerlerine aktarılmış, bu kültürler stok kültür olarak kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında tutulmuştur. Ekim için 7 günlük fungus kültürleri kullanılmıştır. (Balkan, 2008).

4.2. SSF Kültür Ortamının Hazırlanması

SSF kültür ortamını hazırlamak için substrat olarak buğday kepeği, mısır küspesi ve ayçiçeği küspesi kullanılmıştır. Bu substratlar pastör fırınında 80º C'de 24 saat kurutulduktan sonra (Şekil 4.4), 250 ml'lik erlen mayerlere 5'er gr olacak şekilde konulmuştur. Distile su ile besiyerinin nem içeriği ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk süre ile sterilizasyon sağlanmıştır. (Şekil 4.5) (Balkan, 2008).



Şekil 4.4. 80 °C'de 24 saat kurutululan ayçiçeği küspesi, mısır küspesi ve buğday kepeği

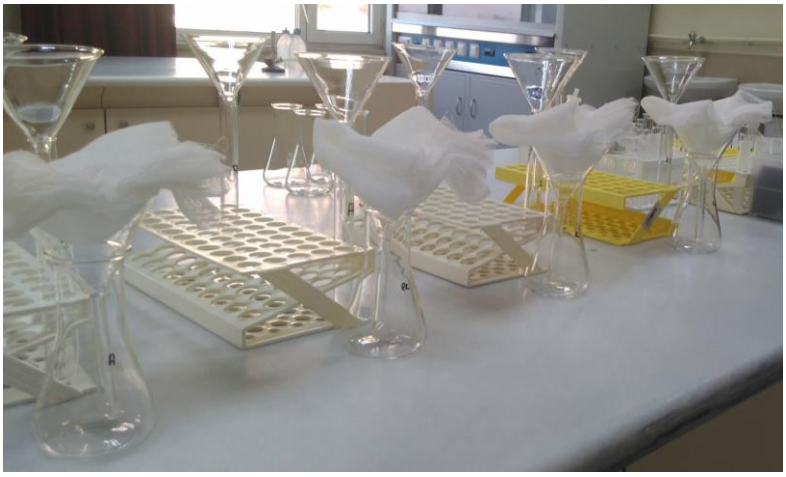


Şekil 4.5. Sterilize edilmiş SSF kültür ortamları

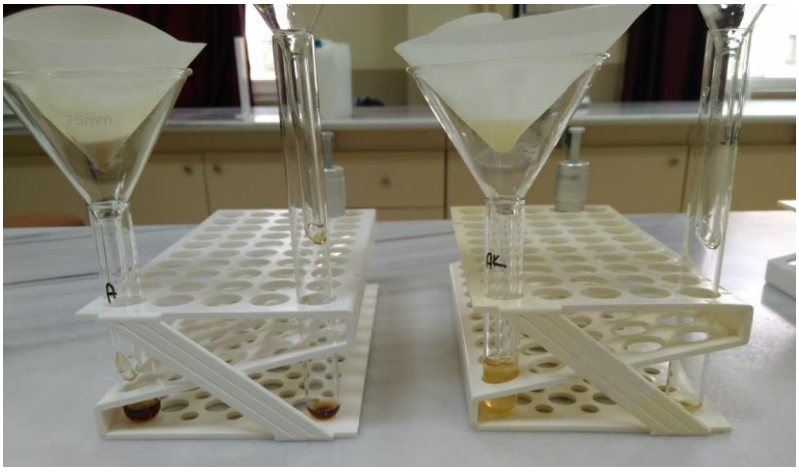
4.2.1. SSF Kültür Ortamına Mikrofungusların Ekimi, Üretimi ve Lipaz Eldesi

Tribütirinli lipaz besiyerinde en iyi aktivite gösteren mikrofungusların PDA besiyerlerindeki 7 günlük kültürleri steril distile su ile yıkanarak 4 kat steril gazlı bezden geçirilmiş ve spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Thoma lamı ile spor süspansiyonları mililitrede 1×10^6 spor içerecek şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonları SSF ortamına 1ml olarak aktarılmış ve kültür ortamı 25 °C' de 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerine 50 ml distile su eklenerek 200 rpm'lik çalkalamalı etüvde 60 dk çalkalanmıştır. 60 dk sonunda içerik ilk önce steril gazlı bezden daha sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülmüştür. Elde edilen süzüntü kaba enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 4.6 ve 4.7) (Balkan, 2008).



Şekil 4.6. Kaba enzim kaynağı elde etme hazırlıkları



Şekil 4.7. Sırası ile gazlı bez ve filtre kağıdından geçirilen ve kaba enzim kaynağı olarak elde edilen süzüntüler

4.2.2. Ekstraselüler Lipaz Aktivitesinin Spektrofotometrik Yöntem ile Ölçülmesi

SSF yöntemi ile elde edilen extraselüler lipaz enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür. Spektrofotometrik olarak lipaz aktivitesi ölçümünde Hung, Giridhar, Chiou & Wu, (2003)'ün, kullandığı yöntem modifiye edilerek aşağıdaki prosedür kullanılmıştır (Çizelge 4.1). 0.05 gr para-nitrofenil palmitat (PNPP) etanol ile 10 ml'ye tamamlanarak su banyosunda (40 °C) çözündürülmüştür. 2.65 gr Na_2CO_3 distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler taze olarak hazırlanmıştır (Şükran Şengel, 2007).

Çizelge 4.1. Lipaz aktivitesinin Spektrofotometrik Yöntem ile ölçümünde uygulanan işlemler

Substratlı Tüp	**Kontrol Tüp**
1 ml kaba enzim	1 ml kaba enzim
1 ml PNPP	1 ml etanol
5 dk 40 °C sıcak su banyosunda reaksiyon	Bekleme yok
2 ml Na_2CO_3	2 ml Na_2CO_3
10 dk santrifüj	Santrifüj yok
Üst sıvı (1/25 oranında seyreltilerek) 404 nm de ölçülmüştür	Üst sıvı (1/25 oranında seyreltilerek) 404 nm de ölçülmüştür

Üst sıvı yoğun olduğu için 1/25 oranında seyreltmeler yapılmış ve aynı şekilde kontrol tüp de bu oranda seyreltilerek ölçümler alınmıştır. Yapılan ölçümden sonra kontrol tüpün absorbans değeri substratlı absorbans değerinden çıkarılarak aktivite bulunmuştur. Aktivite örnek hesabı Ek 1'de verilmiştir (Şükran Şengel, 2007).

4.3. En İyi SSF Kültür Ortamının Belirlenmesi

Tributirinli lipaz tarama ortamında en iyi aktivite gösteren mikrofungusun, substrat olarak (5 gr), buğday kepeği, (5 gr) ayçiçeği küspesi, (5 gr) mısır küspesi ve bunların karışımı (eşit oranda karışımdan 5gr), distile su ile besiyerinin nem içeriği ayarlandıktan sonra SSF ortamlarındaki lipaz üretim aktivitesi birbirleriyle karşılaştırılarak belirlenmiştir. En yüksek aktivitenin gözlendiği SSF kültür ortamı ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.4. SSF ile Ekstraselüler Lipaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Seçilen fermantasyon ortamında, enzim aktivitesi üzerinde etkisi olduğu bilinen bazı parametreler değiştirilerek en iyi koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. SSF yöntemi ile mikrofunguslardan enzim üretiminde optimum inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç nem düzeyi, başlangıç aşı konsantrasyonu, başlangıç pH etkisi ve karbon kaynağı olarak kullanılan bitkisel yağların etkisi optimize edilmesi gereken önemli parametreler arasındadır. Bu çalışmada, bahsedilen parametrelerin her biri birbirinden bağımsız olarak test edilmiştir. Optimize edilen parametre bir sonraki deneyde sabitlenmiştir (Balkan, 2008).

4.4.1. Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

P. aurantiogriseum'dan enzim üretiminde en uygun inkübasyon süresini belirlemek için SSF'de ayçiçeği küspesi substrat olarak kullanılmıştır. Ayçiçeği küspesi 80ºC' de 24 saat kurutulmuştur. 250 ml'lik erlen mayerlere 5'er gr olacak şekilde konulmuştur. Distile su ile nem içeriği ayarlanmıştır. Besiyerleri otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir. 7

günlük PDA besiyerlerinden 1×10^6 mikroorganizma içerecek şekilde spor süspansiyonları hazırlanmıştır. SSF ortamlarına 1'er ml aşı yapılmıştır. 25 °C'de her gün için inkübasyondan sonra besiyerlerine 50 ml distile su konularak 200 rpm'de çalkalamalı etüvde 1 saat süreyle çalkalanmıştır. SSF ortamları steril gazlı bezden süzülmüş ve Whatman no:1 filtre kağıdından geçirilmiştir. Elde edilen süzüntü kaba enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (Balkan, 2008).

Seçilen mikrofungusun maksimum enzim üretimini gerçekleştirdiği üretim süresini bulmak için enzim aktivitesinin düşüş gösterdiği güne kadar 1. günden 10. güne kadar enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır (Balkan, 2008).

4.4.2. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

P. aurantiogriseum'dan enzim üretiminde en uygun üretim sıcaklığını bulabilmek için 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C sıcaklıklarda üretim yapılmıştır. 24 saat pastör fırınında kurutmaya bırakılmış ayçiçeği küspesinden 250 ml'lik erlen mayerlere 5'er gr olacak şekilde konulmuştur. Distile su içeriği ayarlanmıştır. Besiyerleri otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir. 7 günlük PDA besiyerlerine distile su ilave edilerek hazırlanan spor süspansiyonundan 1×10^6 kültür ortamlarına aşı yapılmıştır. 6 gün inkübasyona bırakılmıştır (Balkan, 2008).

4.4.3. Optimum Başlangıç Nem Miktarının Belirlenmesi

P. aurantiogriseum'dan enzim üretiminde en uygun üretim başlangıç nem miktarının belirlenebilmesi için SSF kültürlerinin başlangıç nem düzeyleri distile su ile %35, %55, %75, %95 (w/v) olarak ayarlanmıştır. Ayçiçeği küspesi 80 °C' de 24 saat kurutulduktan sonra 250 ml'lik erlen mayerlere 5'er gr olacak şekilde konulmuştur. Otoklavda 121 °C' de 15 dk steril edilmiştir. 7 günlük PDA besiyerlerine distile su ilave edilerek hazırlanan spor süspansiyonundan 1×10^6 kültür ortamlarına aşı yapılmıştır. 6 gün 25 °C'de besiyerleri üretime bırakılmıştır (Balkan, 2008).

4.4.4. Optimum Aşı Miktarının Belirlenmesi

Aşı konsantrasyonunu belirlemek için 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 ml spor (1×10^6) süspansiyonları kullanılmıştır. Başlangıç nem düzeyi %75 (w/v), inkübasyon sıcaklığı 25 °C'de 6 gün inkübasyona bırakılmıştır (Balkan, 2008).

