

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜFLERDEN KATI FAZ FERMANTASYON YÖNTEMİ
İLE LİPAZ ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Müh. Dilber Selin KARAKOÇ**

Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ŞUBAT 2006

**KÜFLERDEN KATI FAZ FERMANTASYON YÖNTEMİ
İLE LİPAZ ELDESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Müh. Dilber Selin KARAKOÇ
(506021410)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22 Aralık 2005
Tezin Savunulduğu Tarih : 01 Şubat 2006

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necla ARAN
Prof.Dr. Güldem ÜSTÜN

Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Artemis KARAALİ
Prof.Dr. Ayşe AKSOY
Doç.Dr. Yüksel GÜVENİLİR

Şubat 2006

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Lipaz Enzimi	3
2.2. Ticari Enzim Üretimi	4
2.3. Mikrobiyal Lipaz Enziminin Yapısı	5
2.4. Mikrobiyal Lipaz Enziminin Seçiciliği	7
2.5. Mikrobiyal Lipaz Enzimi Üretimi	9
2.5.1. Katı Faz Fermantasyon Yöntemi	9
2.5.1.1. Pirinç Kepeği	11
2.5.1.1.1. Pirinç Kepeği Üretimi	12
2.5.1.2. Buğday Kepeği	14
2.5.1.3. Ayçiçeği Tohumu	15
2.5.1.3.1. Ayçiçeği Tohumu Üretimi	15
2.5.1.4. Ayçiçeği Tohumu Küspesi	16
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyaller	18
3.1.1. Küf Kültürleri	18
3.1.2. Substratlar ve Kimyasal Maddeler	18
3.2. Metotlar	19
3.2.1. Mikrobiyolojik Analizler	19
3.2.1.1. Küflerin İzolasyonu	19
3.2.1.2. Küflerin İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerlerinin Bileşimleri	20

3.2.2. Lipaz Enzimi Üretiminde Kullanılan Substratların Temel Bileşen Analizleri	22
3.2.2.1. Protein Tayini	22
3.2.2.2. Yağ Tayini	22
3.2.2.3. Nem Tayini	22
3.2.2.4. Kül Tayini	23
3.2.2.5. Karbonhidrat Tayini	23
3.2.2.6. pH Ölçümleri	23
3.2.3. İnokulüm Hazırlanması	23
3.2.4. Katı Faz Fermentasyon Besi Ortamının Hazırlanması	23
3.2.5. İnokülasyon	24
3.2.6. Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu	24
3.2.7. Amonyum Sülfat ile Çöktürme Yoluyla Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	25
3.2.8. Lipaz Aktivite Tayini	25
3.2.9. Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkileri	26
3.2.10. Lipaz Enziminin Karakterizasyonu	27
3.2.10.1. Optimum pH Tayini	27
3.2.10.2 Optimum Sıcaklık Tayini	27
3.2.10.3. Hidroliz ve Esterifikasyon Aktiviteleri	28
3.2.11. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Kullanılan Substratların Bileşimi	31
4.2. Substrat Numunelerinden İzole Edilen Küf Kültürleri	31
4.3. Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Tayinleri	32
4.4. Farklı Azot Kaynakları İlavesinin Lipaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkileri	35
4.4.1. Ayçiçeği Tohumu Küşesinde Lipaz Aktivite Değerleri	36

4.4.2. Pirinç Kepeğinde Lipaz Aktivite Değerleri	37
4.5. <i>Rhizopus</i> spp. Lipaz Enziminin Optimum pH ve Sıcaklığının Saptanması	39
4.6. Lipaz Tozu Eldesi İçin Optimum Amonyum Sülfat Doygunluk Derecesinin Saptanması	42
4.7. <i>Rhizopus</i> spp. Lipaz Enziminin Hidroliz ve Esterleşme Aktivitelerinin Saptanması	43
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	48
EKLER	52
ÖZGEÇMİŞ	57

KISALTMALAR

TAG	: Triaçilgliserol
DAG	: Diaçilgliserol
MAG	: Monoaçilgliserol
EPA	: Eikosapentanoik
DHA	: Dokasoheksanoik
MEA	: Malt Ekstrakt Agar
DRBC	: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
CYA	: Czapek Yeast Ekstrakt Agar
G25N	: %25'lik Glycerol Nitrate Agar
YA	: Yağ asidi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarının, gelişen teknolojiye, artan kullanım alanları ve miktarlarına paralel olarak artması ile birlikte, dünya genelindeki enzim üretimi son yıllarda hızla artış göstermiş ve enzim üretim sektörü gelişmeye açık büyük bir pazar haline gelmiştir. Dünya genelinde üretilen enzimlerin üretimdeki paylarına bakıldığında, endüstride en çok kullanılan türlerin proteaz, amilaz, amidaz, esteraz ve lipaz olduğu gözlemlenmektedir (Pandey ve diğ. 1999).

Lipaz (triacilgliserolaçilhidrolaz, E.C.3.1.1.3) son yıllarda gelişen biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan anahtar enzim olarak önem kazanmaya başlamıştır. Lipazın önemi çok yönlü kullanım özelliğine sahip olmasından ileri gelmektedir. Lipaz enzimleri, sulu ortamlarda yağların hidrolizini gerçekleştirdiği gibi, anhidrik koşullarda mono, di ve trigliserollerin oluşumunu, yağların esterleşme ve ester değiştirme reaksiyonlarını da etkin bir şekilde katalizlemektedir. Farklı spesifik özelliklere sahip endüstriyel lipaz enzimleri, yağ ve margarin sanayi dışında, deterjan gibi çeşitli kimya sanayinde, gıda sanayinde ve tıp alanındaki biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Akoh ve Min, 1998).

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar çok çeşitli üretimler için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Endüstriyel üretimde mikrobiyal kaynaklı enzimlerin ekonomik oluşları, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmayışları açısından avantajları uzun zamandır savunulmaktadır. Amilaz, proteaz, invertaz, glikoz oksidaz, glikoz izomeras, pektinaz, renin, lipaz ve laktazı da içeren çok sayıda enzim mikroorganizmalar tarafından üretilabilmektedir. *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Endothia*, *Bacillus*, *Mucor*, *Candida*, *Micrococcus*, *Morteirello*, *Streptomyces*, *Actinoplanes* ve *Kluyveromyces* enzim üretiminde en yaygın kullanılan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen lipaz enziminin endüstriyel ölçekteki uygulamaları ve

bu alanda yapılan bilimsel çalışmalar son yıllarda bilim dünyasında büyük önem arz etmektedir (Pandey ve diğ. 1999).

Mikroorganizmalar arasında ise küfler en yüksek katalitik potansiyele ve stabiliteye sahip olan lipaz reticileridirler. Ticari olarak lipaz elde edilen başlıca küfler; *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus niveus*, *Candida rugosa*, *Aspergillus terreus* ve *Penicillium* spp. olarak sıralanabilmektedir (Ellaiah ve diğ. 2001).

Mikrobiyal kaynaklardan lipaz üretiminde kullanılan fermentasyon yöntemleri; geleneksel daldırma yöntemi ve son yıllarda üzerinde çok fazla araştırma yapılan katı faz fermentasyon tekniğinden oluşmaktadır. Katı faz fermentasyonu mikrobiyal gelişim için yeterli derecede nem ve besin öğelerine sahip katı ortam üzerinde gerçekleşen fermentasyon prosesidir. Bu fermentasyon yönteminde, buğday kepeğİ, pirinç kepeğİ, ayçiçeğİ tohumu küspesi, mısır koçanı, soya küspesi, fıstık küspesi, şeker pancarı pulpu gibi çeşitli tarımsal atık ve yan ürünlerin hammadde olarak kullanılmasının yanısıra çeşitli enzim, mantar, fermente gıda ve hayvan yemleri de retilenilmektedir (Pandey, 2003).