4.4.5. Optimum Başlangıç pH Düzeyinin Belirlenmesi

Başlangıç pH düzeyini belirleyebilmek için pH: 5.0 (0.1 M ftalat tamponu), pH: 5.5 (distile su), pH: 6.0 (0.1 M fosfat tamponu), pH: 7.0 (0.1 M fosfat tamponu), pH: 8.0 (0.1 M fosfat tamponu) düzeyinde nemlendirici ajan olarak tamponlar hazırlanmıştır. Başlangıç nem düzeyi hazırlanan farklı pH'lardaki nemlendirici ajanlarla %75 (w/v)'e ayarlanmış, $1x10^6$ ml aşı ekim yapılmış ve inkübasyon sıcaklığı 25 °C'de 6 gün inkübasyona bırakılmıştır (Balkan, 2008).

4.4.6. Bitkisel Yağların Etkisinin Belirlenmesi

Bitkisel yağların etkisini görebilmek için karbon kaynağı olarak zeytin, ayçiçeği ve susam yağı kullanılmıştır. 24 saat etüvde bekletilen ayçiçeği küspesi ile hazırlanan SSF besiyeri pH: 5.5 olan nemlendirici ajan ile %75 (w/v) düzeyde nemlendirilmiş ve 121 °C'de 15 dk otoklava atılmıştır. Otoklavdan çıkarıldığında %1 oranında her bir yağdan SSF besiyerlerine aktarılmıştır. $1x10^6$ ml aşı ekim yapılmıştır. 25 °C'de 6 gün inkübasyona bırakılmıştır (Balkan, 2008).

4.4.7. Belirlenen Optimum SSF Kültür Ortamı Koşullarında Spesifik Aktivite Ölçümü

Belirlenen optimum SSF kültür ortamında fungal lipaz üretimi gerçekleştirilerek enzimin spesifik aktivitesi belirlenmiştir. Spesifik aktivite tayininde protein miktarının belirlenebilmesi için Lowry Metodu kullanılmıştır (Lowry, vd., 1951).

Çalışmada, ölçülen protein derişimleri ve aktivite değerlerinden yararlanılarak örneklerin spesifik aktiviteleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Spesifik Aktivite = (U/ml) * (ml/mg protein)

4.5. İstatistiksel Analiz

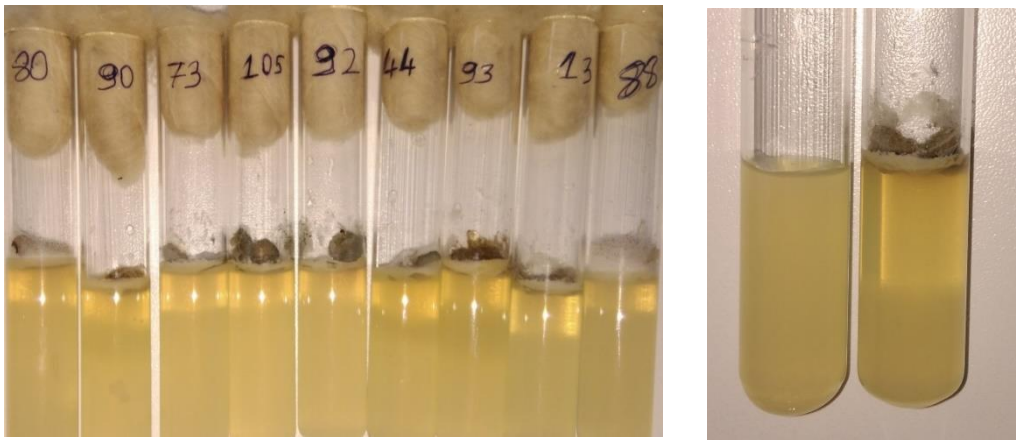
Elde edilen deneysel verilerden yararlanılarak inkübasyon süresi, pH, nem, aşı miktarı, bitkisel yağların etkisi, sıcaklığın etkisi birbirinden bağımsız olarak toplam lipaz aktivitesine etkisi MİNİTAB 18 PAKET PROGRAMI 'Tek Yönlü Anova' istatiksel yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 5

BULGULAR

5.1. En İyi Lipolitik Aktivite Gösteren Mikrofungusun Seçimi

Tribütirin içeren besiyerinde taranan mikrofunguslar lipaz (+) ise, besiyerinde berraklık meydana gelmekte (Şekil 5.1. A), lipaz (-) ise besiyerinde hiçbir değişiklik olmamaktadır. Lipaz (+) olarak değerlendirilen besiyerlerinde oluşan bulanıklık 3. günden 7. güne kadar cetvel ile ölçülmüştür. Sonuçların değerlendirilmesinde 7. gün ölçümleri esas alınmıştır (Çizelge 5.1). *Penicillium aurantiogriseum* (Şekil 5.1. B)'un, en yüksek aktiviteyi göstermesinden dolayı, SSF yöntemi ile ekstraselüler enzim üretim çalışmalarına bu mikrofungus kullanılarak devam edilmiştir.



A **B**

Şekil 5.1. (A) Tribütirinli besiyerinde pozitif olarak değerlendirilen suşların görünümü, **(B)** Tribütirin Agar kontrol besiyeri ve *Penicillium aurantiogriseum* türünün tribütirinli besiyerindeki lipaz aktivitesi

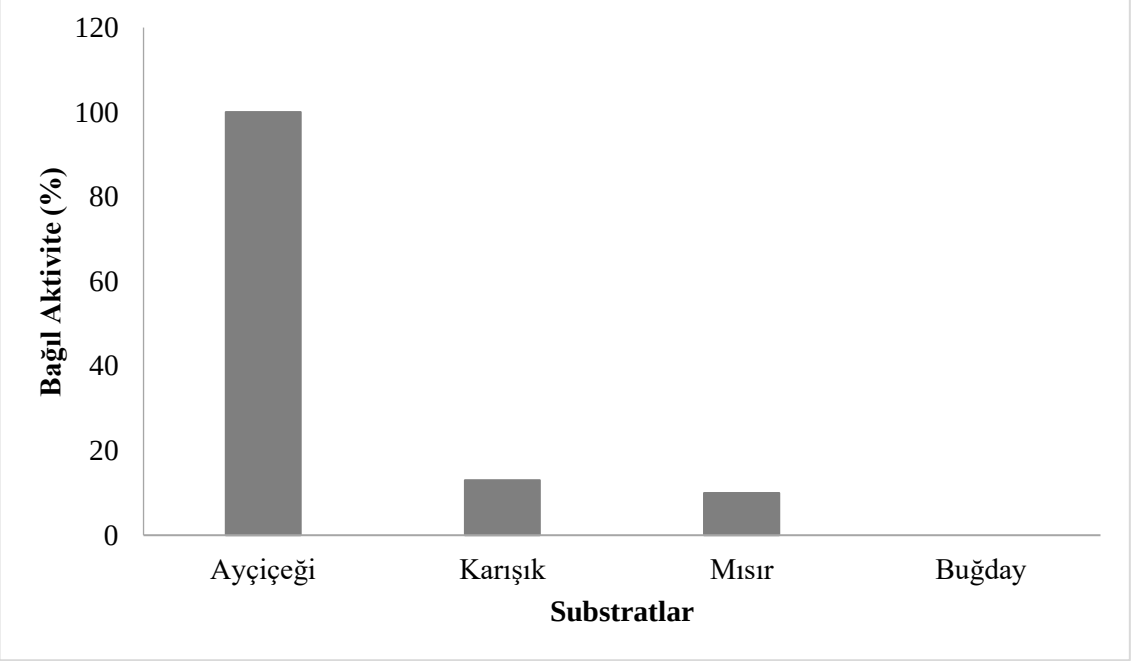
Çizelge 5.1. Tribütirinli besiyerinde taranan mikrofungus suşlarının 7. gün lipolitik aktivite ölçümleri *(L.A.: lipolitik aktivite)*

MİKROFUNGUS	**L.A.**		***MİKROFUNGUS***	**L.A.**
Penicillium aurantiogriseum	1.9 cm		*Aspergillus fumigatus* (suş 2)	0.6 cm
Aspergillus flavus (suş 1)	1.8 cm		*Cladosporium cladosporioides* (suş 3)	0.6 cm
Penicillium solitum	1.6 cm		*Dendryphyon comosum*	0.6 cm
Rhizopus arrhizus	1.6 cm		*Alternaria citri*	0.6 cm
Penicillium solitum (suş 1)	1.5 cm		*Fusarium crookwallense*	0.6 cm
Penicillium solitum (suş 2)	1.5 cm		*Verticillium chlamydosporium*	0.6 cm
Penicillium sp. (suş 1)	1.4 cm		*Gibberella fujikuroi*	0.6 cm
Penicillium sp. (suş 2)	1.4 cm		*Trichoderma sp.* (suş 2)	0.6 cm
Rhizopus sp.	1.3 cm		*Cladosporium*	0.6 cm
Aspergillus parasiticus	1.3 cm		*Aspergillus terreus* (suş 2)	0.5 cm
Aspergillus sp. (suş 1)	1.3 cm		*Fusarium culmorum* (suş 1)	0.5 cm
Fusarium poae (suş 1)	1.2 cm		*Ramichloridium subulatum*	0.5 cm
Penicillium citrinum	1.2 cm		*Acremonium sordidulum*	0.5 cm
Rhizopus sp. (suş 1)	1.2 cm		*Alternaria alternata* (suş 1)	0.5 cm
Aspergillus sp. (suş 2)	1.2 cm		*Aspergillus niger* (suş 1)	0.5 cm
Penicillium bilaiae	1.1 cm		*Alternaria alternata* (suş 2)	0.4 cm
Cladosporium cladosporioides (suş 1)	1.1 cm		*Buveria sp.*	0.4 cm
Penicillium griseoroseum	1.1 cm		*Fusarium crokwallanse*	0.4 cm
Rhizopus oryzae	1.1 cm		*C.sphareospermum*	0.4 cm
Penicillium sp. (suş 3)	1.0 cm		*Fusarium glomerata*	0.4 cm
Aspergillus flavus (suş 2)	1.0 cm		*Penicillium sp.* (suş 5)	0.4 cm
Penicillium chrysogenum	1.0 cm		*A.fumigatus* (suş 3)	0.3 cm
Penicillium brevicompactum	1.0 cm		*Fusarium culmorum* (suş 3)	0.3 cm
Aspergillus sp.(suş3)	1.0 cm		*Aspergillus terreus*	0.3 cm
Aspergillus wentii	1.0 cm		*Phoma sp.*	0.3 cm
T. roseum	1.0 cm		*Aspergillus niger* (suş 2)	0.3 cm
Scopulariopsis sp.	1.0 cm		*Geotrichum candidum*	0.3 cm
Aspergillus oryzae	1.0 cm		*Aspergillus niger* (suş 3)	0.3 cm
Penicillium viridicatum	1.0 cm		*Aspergillus niger* (suş 4)	0.3 cm
Rhizopus sp. (suş 2)	0.9 cm		*Aspergillus niger* (suş 5)	0.2 cm
Cladosporium chlorocepharum (suş 1)	0.9 cm		*Penicillium citroenigrum*	0.2 cm
Penicillium harquei	0.9 cm		*Cochliocolus spicifer*	0.2 cm
Trichoderma sp. (suş 1)	0.9 cm		*Fusarium poae* (suş 2)	0.2 cm
Fusarium equiseti	0.8 cm		*Penicillium digitatum* (suş 1)	0.2 cm
Aspergillus flavus (suş 3)	0.8 cm		*Penicillium digitatum* (suş 2)	0.2 cm
Penicillium sp. (suş 4)	0.8 cm		*Geotrichum candidum*	0.2 cm
Penicillium oxalicum	0.7 cm		*Talaromyces purpurogenus*	0.2 cm
Aspergillus versicolor	0.7 cm		*Aspergillus niger* (suş 6)	0.2 cm
Aspergillus terreus (suş 1)	0.7 cm		*Penicillium sp.* (suş 6)	0.1 cm
Fusarium concolor	0.6 cm		*Arthrinium phaerospermum*	0.1 cm
Aspergillus fumigatus (suş 1)	0.6 cm		*Aspergillus niger* (suş 7)	0.1 cm
Cladosporium cladosporioides (suş 2)	0.6 cm			