Bu çalışmada, pirinç kepeğİ, buğday kepeğİ, ayçiçeğİ tohumu ve ayçiçeğİ tohumu küspesi gibi çeşitli tarımsal atık ve yan ürünlerden izole edilen küflerin lipaz aktiviteleri, farklı azot kaynaklarının enzim verimi üzerine etkileri, mikrobiyal lipaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değeri ve bu değeriindeki lipaz aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca %60 doygunluk konsantrasyonunda amonyum sülfat ile çöktürme yöntemi kullanılarak kısmen saflaştırılan enzimin hidroliz ve esterleşme özellikleri araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Lipaz Enzimi

Lipolitik enzimler, TAG (Triaçilgliserol) açilhidrolaz (E.C. 3.1.1.3.) ve Fosfoglisericit açil hidrolaz olan fosfolipaz A₁ (3.1.1.3.2.) ve A₂ (3.1.1.4.) olmak üzere iki başlık altında toplanmaktadır. TAG lipazlar hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir. Hayvansal lipazlar pankreatik, gastrik, bağırsak lipazları ile sütte bulunan lipazları kapsamaktadır. Mikrobiyal lipazlar ise son zamanlarda endüstriyel uygulamalarda yer alarak gitikçe önem kazanmaktadır. Lipazlar “serin hidrolaz” grubuna ait enzimler içerisinde yer alıp, esterazlardan farklı bir sınıfa dahildirler. Özellikle su-yag fazı arasındaki iç yüzeyde substrata karşı katalitik etki göstererek, TAG’leri, DAG (Diaçilgliserol)’lere, MAG (Monoaçilgliserol)’lere, gliserol ve serbest yag asitlerine hidrolize etmektedirler. Su ile karışmayan organik çözücülerde ise lipid substratlarının esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını katalizlemektedirler. Esterazlar, suda çözünebilen substratları hidrolizlerken, lipazlar yag-su arayüzünde suda çözünmeyen esterleri de spesifik olarak katalizleme özelliğine sahiptirler. Ayrıca suda çözünmez lipid substratlarına karşı daha yüksek bir enzim aktivitesi göstermektedirler (Wong, 1995).

Temel substratlarının TAG olmasına rağmen çok geniş bir substrat aralığına sahip olduklarından bazı düşük ve yüksek molekül ağırlığına sahip esterleri, thiol esterleri, poliol/poliasit esterleri de katalizlemektedirler (Erdoğan, 2002). TAG lipaz enzimleri, koenzime gerek duymadan ve organik çözümlerin yüksek sıcaklıklarda kullanılması durumunda ortamda stabil kalabildiklerinden organik sentezlerde oldukça fazla kullanılmaktadırlar. TAG modifikasyonu durumunda ise sulu ortamda hidrolaz reaksiyonunu, organik ortamda esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını katalizleme özelliğine sahiptirler (Şahin ve diğ. 2003).

Ortamda bulunan serbest yag asitleri lipaz aktivitesini inhibe etmektedir. Bunlardan suda çözünürlüğü az olan uzun zincirli yag asitlerinin ve ayrıca yüzey-aktif maddeler olan MAG ile DAG’lerin de su-yag arayüzünde birikmeleri lipaz aktivitesini azaltan bir diğer etkidir (Şahin ve diğ. 2003).