5.2. SSF Kültür Ortamındaki Üretim Koşullarının *P. aurantiogriseum* Ekstraselüler Lipaz Sentezi Üzerine Etkileri

5.2.1. SSF Kültür Ortamında Kullanılan Substratın Etkisi

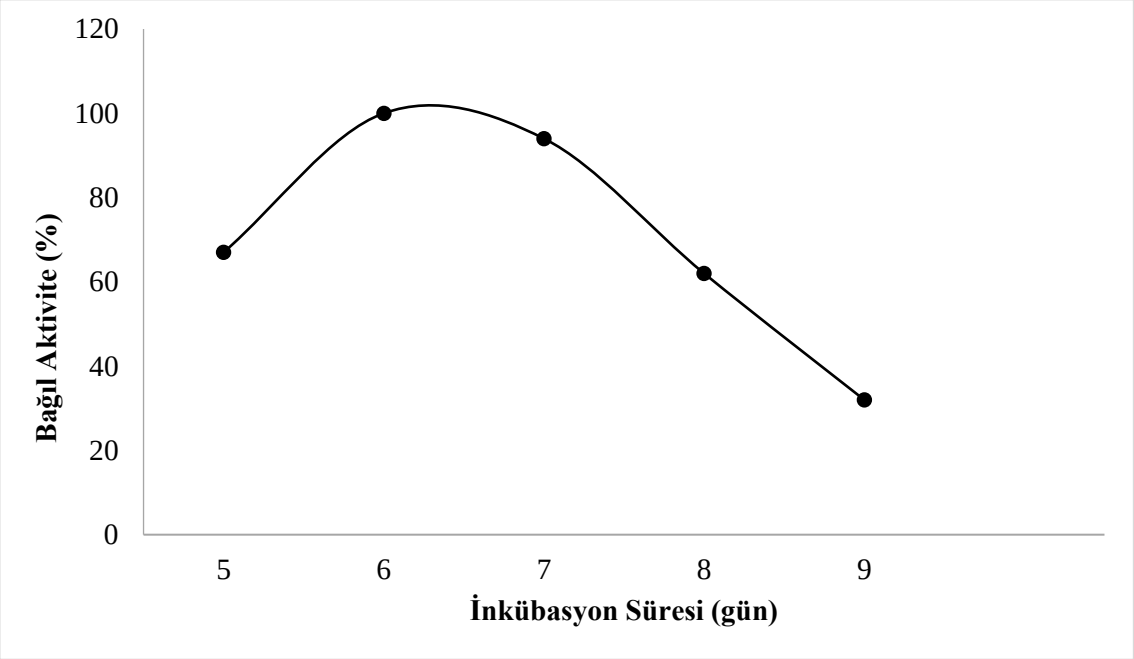
Tribütirin agar besiyerinde en yüksek lipolitik aktivite gösteren mikrofungus olan *P. aurantiogriseum* buğday kepeği, ayçiçeği küspesi, mısır küspesi ve bunların karışımını (buğday kepeği, ayçiçeği ve mısır küspesi) içeren SSF kültür ortamlarında lipaz aktivitesi yönünden araştırılmıştır. Farklı besiyerlerinde farklı aktivite miktarı ölçülmüştür. *P. aurantiogriseum*'un spektrofotometre ile yapılan lipaz aktivitesi ölçüm sonuçlarına göre en yüksek aktiviteyi substrat olarak ayçiçeği içeren SSF ortamında göstermiştir. Substrat olarak buğday kepeği içeren SSF ortamında hiç lipaz sentezi olmadığı, mısır küspesi içeren SSF ortamında %10.8'lik, karışık substratları içeren ortamda ise %13'lük bir lipaz sentezi gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 5.2). Substratların lipaz aktiviteleri arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge A.1). Bundan sonra yapılacak deneylere ayçiçeği küspesi içeren SSF ortamı ile devam edilmiştir.



Şekil 5.2. Farklı substratlar içeren SSF kültür ortamlarında *P. aurantiogriseum*'un lipaz aktivitesi

5.2.2. İnkübasyon Süresinin Etkisi

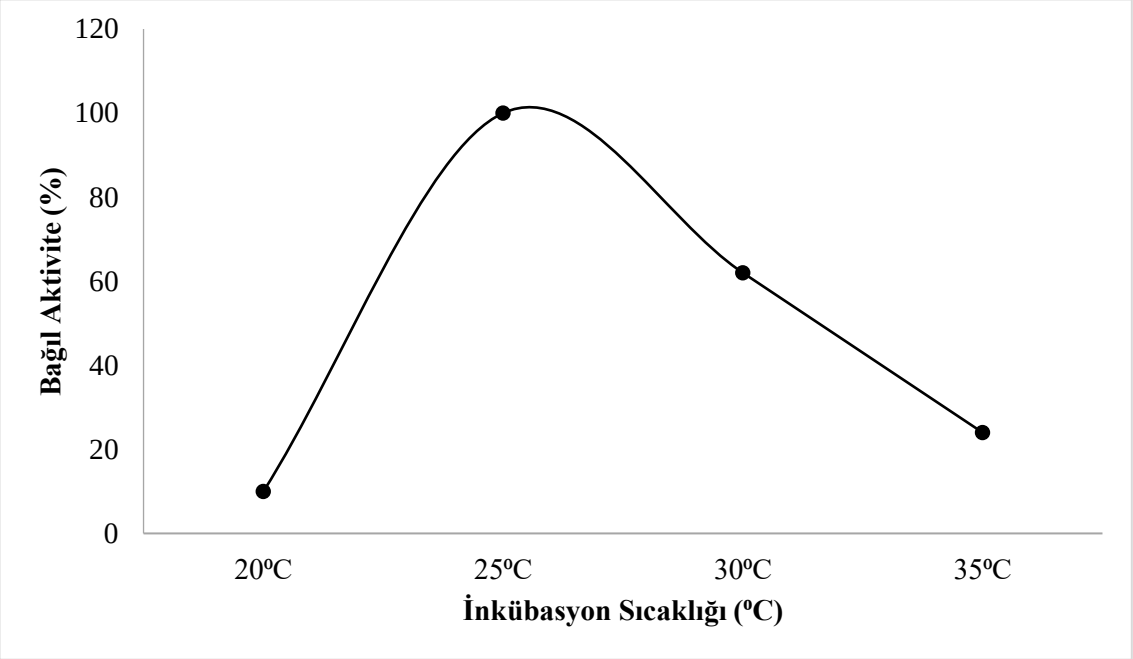
İnkübasyon süresinin belirlenmesi çalışmasında ayçiçeği küspesi içeren distile su ile nemlendirilmiş SSF ortamında maksimum enzim aktivitesinin 6. günde gerçekleştiği yapılan enzim aktivite tayinleri sonucu belirlenmiştir. En iyi enzim aktivitesi 6.günde görülmüştür Üretimin 5. gününde enzim aktivitesi %67; 7. gününde %94; 8. gününde %62 olarak ölçülmüştür (Şekil 5.3). İnkübasyon süresinin lipaz aktivitesi üzerindeki etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge A.2).



Şekil 5.3. SSF kültür ortamında inkübasyon süresinin ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi

5.2.3. İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

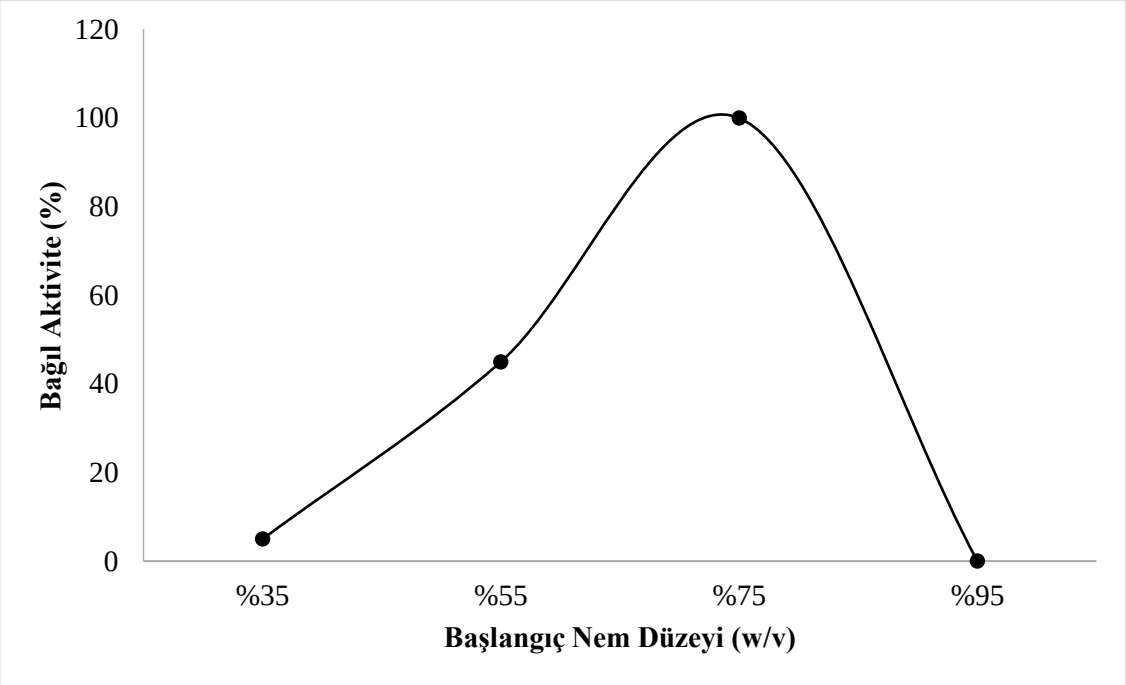
Ayçiçeği küspesi içeren ve distile su ile nemlendirilmiş SSF ortamları, farklı sıcaklık derecelerine ayarlanmış inkübatörlerde 6 gün inkübasyon süresi sonucunda en yüksek aktivite 25 °C'de üretimi yapılan ortamda sağlanmıştır. 35 °C'de ise üretim gözlemlenememiştir. 20, 30 ve 35 °C sıcaklıklardaki bağıl aktivitelerin sırası ile %10; 62 ve 24 oranında olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.4). Sıcaklık derecelerinin lipaz aktivitesi üzerindeki etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge A.3).



Şekil 5.4. SSF kültür ortamında inkübasyon sıcaklığının ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi

5.2.4. Başlangıç Nem Düzeyinin Etkisi

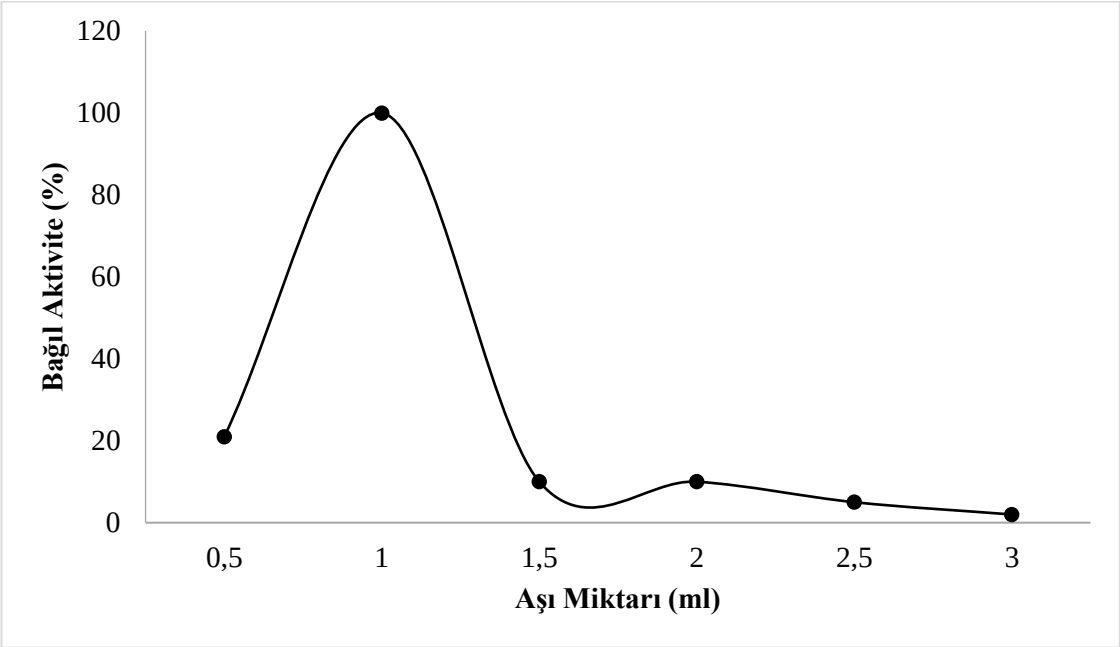
Farklı nem oranlarına sahip SSF ortamlarında 25 °C'de 6 gün inkübasyon süresi sonunda en iyi lipaz aktivitesinin %75 (w/v) nem düzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.5). %75'ten sonra sırası ile en iyi aktiviteler %55 ve %35 nem düzeylerinde belirlenmiştir. %95'te ise aktivite gözlemlenmemiştir. %35, 55, 75 ve 95 nem düzeylerinde aktivitelerde sırasıyla %95; 55; 0; 100 kayıp olduğu bulunmuştur (Şekil 5.5). Başlangıç nem düzeylerinin lipaz aktivitesi üzerindeki etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge A.4).



Şekil 5.5. SSF kültür ortamında başlangıç nem düzeyinin ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi

5.2.5. Aşı Miktarının Etkisi

0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 (ml'de $1x10^6$) ml aşı miktarı içeren 25 °C'de %75 nem düzeyine sahip, 6 gün inkübasyon süresi sonunda SSF ortamlarında en iyi lipaz aktivitesinin 1ml aşı ekimi yapılan ortamda olduğu tespit edilmiştir 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL aşı (mililitrede 1×10^6 spor) konsantrasyonlarındaki bağıl aktiviteler sırası ile %21; 100; 10; 10; 5; 2 olarak ölçülmüştür (Şekil 5.6). Aşı miktarının lipaz aktivitesi üzerindeki etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge A.5).



Şekil 5.6. SSF kültür ortamında başlangıç aşı miktarının ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi

5.2.6. Nemlendirme Sıvısı pH'sının Etkisi

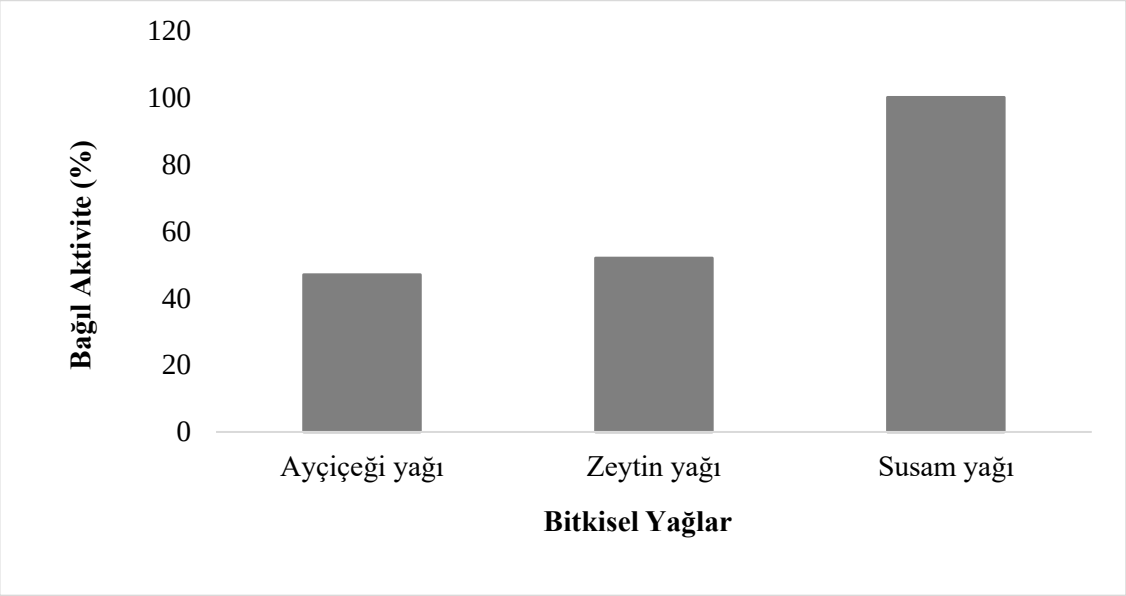
pH değerlendirmesi için SSF kültürlerine farklı pH'larda nemlendirme sıvıları eklendi. Bu denemeler için pH: 5.0 (potasyum ftalat tamponu), pH: 5.5 (distile su), pH: 6.0, 7.0, 8.0 (fosfat tamponu) nemlendirme sıvıları kullanılmıştır. 25ºC'de %75 nem düzeyine sahip SSF ortamında, 6 gün inkübasyon süresi sonunda en iyi lipaz aktivitesi değeri distile su (pH: 5.5)'da belirlenmiştir. pH: 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve distile su ile yapılan nemlendirmeler sonucundaki aktivitelerde, distile su (pH: 5.5) ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 36; 87; 90; 92' lik bir azalma olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.2). Başlangıç pH düzeyinin lipaz aktivitesi üzerindeki etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge A.6).

Çizelge 5.2. SSF kültür ortamında başlangıç pH düzeyinin ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Nemlendirme Sıvıları	Bağıl Aktivite (%)
pH 5.0 (0.1 M ftalat tamponu)	64
pH 6.0 (0.1 M fosfat tamponu)	13
pH 7.0 (0.1 M fosfat tamponu)	10
pH 8.0 (0.1 M fosfat tamponu)	8
pH 5.5 (Distile Su)	100

5.2.7. Bitkisel Yağ İlavesinin Etkisi

Çeşitli bitkisel yağlar karbon kaynağı olarak SSF ortamına %1 oranında eklenmiştir. Eklenen yağlardan en iyi enzim aktivitesi susam yağında görülmüştür. Sırası ile en iyi enzim aktivitesini zeytinyağı ve ayçiçeği yağı olmuştur (Şekil 5.7.). Bitkisel yağların lipaz aktivitesi üzerindeki etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge A.7).



Şekil 5.7. SSF kültür ortamına bitkisel yağ ilavesinin ekstraselüler lipaz aktivitesi üzerine etkisi

5.2.8. Belirlenen Optimum SSF Kültür Ortamı Koşullarında Spesifik Aktivite Ölçümü

P. aurantiogriseum'un en yüksek lipaz aktivitesi gösterdiği optimum ortam koşulları aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 5.3). Optimum ortam koşullarının sağlandığı SSF ortamındaki fungal enzim üretiminin protein miktarı ve spesifik aktiviteleri hesaplanmıştır.

Çizelge 5.3. Belirlenen optimum ortam koşullarının spesifik aktivite tayini ile protein miktarı

Parametreler	**Optimum Ortam Koşulları**
Substrat	Ayçiçeği küspesi
İnkübasyon Süresi	6 gün
İnkübasyon Sıcaklığı	25 °C
Başlangıç Nem Düzeyi	%75
Aşı Miktarı	1 ml
Başlangıç pH düzeyi	Distile su (pH: 5.5)
Bitkisel Yağ Etkisi	Susam yağı (%1ml)
Spesifik Aktivite	1.13 U/mg
Toplam Protein Miktarı	2.827 mg

BÖLÜM 6

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Enzimler ılımlı çevresel koşullar altında yüksek aktivite, seçicilik ve spesifisite gerektiren, yeşil ve sürdürülebilir endüstriyel süreçlerin geliştirilmesinde önem arzeden verimli ve güvenli biyokatalizörlerdir (Rehman, Bhatti, Bilal, Asgher & Wang, 2016)

Çok eski çağlardan itibaren enzimlerin farklı kaynaklardan elde edilebildiği görülmektedir. Bunlar genellikle bitkisel, hayvansal ya da endüstriyel birçok alanda gereksinimleri karşılayabilen mikrobiyal kaynaklı olan enzimlerdir. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ile iyi bir enzim kaynağı olarak görülmektedir. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90 civarı mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu üretilenlerdir (Enez & Agüloğlu Fincan, 2017). Küresel enzim pazarının neredeyse %75'inin amilazlar, proteazlar ve lipazlar gibi hidrolitik enzimlerin oluşturduğu tahmin edilmektedir. Lipazlar, triaçilgliserolün gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalize eden triaçilgliserol hidrolazlardır. Sadece trigliserollerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolize edilmesini gerçekleştirmekle kalmayıp, aynı zamanda sulu olmayan ortamlarda esterifikasyon, transesterifikasyon, asidoliz ve aminolizi katalize edebilirler. Lipazlar (tri-açil gliserol hidrolazlar, EC 3.1.1.3) bu nedenle, gıda işleme, deterjan, deri ve tekstil fabrikasyonunun yanı sıra kimyasal ve farmasötik endüstrilerinde dikkate değer uygulamalara sahip en umut verici biyokatalizörlerden biridir (Liu vd., 2017; Mehta, Bodh & Gupta, 2018; Rehman vd., 2016).