2.2. Ticari Enzim Üretimi

Ticari enzim üretiminin başlangıcı 1890'ların başlarına kadar uzanmaktadır. Lipazlar üzerinde çalışılan en eski enzim grubudur. Literatürde, 1846 yılında ilk defa pankreasta lipaz aktivitesi ve 1871'de bitkisel tohumlarda lipaz varlığının kanıtlandığı belirtilmektedir (Fogarty ve Kelly, 1990). Takamine (1984) *Aspergillus oryzae* küfünün buğday kepeğinde katı faz fermantasyonu ile Takadiastase enzimi üretimini gerçekleştirmiş ve patent altına almıştır. İlk ticari enzim üretimi Boidin ve Effront (1917) tarafından *Bacillus* bakterisi kullanılarak amilaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiş ve patenti alınmıştır. Enzim üretiminde 1940 ve 1950 yılları boyunca artış gözlenmiş ve amilaz, katalaz, selüloz, glukoz oksidaz, invertaz, laktaz, lipaz, pektinaz ve proteaz enzimleri ticari olarak üretilmiştir. Ticari enzim üretiminin, proses tekniklerindeki ilerlemeler, kimya mühendisliği ve gıda işleme endüstrisinde enzim uygulamalarının daha sıklıkla yer alması sayesinde önümüzdeki yıllarda da gelişmeye devam edeceği belirtilmektedir (Whitehurst ve Law, 2002). Mikrobiyal lipaz üretiminde, 1988 yılında deterjan üretiminde kullanılan "Lipolase" adlı ticari lipaz, *Aspergillus oryzae* küfünden elde edilerek piyasaya sunulmuştur (Fogarty ve Kelly, 1990).

Lipazlar bitki ve hayvanların çeşitli dokularından (fare pankreası, sığır pankreası, süt), küf, maya ve bakteri gibi mikroorganizmaların kullanıldığı fermantasyon prosesleri sayesinde üretilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı lipazlar kolay, ekonomik ve ayrıca sanayi boyutlarında kullanılabilecek miktarlarda elde edilebilmektedirler. Bu nedenlerle bitkisel ve hayvansal enzimlere göre daha çok tercih edilmektedirler (Erdoğan, 2002).

Endüstriyel enzim üretiminin ekonomik boyutu 1998 yılı itibariyle 600 milyon dolar civarındadır. Novo Nordisk (Almanya) firması %50 pazar payı ile ticari enzim sektöründe dünyada birinci sırada yer almaktadır (Akoh ve Min, 1998). Tablo 2.1.'de ticari lipazlar ve üretildikleri kaynaklar görülmektedir.

Tablo 2.1: Ticari Lipazlar ve Üretilen Başlıca Kuruluşlar (Borgström ve Brockman, 1984; Fogarty ve Kelly, 1990).

Kaynaklar	Kullanım Adı	Firma
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase AİE	Amano
<i>Rhizopus japonicus</i>	Lipase Saiken	Osaka Saiken
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Lipase 80000	Gist Brocades
<i>Rhizopus delemar</i>	-	Shekiagu-kogyo
<i>Mucor miehei</i>	Lipozyme	Novo Nordisk
<i>Candida cylindracea</i>	Lipase OF 360	Meito Sangyo
<i>Pseudomonas spp.</i>	Lipase LP1	Amano
<i>Chracterium viscosum</i>	Lipase T-01	Toyo Jozo

Mikrobiyal lipazlar endüstride çok çeşitli uygulama alanlarına sahiptir. Lipaz teknolojisindeki son gelişmeler lipazların sanayide daha etkin kullanımına ait beklentiyi güçlü kılmaktadır. Lipazlar; süt yağının hidrolizi, peynir olgunlaştırılması, tereyağının modifikasyonu, fırıncılık ürünlerinin lezzet gelişimi ve raf ömrünün uzatılması, alkollü içeceklerde aroma geliştirilmesi ve fermantasyonun yağlardan arındırılarak hızlandırılması, mandracılıkta lipid hidrolizi ile yumurta kalitesinin arttırılması, deterjan sanayinde yağların alkali koşullarda hidrolizi, kozmetik alanında lipidlerin uzaklaştırılması, deri sanayinde hayvan derisinden yağların uzaklaştırılması ve kağıt sanayinde önemli problemlerden biri olan “zift oluşumunu” önleyici olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır (Palma ve diğ. 2000; Fogarty ve Kelly, 1990; Borgström ve Brockman, 1984).