Çeşitli sanayi sektörlerinde lipazların kullanımındaki artan ilgi göz önüne alındığında, bu araştırmada yeni fungal lipazların belirlenmesi için 85 adet mikrofungus

suşu tribütirinli besiyerlerinde taranarak berraklık ölçümü en yüksek olan ve daha önce lipolitik aktivite açısından az çalışılmış olan *P. aurantiogriseum* belirlenmiş ve SSF ortamında lipaz enzimi üretimi değerlendirilmiştir. SSF yönteminde fermantasyon sürecini etkileyen parametreler (uygun substrat seçimi, başlangıç nem düzeyi, sıcaklık, inkübasyon süresi, aşı miktarı) araştırılarak optimize edilmiştir. Bu amaca ulaşırken maliyeti düşük tarımsal atıklardan faydalanılması hedeflendiği için, yöntem olarak SSF yöntemi kullanılmıştır.

Genel olarak hasat sonrası arazide kalan ve temizlenmez ise toprağın kalitesini azaltarak tarımsal verimi düşüren, temizlenmesi durumunda ise bir ekonomik getirisi olmayan atıklar tarımsal atık olarak ifade edilmektedir. Çevre kirliliğinde tarımsal atıklar büyük önem arz etmektedir. Günümüzde bu sorun üreticiler açısından büyük bir sorun teşkil etmektedir. Bu atıkların bir şekilde geri dönüşümü veya çevreye sağlayacak uyumunun araştırılması gerekmektedir (Eskicioğlu, 2013). Trakya Bölgesi'nde önemli geçim kaynağı olan ayçiçeği yetiştiriciliği bununla beraber atık sorununu da meydana getirmiştir. Ayçiçeği ülkemiz için çok önemli bir bitkidir ve aynı zamanda yağ üretim kaynağıdır. Büyük uyum yeteneği ve ekimden hasadına iş gücünü gerektirmeyen özellikle Trakya- Marmara bölgesi için çok önemli ve değerli bir bitkidir (Kaya, Evci, Pekcan, Gücer & Yılmaz, 2009). Gerek ulusal yönetmelikler gerekse de uluslararası direktifler atıkların yeniden kullanımı, geri dönüşümü ve geri kazanımlarını elde etmeye yöneltmektedir (Eskicioğlu, 2013). Bu nedenle yetiştirilen ayçiçeği ile birlikte birçok tarımsal atık, araştırmacılar için birçok proseste kullanılıp, yararlı ürün oluşumuna büyük etkiler sağlamıştır.

SSF yöntemi katı agro-endüstriyel atıkların substrat olarak kullanılmasına izin verdiği için çevresel avantajı olan bir yöntemdir. SSF, mikroorganizmaların kullanıldığı bir süreçtir. Serbest su veya çok az miktarda serbest su içeren bir ortamdır. SSF çoğu mikroorganizmanın (esas olarak mantarlar ve küf) doğal habitatını taklit eder. Sterilizasyon için daha az enerji ister (daha düşük su aktivitesi nedeniyle); bakteriyel kontaminasyona daha az duyarlıdır. Birçok enzim için daha yüksek enzim üretkenliği sağlar, substrat inhibisyonuna daha az duyarlıdır ve böylece daha yüksek nihai ürün konsantrasyonu sağlar (Soccol vd., 2017).

Bazı atıkların SSF yöntemi ile extraselüler enzim üretiminde substrat olarak kullanılıp amilaz, proteaz, lipaz gibi enzimlerin üretildiği birçok çalışma bulunmaktadır (Balkan, 2008; Hammamchi, 2014; Kaya, Önen, Uyar & Akcan, 2013; Orhan, 2002). Bu çalışmada da atıklardan faydalı ürün elde etmek amacı ile substrat olarak ayçiçeği küspesi, buğday küspesi, mısır küspesi ve bu üçünün karışımı kullanılarak SSF ortamları oluşturularak fungal lipaz enzimi üretilmeye çalışılmıştır. Yapılan enzim aktivitesi tayinlerinde en uygun substratın ayçiçeği küspesi olduğu bulunmuştur (Şekil 5.2). Ayçiçeği küspesinin substrat olarak kullanıldığı SSF ortamının en yüksek lipaz üretim ortamı olması; kullanılan hammaddenin yağ oranının yüksek oluşu ve su tutma kapasitesinin iyi oluşuna bağlanabilir (Özyurt, 2006). Buğday ve mısır küspesinin kullanıldığı SSF ortamlarında buğday ve mısırın nişasta içeriğinin yüksek olması ile topaklaşma eğiliminin olması, partiküllerin şişmesine neden olabilmektedir. Bu şişme ile birlikte mikroorganizmanın solunumu olumsuz etkileneceği için mikrobiyal üreme etkilenebilir (Sargın & Göksungur, 2007). Bu sorunlar bizim çalışmamızda da kullanılan nişasta içerikli olan substratlarda lipolitik aktivitenin düşük bulunmasına sebep olmuş olabilir. Sargın ve Göksungur (2007), yaptıkları çalışmalarında aynı problemi buğday germinde yaşadıklarını ve benzeri ürünlerde aynı problem olacağını bildirmişlerdir. Bu araştırıcılar buğday germini aynı boyuttaki buğday kepeği ile karıştırdıklarında problemin büyüdüğünü ancak sert bir tutunma alanı oluşturmak için fındık kabuğu ile birlikte kullandıklarında ise bu sorunu aştıklarını savunmuşlardır. Bu çalışmada da karışık substratlar (buğday kepeği, mısır ve ayçiçeği küspesi) içeren SSF ortamında bu problemin giderildiği gözlenmiştir. SSF ortamı optimizasyon çalışmalarına, en iyi enzim üretiminin elde edildiği substrat olan ayçiçeği küspesi ile devam edilmiştir.

Birçok araştırmacı extraselüler enzim üretiminde optimizasyon çalışmalarının ciddi oranda aktiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir (Balkan & Ertan, 2007; Hammamchi, 2014; Kaya vd., 2013; Orhan, 2002). Ayçiçeği küspesi içeren SSF ortamından elde edilen fungal lipaz üretimini arttırmak amacı ile çeşitli parametreler üzerine (pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, karbon kaynağı etkisi, nem) optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada da ilk olarak inkübasyon süresinin etkisi incelenmiş ve lipaz aktivitesinin 6. günde maksimum düzeye ulaştığı tespit edilmiştir ve 6. günden sonra düşüş göstermiştir (Şekil 5.3). Mikroorganizmaların enzim gibi primer metabolitleri log fazında ürettikleri bilinmektedir. Durgunluk fazına geçiş ile birlikte besinlerin tükenmesi ve büyümenin

durması, sekonder metabolitlerin sentezi, ortamdaki diğer bileşiklerle etkileşim gibi faktörler enzim sentezini azaltabilir (Ekren, 2013). Karataş (2008), yaptığı çalışmada Van Gölü kıyısından izole edilen *Bacillus licheniformis* bakterisinin amilaz ve proteaz enzim üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisini incelemiştir. Pirinç kabuğununun substrat olarak kullanıldığı SSF tekniği ile *B. licheniformis* bakterisinin değişik inkübasyon sürelerinde amilaz ve proteaz aktivitelerini ölçmüş ve amilaz için optimum inkübasyon süresini 24. saat, proteaz için ise 48. saat olarak belirlemiştir. Alkan vd. (2005), ekstrasellülar lipaz enzimini substrat olarak kavun kabuğu kullanarak *Bacillus coagulans* bakterisinden elde etmiş ve en iyi enzim aktivitesinin üremenin 24. saatinde gerçekleştiğini bildirmiştir. Cihangir ve Sarıkaya (2004), *Aspergillus* sp.'den lipaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarınnda optimum inkübasyon süresini 4. gün olarak tespit etmişlerdir. Balkan, (2008) *Penicillium brevicompactum* suşundan SSF ile gerçekleşirdiği amilaz üretiminde optimum inkübasyon süresini 7. gün olarak bildirmiştir.

Optimizasyon çalışmasına inkübasyon sıcaklığı tespiti ile devam edilmiştir. Enzim sentezi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için, hazırlanan SSF ortamları farklı inkübasyon sıcaklıklarında 6 gün inkübasyona bırakılmıştır. *P. aurantiogriseum*'un en iyi lipaz üretimini gösterdiği sıcaklığın 25 °C olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.4). Kempka vd. (2008), *Penicillium verrucosum* ile yaptıkları SSF yöntemi ile lipaz üretim çalışmasında, düşük sıcaklıkların metabolizmayı düşürdüğünü ve yüksek sıcaklıkların lipazı inaktive edebileceğini, sıcaklık ve nemdeki aşırılıkların lipaz üretimini azaltma eğiliminde olduğunu açıklamışlardır. Sztajer ve Maliszewska, (1989) *Penicillium citrinum*'dan lipaz üretim kültür koşullarını optimize etmişler ve optimum lipaz elde ettikleri sıcaklığın 22 °C olduğunu bildirmişlerdir. Şükran Şengel, (2007) *Debaryomyces hansenii* ile yaptığı lipaz üretiminde sıcaklık parametresi optimum değerinin 30 °C olduğunu bildirmiştir. Lima vd. (2003), *Penicillium aurantiogriseum* ile yaptıkları lipaz üretimi çalışmasında en iyi aktiviteyi 29 ºC de bulmuşlardır. Cihangir ve Sarıkaya, (2004) *Aspergillus sp.*'den lipaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında optimum inkübasyon sıcaklığını 30 °C olarak bildirmişledir. Panagiotou, Granouillet & Olsson, (2006) tarafından katı hal fermantasyonu ile *Penicillium brasilianum* tarafından üretilen arabinoksilan parçalanma enzimlerinin (feruloil esteraz, ksilanaz ve α-l-arabinofuranosidaz) üretimi ve ortam parametrelerinin optimizasyonu araştırılmıştır.

Optimum inkübasyon sıcaklığını 26.5 °C olarak bildirmişlerdir. *P. aurantiogriseum* 30 °C'de de iyi üreme gösteren bir mikrofungus olmasına rağmen enzim aktivitesi bu sıcaklıkta daha düşük olmuştur. Yapılan çalışmalar farklı mikroorganizmaların, hatta aynı aynı mikroorganizmaların farklı suşlarının farklı optimum üreme sıcaklıklarına sahip olduğunu ve enzim üretiminin de mikroorganizmanın büyüme kinetiğine bağlı olarak farklı sıcaklıklardan etkilendiğini ortaya koymaktadır.

Başlangıç nem düzeyinin optimizasyonu için SSF ortamları destile su kullanılarak %35, 55, 75 ve 95 (w/v) oranlarında nemlendirilmiştir. 25 °C'de 6 gün inkübasyon süresi sonunda en iyi lipaz üretiminin %75 başlangıç nem düzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.5). Pandey (2003), yüksek nemli maddelerin oksijen penetrasyonunu önleyen substrat gözenekliliğinin azalmasına neden olduğunu, öte yandan düşük nem içeriğinin de besinlerin yetersiz erişilebilirliğine ve dolayısıyla kötü mikrobiyal büyümeye neden olabileceğini bildirmiştir. Kempka vd. (2008), substratın başlangıç neminin düşük olmasının kütle transferini engelleyerek hücre metabolizması için gereken enzimlerin işlevsel özelliklerinin kaybedilmesine neden olabileceğini vurgulamışlardır. SSF ortamlarında kullanılan substratların nem tutma kapasiteleri de önemlidir. Balkan, Balkan ve Ertan (2011), *Penicillium chrysogenum*'dan enzim üretmek için substrat olarak mısır koçanı yaprağı, buğday kepeği, buğday samanı ve pirinç samanı ile yaptıkları SSF kültürlerinde optimum başlangıç nem düzeylerini %55 ila %75 olarak belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da en iyi enzim üretiminin optimum %75 nem düzeyinde olmasının ayçiçeği küspesinin yüksek nem tutma kapasitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

SSF kültür ortamında önemli olan parametrelerden biri de inokülüm miktarıdır. Aşı konsantrasyonunun optimize edilmesi için, SSF kültür ortamlarına 0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml, 2 ml, 2.5 ml ve 3 ml mikrofungus spor süspansiyonları (1×10^6 spor/ml) aşılanmıştır. En iyi lipaz aktivitesi 1 ml spor süspansiyonu inoküle edilen SSF kültür ortamlarında 25 °C'de %75 nem düzeyinde 6 gün inkübasyon sonucu elde edilirken, en düşük enzim üretimi ise 3 ml aşı süspansiyonu kullanımında gözlenmiştir (Şekil 5.6). Yüksek hacimlerde aşı miktarı ile ortamın neminin farklı düzeylere taşınması sonucu düşük enzim üretimi gerçekleşebilmektedir. Bununla ilgili olarak Pandey (2003), yüksek nemli maddelerin oksijen penetrasyonunu önleyen substrat gözenekliliğinin azalmasına neden olduğunu bildirmiştir. Rıaz, Haq ve Qadder (2003), inokulum miktarının artışının, mikroorganizmanın büyümesini önemli ölçüde arttırarak ortamdaki besin maddelerinin

yetersiz kalabildiğini, rekabet nedeni ile organizmanın metabolik aktivitesinde gerileme meydana gelebildiğini ve enzim üretiminin azaldığını; düşük inokülum seviyesinin ise mikroorganizmaların büyümesi ve substratı kullanabilmesi için geçen süreyi uzattığını bildirmişlerdir. Bu nedenle SSF ortamlarında başlangıç inokülüm miktarının optimize edilmesi de son derece önemlidir. Roopesh, Ramachandran, Nampoothiri, Szakacs ve Pandey (2006), *Mucor racemosus*'tan SSF yöntemiyle fitaz üretiminde 0.5 ve 3 ml arasında aşı miktarları denemesinde en iyi aktivitenin 1 ml aşı miktarına sahip ortamda olduğunu bildirmişlerdir. Haq, Hameed, Mahmood ve Javed (2012), *Paenibacillus amylolyticus'*un α-amilaz üretimi için en iyi aşı miktarının 1.5 ml olduğunu bildirmişlerdir. Abdullah, Shaheen ve Iqtedar (2014), *Aspergillus niger*'den SSF ile a-amilaz üretiminin optimizasyonunda en iyi aktiviteyi 30 °C, pH: 5.0 ve 1 ml inokülüm hacminden elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Başlangıç pH düzeyinin optimize edilmesi amacı ile biyolojik aktivite üzerinde etkisi olmayan farklı pH'larda hazırlanan tamponlar ve su ile SSF besiyeri %75 nemlendirilmiştir. $1x10^6$ aşı miktarı ile ekim yapılmış ve 25 °C'de 6 gün inkübasyon sonucu lipaz aktivitesi ölçülmüştür. Her mikroorganizmanın optimum üreme gösterdiği bir pH aralığı vardır (mikrofunguslar için hafif asidik ortamlar). pH optimizasyonu çalışmasında en iyi enzim aktivitesi, pH'sı 5.5 olan distile su ile hazırlanan SSF ortamında bulunmuştur (Çizelge 5.2). Tan, Zhang, Wang, Ying, Deng, (2003) *Candida* sp. ile yaptıkları lipaz üretimi çalışmasında en iyi aktiviteyi pH: 7.0' da gösterdiğini bildirmişlerdir. Cihangir ve Sarıkaya, (2004) *Aspergillus sp.*'den lipaz üretimini etkileyen parametreleri araştırmışlar ve en iyi enzim aktivitesinin pH: 5.5' da olduğunu göstermişlerdir. Orhan (2002), *Rhizopus arrhizus*'tan katı hal fermantasyonu ile lipaz üretimini etkileyen parametreleri incelemiş ve en iyi enzim üretiminin pH: 6.67 (doğal pH)' de gerçekleştiğini gözlemişlerdir. Aydoğdu, Balkan, Balkan ve Ertan (2012), yaptıkları çalışmada farklı mikrofungus türlerini farklı pH ayarı yapılmış tarama besiyerlerinde amilolitik aktivite açısından taramışlardır. Amilaz üretimi açısından uygun olan mikrofungus türlerinin seçiminin, çevresel şartların ve özellikle de besiyeri pH' sının amilolitik aktivite için çok önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir.

Birçok araştırmacı enzim üretimine etkisini gözlemleyebilmek amacı ile farklı şeker ve yağları karbon kaynağı olarak besiyerlerine ilave etmişlerdir (Kaya vd, 2013; Lima vd., 2003). Bizim çalışmamızda lipaz enzim üretimini arttırmak amacı ile ayçiçeği, zeytin

ve susam yağı optimum SSF ortamına %1 oranında ilave edilmiştir. En iyi enzim üretiminin susam yağı eklenen SSF ortamında olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.7). Ancak ayçiçeği ve zeytinyağı ilavesinin, daha düşük bir enzim üretimine sebep olduğu görülmüştür. Şükran Şengel (2007), bitkisel yağların hücre dışı lipaz aktivitesine etkisini incelemiş ve en iyi enzim üretiminin soya yağında olduğunu bildirmiştir. Keklikçioğlu Çakmak ve Açıkel, (2015) yaptıkları çalışmada maya türünden lipaz üretimini araştırmışlar ve optimum koşullarını incelemişlerdir. Enzim aktivitesini arttırmak için ortama soya, mısır, zeytin, ayçiçeği, kanola gibi bitkisel yağları ilave etmişler ve en iyi aktiviteyi %1,25 soya yağında gözlemlemişlerdir. Cihangir ve Sarıkaya (2004), topraktan izole ettikleri fungus türünden, ortama zeytinyağı ilavesi ile daha iyi bir lipaz aktivitesi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sztajer ve Maliszewska (1989), kolza tohumu yağını çalışmalarında indükleyici olarak kullanmışlardır. Petroviç, Krinjar, Bedarevid, Vujicic ve Banka (1990), *Penicillium roqueforti* ile yaptıkları çalışmada en iyi lipaz aktivitesini %2 zeytinyağı kullandıkları ortamdan elde etmişlerdir. Erdem (2008), bitkisel yağları karbon kaynağı olarak incelediği çalışmada yerfıstığı, susam, palmiye, hint, hindistan cevizi ve ayçiçeği yağını kullanmış, en iyi aktiviteyi susam yağında elde etmiştir. Karşılaştırmasını bu yağların oleik asit ve linoleik asit içerikleri yönünden yapmıştır. Oleik asit miktarı içeriğine bakıldığında %30'un altında enzim üretiminin düştüğü, linoleik asit miktarı açısından bakıldığında ise %50'nin altına indiğinde aktivitede azalma meydana geldiğini bildirmiştir. Erdem (2008)'in bulgularını destekleyici nitelikte olarak; bizim çalışmamızda eklenen yağların içerikleri genel olarak değerlendirildiğinde, oleik/linoleik asit miktarlarının enzim üretimini etkilediği söylenebilir. Bu durum, literatürdeki çalışma ile paralellik göstermektedir.

Lipaz üretimi için yeni kaynakların özellikle de üretimin daha kolay, ucuz ve hızlı olduğu mikrobiyal kaynakların yaratılması önemli bir konudur. Bu üretimde atıkların substrat olarak kullanılabilirliği de biyoteknolojik açıdan önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında lipaz üretimi için yüksek bir verimliliği olan *P. aurantiogriseum* mikrofungusunun kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir. Hücre dışı lipazlar, kendilerine özgü katalitik özelliklerinden dolayı biyoteknolojik ve çevresel potansiyele sahip en çok umut veren enzimler arasındadır. Bu enzim için yapılan çalışmalarda *Penicillium* en çok incelenen cinslerden biridir, çeşitli ekstraselüler enzimlerin iyi bir üreticisi ve aynı zamanda her türden organik maddenin çok önemli bir ayrıştırıcı-geri dönüştürücüsüdür.

P. aurantiogriseum doğada yaygın olarak bulunan ve tahıl türevi ürünlerde oluşan bir mikrofungus türüdür. Lipolitik aktiviteye sahip bu suşun SSF yönteminde de kullanıma uygun olduğu gözlenmiştir. Bu metod ile aynı zamanda atık kullanımına ışık tutularak, üretimi kolay, maliyeti düşük ve çevre dostu bir lipaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Lipaz üretim miktarını arttırmak amacı ile optimizasyon çalışması yapılıp, üretim miktarı 1.5 kat arttırılmıştır. Bu doğrultuda *P. aurantiogriseum* suşunun literatürü destekleyici nitelikte lipaz ürettiği ve SSF yönteminde kullanılabilir olduğu, yağ içerikli bitkisel atıklar kullanılarak üretimin arttığı gözlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında ileriye dönük çalışmalarda *P. aurantiogriseum*'un farklı suşlarının taranması, elde edilen lipazın saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılabilir. Ayrıca, moleküler ve kinetik özelliklerinin uygun bir şekilde değerlendirilmesi; kinetik mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve enzim immobilizasyonunda kullanılabilirliği için saflaştırılma çalışmaları önem arz etmektedir. Lipaz enziminin karakterizayonu ve saflaştırılması yapılarak gıda, tekstil, deterjan sanayiinde biyoteknolojik süreçlerde kullanılabilirliği araştırılabilir. Ayrıca farklı atıkların kullanılabilirliği çalışması yapılarak literatüre katkı sağlanabilir. Endüstriyel alanda büyük ölçekli fermantasyon teknikleri ile enzim üretimine ışık tutabilir. Sonuç olarak tarımsal atıkların substrat olarak kullanıldığı SSF yöntemi ile fungal lipaz üretimi çalışmaları, çevreye ve ekonomiye büyük katkı sağlayarak çevre dostu, ucuz ve kolay enzim üretimine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abdullah, R., Shaheen, N., & Iqtedar, M. (2014). Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by *Aspergillus niger* (Btm-26) in solid state fermentation. *Pakistan Journal of Botany, 46(3),* 1071-1078.

Adrio, JL., & Demain, A.L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology, 6,* 191-199.

Akkara, M., & Tosun, H., (2014). Funguslardan elde edilen endüstriyel ürünler. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 9(2),* 46-53.

Akkaya, A., & Pazarlıoğlu, N. (2014). 21. yüzyılın anahtar teknolojisi: beyaz biyoteknoloji. *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi, 1(1),* 22-33.

Akyıl, M.H. (2014). *Lipazın Trichoderma citrinoviride'den üretimi ve enzimin bazı kinetik özelliklerinin saptanması.* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Alkan, M.H., Baysal, Z., Doğru, M., & Uyar, F. (2005). Kavun kabuğu kullanarak katı-faz fermentasyon tekniği ile termotoleran *Bacillus coagulans*' tan lipaz enzimi üretimi. *XIX. Ulusal Kimya Kongresi*, BKP74 Kuşadası.

Al-Taweel, R., & Sungur, S. (1995). Lipaz enzimleri ile yağların modifikasyon biyoteknolojisi. *Gıda 20(5),* 299-304.

Aran, N. (2010). *Gıda Biyoteknolojisi.* Ankara: Nobel.

Arda, M. (1980). *Mikoloji (Genel ve Özel).* Ankara: Ankara Üniversitesi.

Aslan, A. & Sekin, Y. (1985). Besin Endüstrisinde Kullanılan Mikrobial Kaynaklı Enzimler. *Gıda, (10)2,* 377-388.

Aydoğdu, H., Balkan, B., Balkan, S., & Ertan, F. (2012). Amylolytic activities of fungi species on the screening medium adjusted to different pH. *T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 5(1),* 1-12.

Balkan, B., Balkan, S., & Ertan, F. (2011). Optimization of parameters for α-amylase production under solid state fermentation by *Trichothecium roseum. Romanian Biotechnological Letters, 16(5),* 6591-6600.

Balkan, B., (2008). *Katı substrat fermentasyonu ile ham nişastayı parçalayan yeni bir fungal amilaz üretimi saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.* (Doktora Tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Balkan, B., & Ertan, F. (2007). Production of α-amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid state fermentation by using some agricultural by products. *Food Technology and Biotechnology, 45(4),* 439-442.

Baylan, M., Mazı, G., & Gündoğdu, S. (2015). Balık beslemede biyoteknolojik uygulamalar. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(3),* 112-116.

Behçet, R., Aydın, S., & Çakmak, A. (2012). Bitkisel ve hayvansal atık yağlardan üretilen biyodizellerin tek silindirli bir dizel motorda yakıt olarak kullanılması. *Iğdır University Journal of the Institue Science & Technology, 2(4),* 55-62.

Bennett, JW. (1998). Mycotechnology: The role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology, 66,* 101-107.

Bingöl, G. (1977). *Vitaminler ve Enzimler*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.

Cantürk, Z. (2015). *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait sekonder metabolitlerin sınıflandırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 13(2),* 1-8.

Cardenas, F., Alvarez, E., Soledad, M., Alvarez, C., Maria, J., Montero, S., Valmaseda, M., Elson, S.W., & Sinisterra V.J. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 14,* 111–123.

Cihangir, N., & Sarıkaya, E. (2004). Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20,* 193–197.

Çerçioğlu, M. (2011). Sürdürülebilir tarımda tütün atığı kullanım olanakları. Uludağ Üniversitesi *Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(2),* 101-107.

Çıtak, S., Sönmez, S., & Öktüren, F. (2006). Bitkisel kökenli atıkların tarımda kullanılabilme olanakları. *Derim, 23(1),* 40-53.

Çolakoğlu, G. (2001). *Fungal (Mantari) Büyüme İçin Kimyasal ve Fiziksel Çevre Koşulları.* İstanbul: Marmara Üniversitesi.

Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S., & Duman Cansaran, D. (2015). Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 72(4),* 351-368.

Ekinci, M.S., Akyol, İ., Karaman, M., & Özköse, E. (2005). Hayvansal biyoteknoloji uygulamalarında güncel gelişmeler. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2),* 89-95.

Ekren, G.S. (2013). *Fitaz üreten fungustan enzimin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu.* (Yüksek Lisans Tezi). Adnan Menderes Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Elibol, M., Yaşa, İ., Karaçancı, Ş., Çoban, I., & Özsoy, G. (2008). Zeytinyağı işletmeleri katı(pirina) ve sıvı(karasu) atıklarından mikrobiyal lipaz üretimi. *Proje No: 106M464.* İzmir.

Enez, B., & Agüloğlu Fincan, S. (2017). Topraktan izole edilen *Streptomyces* sp.'den ksilanaz üretimi ve karakterizasyonu, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(3),* 115-123.

Erdem, B. (2008). *Candida rugosa'dan lipaz üretiminde biyoproses parametrelerinin enzim aktivite ve seçimliliğine etkisi.* (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Eskicioğlu, A.V. (2013). *Bitkisel atıklardan kompost gübre üretim sisteminin tasarımı.* (Yüksek Lisans Tezi). Namık Kemal Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Ferrer, M., Jplou, F., Nuero, O.M., Reyesve, F., & Ballesteros, A. (2000). Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 75,* 569-576.

Furutani T, Su R, Ooshima H, & Kato J. (1995). Simple screening method for lipase for transesterification in organic solvent. *Enzyme Microbial Technology, 17,* 1067-1072.

Ghorai, S., Banik, S.P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S., & Khowala, S. (2009). Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research* International, 42(5-6), 577-587.

Gopinath, S.C.B., Periasamy, A., Thangavel, L., & Azariah, H. (2013). Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Research International, 154549.*

Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., & Bradoo, S. (2003). Lipase assays for conventional and molecular screening: An Overview. *Biotechnology Applied Biochemistry, 37,* 63-71.

Gül, Ü.D. (2013). Fungal lipazlar ve endüstride kullanım alanları. *Afyon Kocatepe Üniversity Journal Science Engineering, 13(1),* 1-8.

Hammamchi, H. (2014). *Rhodotorula mucilaginosa'dan lipaz enzimi üretimi ve aktivitesine etkili parametrelerin belirlenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Haq, I., Hameed, U., Mahmood, Z., & Javed, M.M. (2012). Solid state fermentation for the production of α-amylase by *Paenibacillus amylolyticus*. *Pakistan Journal of Botany, 44,* 341-346.

Hashemi, M., Razavi, S.H., Shojaosadati, S.A., Mousavi, S.M., Khajeh, K., & Safari, M. (2010). Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 110(3),* 333-337.

Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology, 64(2),* 175-186.

Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., & Wu, W.T. (2003). Binary immobilization of candida rugosa lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 26,* 69-78.

Iftikhar, T., Niaz, M., Anwer, M., Abbas, S.Q., Saleem, M., & Jabeen, R. (2011). Ecological screening of lipolytic cultures and process optimization for extracellular lipase production from fungal hyperproducer. *Pakistan Journal of Botany, 43(2),* 1343-1349.

Kalaycı, A., Hukkamlı, B., Resioğlu, B., Mısıroğlu, K., & Karaman, S. (2017). *Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Biyogüvenlik.* İsmail Bezirganoğlu (Ed.), Biyoteknoloji (s.22). Ankara.

Kar, S., Datta, T.K., & Ray, R.C. (2010). Optimization of thermostable α- amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid-state fermentation using cassava fibrous residue. *Brazilian Archives of Biology And Technology An İnternational Journal. 53(2),* 301-309.

Karataş, H. (2008). *Bazı bitki atıklarından katı faz fermantasyon* (*SSF*) *tekniği* ile *ekstraselüler enzim üretimi*. (Doktora Tezi). Dicle Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Kaya, S., Önen, Y., Uyar, F., & Akcan, N. (2013). Katı faz fermentasyonu (KFF) tekniği ile *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den α-amilaz üretimi. *Muş Alparslan University Journal of Science, 1(2),* 119-126.

Kaya, Y., Evci, G., Pekcan, V., Gücer, T., & Yılmaz, M.İ. (2009). Ayçiçeğinde yağ verimi ve bazı verim öğeleri arasında ilişkilerin belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi, 15(4),* 310-318.

Keklikçioğlu Çakmak, N., & Açıkel, Ü. (2015). *Candida utilis* mayasıyla lipaz enzimi aktivitesinin farklı ortam koşullarında incelenmesi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi, 30(3),* 475-485.

Kempka, A. P., Lipke, N.L., da Luz Fontoura Pinheiro T., Menoncin, S., Treichel, H., Freire, D.M., Di Luccio, M., & Oliveria, D. (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering, 31,* 119-125.

Kocabaş, A., Gümüştaş, N., & Gönek, S. (2017). Topraktan ksilanaz üreten mikroorganizmaların taranması ve ksilanazın kısmi karakterizasyonu. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 7(2),* 503-508.

Korcan, S. E., Özkara, A., Akyıl, D., Ciğerci, İ.H., & Konuk, M. (2007). Farklı fungus cinslerinde endüstriyel öneme sahip bazı enzim aktivitelerinin incelenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi., 7(1),* 297-306.

Korkmaz, H., Tınkılıç, N., Özen, T., Güder, A. (2012). *Biyokimya-1 Ders Notları*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi/Fen -Edebiyat Fakültesi, Samsun.

Lima, V.M.G., Kieger, N., Mitchell, D.A., & Fontana, J.D. (2004). Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal, 18,* 65-71.

Lima, V.M.G., Krieger, N., Sarquis, M.I., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., & Fontana, J.D. (2003). Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology, 41(2),* 105-110.

Liu, Y., Liu, H., Huang, L., Gui, S., Zheng, D., Jia, L., Fu, Y., & Lu, F. (2017). Improvement in thermostability of an alkaline lipase I from *Penicillium cyclopium* by directed evolution. *Royal Society of Chemistry Advances, 7(61),* 38538-38548.

Lowry, H.O., Rosebrough, N., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chem*istry, 193-265.

Maia, M.M.D. (2001). Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology, 76,* 23-27.

Malilas, W., Kang, S.W., Kim, S.B., Yoo, H.Y., Chulalaksananukul, W., & Kim, S.W. (2013). Lipase From Penicillium Camembertii KCCM 11268: Optimization of solid state fermentation and application to biodiesel production. *Korean Journal of Chemical Engineering, 30,* 405.

Manoorkar, V.B., & Gachande, B.D. (2015). Influence of physical factors on extracellular lipase production in storage seed borne fungi of some oil seeds. *International Journal Of Recent Scientific Research, 6(2),* 2813-2816.

Marul, B. (2007). *Fabrika atıklarından izole edilen Bacillus sp.'den aktif ve kararlı lipaz üretim koşullarının ve üretilen enzimin deterjan endüstrisinde kullanımının araştırılması.* (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi/Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2018). Isolation of a novel lipase producing fungal isolate *Aspergillus fumigatus* and production optimization of enzyme. *Biocatalysis and Biotransformation, 1-8.*

Oliveria, B.H., Coradi, G.V., Angelis, D.A., Scauri, C., Luques, A.H., Barbarosa, A.M., Dekker, R.F., Neto, P.O., & Lima, V.M.G. (2013). Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). *European Journal of Lipid Science and Technology, 115,* 1413-1425.

Orhan, A. (2002). *Rhizopus arhhizus'tan katı hal fermantasyonu ile lipid üretimi*. (Yüksek Lisans Tezi). Fırat Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Elâzığ.

Özarslaner, E., & Albayrak, N. (2013). Lipaz aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesinde çevresel koşulların P-Nitrofenil propiyonat substratının kararlılığına etkisi. *Gıda, 38(3),* 143-149.

Özgen, Ö., Emiroğlu, H., Yıldız, M., Taş, A.S., & Purutçuoğlu, E. (2007). *Tüketiciler ve Modern Biyoteknoloji: Model Yaklaşımlar.* Ankara.

Öztürk, B. (2002). Lipaz enzimi: yapısal özellikleri ve uygulama alanları. *Gıda Mühendisliği Dergisi, 12,* 20-38.

Özyurt, H. (2006). *Biyokütle atık madde olarak ayçiçeği çekirdeği kabuklarının sıvılaştırılması ve elde edilen ürünlerin analizi*. (Yüksek Lisans Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Pacheco, S.M.V., Júnior, A.C., Morgado, A.F., Júnior, A.F., Amadi, O.C., Guisán, J.M., Pessela, B. (2015). Isolation and screening of filamentous fungi producing extracellular lipase with potential in biodiesel production. *Advances in Enzyme Research, 3,* 101-114.

Palomo, J.M., Ortiz, C., Fernández-Lorente, G., Fuentes, M., Guisán, J.M., & Fernández-Lafuente, R. (2005). Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme Microbial Technology, 36,* 447-454.

Panagiotou, G., Granouillet, P., & Olsson, L. (2006). Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology, 72(6),* 1117-1124.

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal, 13,* 81-84.

Pandey, A., Soccol, C.R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry, 35,* 1153-1169.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., & Soccol, V.T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemistry, 29,* 119-131.

Petroviç, S.E., Krinjar, M., Bedarevid, A., Vujicic, I.F., & Banka, L. (1990) Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnology Letters, 12(4),* 299-304.

Rajan, A., & Nair, J.A. (2011). A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. *Turkish Journal Biology, 35,* 569-574.

Rehman, S., Bhatti, H.N., Bilal, M., Asgher, M., & Wang, P. (2016). Catalytic, kinetic and thermodynamic characteristics of an extracellular lipase from *Penicillium notatum. Catalysis Letters, 147(1),* 281-291.

Rıaz, N., Haq, I.U., & Qadder, M.A. (2003). Characterization of α-amylase by *Bacillus subtilis*. *International Journal of Agriculture & Biology, 3,* 249-252.

Roberts, R.G. (1987). Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed. *Mycologia, 79(2),* 265-273.

Rodrigues, C., Cassini, S.T.A., Antunes, P.W.P., Pinotti, L.M., Keller, R.P., & Gonçalves, R.F. (2016). Lipase-producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production. *African Journal of Biotechnology, 15(18),* 759-767.

Roopesh, K., Ramachandran, S., Nampoothiri, K.M., Szakacs, G., & Pandey, A. (2006). Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology, 97,* 506-511.

Samson, R.A., Houbraken, U., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010). Food and indoor fungi. *CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.* Netherland: Amer Phytopathological Society. 390s.

Sargın, S., & Göksungur, Y. (2007). Çeşitli tarımsal atık ve yan ürünlerin katı kültür fermantasyonu ile laktik asit üretiminde kullanılabilirliklerinin incelenmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi, 44(3),* 89-99.

Schmidt, M., & Bornscheuer, U.T. (2005). Highthroughput assays for lipases and esterases. *Biomolecular Engineering, 22,* 51-56.

Sethi, B.K., Rout, J.R., Das, R., Nanda, P.K., & Sahoo, S.L. (2013). Lipase production by *Aspergillus terreus* using mustard seed oil cake as a carbon source. *Annals of Microbiology, 63(1),* 241-252.

Sharma, A.K., Sharma, V., & Saxena, J. (2016) A short review on extracellular lipase producing microorganisms. *Advance Pharmaceutical Journal, 1(3),* 59-65.

Singh, A.K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnol*ogy, *166,* 486-520.

Singhaniaa, R. R., Patel, A.K., Soccol, C.R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal, 44(1),* 13-18.

Soccol, C. R., da Costa, E. S. F., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & de Souza Vandenberghe, L. P. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation, 1(1),* 52-71.

Sumathy, R., Vijayalakshmi, M., & Deecaraman, M. (2012). Studies on lipase production from fungal strains by different inducers at varied concentrations- a comparative study. *International Journal of Environmental Sciences, 3(3),* 1072-1078.

Sümer, S. (2006). *Genel Mikoloji.* Ankara: Nobel.

Sztajer, H., & Maliszewska, I. (1989). The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters, 2(12),* 895-898.

Şener, A., & Ünal, M.Ü. (2008). Gıda sanayii atıklarının biyoteknolojik yöntemlerle değerlendirilmesi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum.

Şükran Şengel, B. (2007). *Deterjan katkı maddesi olarak mikrobiyal kaynaklı lipaz üretim koşullarının araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C., & Deng, L. (2003). Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry, 39(4),* 459-465.

Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., & Çeltik, Ö. (2000). Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: amilaz, proteaz, lipaz. *Turkish Journal Biology, 24,* 79-93.

Topal, Ş. (1985). Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknolojide renninâ'nin yeri. *Gıda Dergisi, 10(1),* 377-388.

Vanot, G., Deyris, V., Guilhem, M.C., Luu, P.R., & Comeau, L.C. (2001). Optimal design for the maximization of *Penicillium cyclopium* lipase production. *Applied Microbiology and Biotechnology, 57(3),* 342-345.

Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., & Higton, G. (2015). *Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş*. Ankara: Palme.

Yaman, K. (2012). Bitkisel atıkların değerlendirilmesi ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üni. Orman Fakültesi Dergisi, 12(2),* 339-348

Yarkın, Z. (2007). *İki farklı fermantasyon tekniği ile Aspergillus sclerotiorum'dan amilaz üretimi ve nişasta hidrolizinde kullanılması.* (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

EKLER

EK 1. Örnek Lipaz Aktivite Hesabı

PNPP + H_2O $\xrightarrow{\text{lipaz}}$ PNP + palmitik asit

Bir ünite enzim (U), bir dakikada 1 µmol PNP açığa çıkarmak için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Monokromatik ışın demetleri için geçerli olan Lambert-Beer Kanununa göre;

$A = \varepsilon.b.C$

$\Delta A = \varepsilon.\ b\Delta C$ (b = 1 cm, ε = 13290 L/mol.cm)

Burada ε, PNF'nin farklı derişimlerinin 404 nm'de absorbansları okunarak oluşturulmuş. (A-bC) grafiğinin eğiminden bulunmuştur.

Lambert-Beer denklemi aktivite tanımı için kullanılırsa:

$$\frac{\Delta A}{\Delta T} = 13290 \frac{L}{mol.cm} * 1cm * \frac{1mol}{10^6 \mu mol} * \frac{10^3 ml}{1L} * \frac{1}{V_T}$$

ΔT (Reaksiyon süresi) = 5 dakika

V_T (Toplam çözelti hacmi) = 4 ml

$$\frac{\Delta A}{5\ dk} = 13290 \frac{L}{mol.cm} * 1cm * \frac{1mol}{10^6 \mu mol} * \frac{10^3 ml}{1L} * \frac{1}{4\ ml}$$

ΔA*0.06*$\frac{\mu mol}{dk}$=Ünite

Örnek hacmi 1 ml olduğu için Ünite = Ünite/ml'dir.

Total hacimde seyreltmeler yapıldığı için seyreltme faktörü total aktiviteye uygulanmıştır.

EK 2. İstatistiksel Analizler

Çizelge A.1. Farklı SSF ortamlarının toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
İşlem	0,222179	3	0,074060	66,05*	0,000
Hata	0,008970	8	0,001121		
Toplam	0,231149	11			

Substrat çeşitleri ile toplam lipaz aktiviteleri arasında istatiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0,05$).

Çizelge A.2. Farklı inkübasyon sürelerinin toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
İşlem	0,079360	4	0,019840	116,71*	0,000
Hata	0,000802	5	0,000170		
Toplam	0,080210	9			

İnkübasyon süresi ve toplam lipaz aktiviteleri arasında istatiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0,05$).

Çizelge A.3. Farklı sıcaklık derecelerinin toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
İşlem	0,129265	3	0,043088	281,16*	0,000
Hata	0,000613	4	0,000153		
Toplam	0,129878	7			

Sıcaklık dereceleri ve toplam lipaz aktiviteleri arasında istatiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0,05$).

Çizelge A.4. Farklı nem düzeylerinin toplam lipaz aktivitesine etkisi; 'Tek Yönlü Anova' analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
İşlem	0,180827	3	0,060276	13777,32*	0,000
Hata	0,000017	4	0,000004		
Toplam	0,180845	7			

Başlangıç nem düzeyi ve toplam lipaz aktiviteleri arasında istatiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0,05$).

Çizelge A.5. Farklı aşı miktarlarının toplam lipaz aktivitesine etkisi; ‘Tek Yönlü Anova’ analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
İşlem	0,182478	5	0,036496	511,02*	0,000
Hata	0,000429	6	0,000071		
Toplam	0,182907	11			

Aşı konsantrasyonu ve toplam lipaz aktiviteleri arasında istatiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0,05$).

Çizelge A.6. Farklı pH düzeylerinin toplam lipaz aktivitesine etkisi; ‘Tek Yönlü Anova’ analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
İşlem	0,128065	4	0,032016	214,87*	0,000
Hata	0,000745	5	0,000149		
Toplam	0,128810	9			

pH düzeyleri ile toplam lipaz aktiviteleri arasında istatiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0,05$).

Çizelge A.7. Farklı bitkisel yağların toplam lipaz aktivitesine etkisi; ‘Tek Yönlü Anova’ analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
İşlem	0,054961	2	0,027481	52,24*	0,005
Hata	0,001578	3	0,000526		
Toplam	0,056539	5			

Bitkisel yağlar ve toplam lipaz aktiviteleri arasında istatiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0,05$).

ÖZGEÇMİŞ

Meltem ÇAKMAK, 27/08/1993 Edirne'nin Keşan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Keşan'da tamamladı. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2016 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT BİLİMSEL FAALİYETLER

Aydogdu, H., Cakmak, M. A Survey of the Mycobiota in Soils Grown of Different Plants in Thrace Region, Turkey. ISEEP-2017 VIII. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL PROBLEMS. 4-7 October 2017, Çanakkale, Turkey.

Cakmak, M., Aydogdu, H. Trakya Bölgesinde Çeşitli Tarlalarda Havayla Taşınan Mikrofunguslar ve Fungal Çeşitlilik Üzerine Bir Araştırma. XIII. Uluslararası Katılımlı Ekoloji ve Çevre Kongresi, UKECEK, 12-15 Eylül 2017, Edirne, Türkiye, Abstract book pp. 550.

Aydogdu, H., Cakmak, M. Çeşitli Mikrofungus Türlerinin Tarama Besiyerlerindeki Proteolitik Aktiviteleri. 1st International Eurasia Mycology Congress. 03-05 July 2017, Manisa, Turkey. Book of Abstracts pp. 127.

Cakmak, M., Aydogdu, H. Çeşitli Mikrofungus Türlerinin Lipolitik Aktiviteleri Açısından Taranması. 1st International Eurasia Mycology Congress. 03-05 July 2017, Manisa, Turkey. Book of Abstracts pp. 126.