2.3. Mikrobiyal Lipaz Enziminin Yapısı

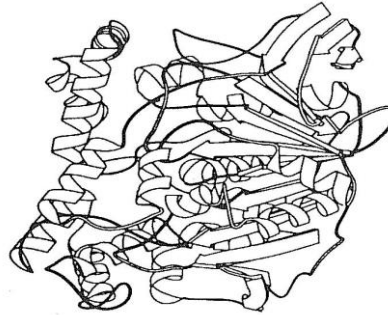
Staphylococcus hyicus, *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*, *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei* ve *Candida antarctica* gibi değişik türdeki çeşitli mikrobiyal lipazın genleri izole edilip, karakterize edilerek ve birincil yapıları uygun gelen nükleotid düzeninden çıkarılmıştır (Wong, 1995). Lipazlar, birbirlerine peptid bağları ile bağlanmış amino asitleri içeren çok büyük, kompleks protein molekülleridir. 20 ana amino asitten oluşmaktadırlar. Polipeptid zincirindeki amino asitlerin sayısı 100 ila birkaç bin arasında değişmektedir. Lipazlar elde edildikleri kaynağa bağlı olarak 20000–200000 aralığında molekül ağırlığı, pH 4-9 aralığında ve 70°C’ye kadar olan

sıcaklıklarda aktivitelerini koruyabilen enzimlerdir (Erdoğan, 2002). Tablo 2.2’de değişik küflerden elde edilen mikrobiyal lipazların moleküler özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.2: Farklı Küf Lipazlarının Moleküler Özellikleri (Borgström ve Brockman, 1984).

Lipaz Kaynağı	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>		<i>Rhizopus delemar</i>	
Moleküler ağırlık	38 000	54 000	27 500	<u>A-Lipaz</u> 27 000	<u>B-Lipaz</u> 36 000	<u>A-Lipaz</u> 44 000	<u>B-Lipaz</u> 45 000
İzoelektrik nokta	4,3	4,3	-	4,9	4,1	7,3	8,2
Optimum pH	5,6	6,3	8,0	7,5	5,8	5,6	5,6
Optimum sıcaklık	25°C	40°C	60°C	35°C	40°C	35°C	35°C
pH kararlılığı	2,2-6,8 (30°C/24saat)	4,2-9,8 (30°C/24saat)	6-10 (45°C/1saat)	6,5-9,0 (30°C/17 saat)	4,0-6,5 (30°C/17 saat)	3-8 (30°C/24 saat)	4-7 (30°C/24 saat)
Sıcaklık kararlılığı	50°C (pH 5,6/ 15 dak.)	55°C (pH 5,6/ 15 dak.)	60°C (pH 8/ 20 dak.)	30°C (pH 6.0/15 dak.)		65°C (pH5.6/ 15 dak.)	45°C (pH5,6/ 15 dak.)

Geotrichum candidum küfü (Şekil 2.1) değişik izoformlarda (lipaz I ve II) ekstraselüler lipaz meydana getirmektedir. Bu iki lipaz izoformun genleri kodlanarak izole edilmiştir. 554 aminoasit kalıntısından oluşan Lipaz I’in moleküler ağırlığı 59085’dir. Beş adet Cys ile %7 karbonhidrat (çoğunlukla mannoz) içermektedir. Lipaz II ise, 544 aminoasit kalıntısından oluşmuş, 59550 moleküler ağırlığına ve dört adet Cys ile %6,6 karbonhidrat içermektedir. Bu iki izozimde %84 oranında benzerlik göstermektedir (Wong, 1995).



Şekil 2.1: *Geotrichum Candidum* Mikrobiyal Lipazının Stereo Görüntüsü (Wong, 1995).

Geotrichum candidum’dan elde edilen lipaz I’in aktif kısmı, iki paralel α helis kapağıyla gizlenmiş His463-Ser217-Glu354 katalitik üçlüsünden meydana gelmektedir. Hidrofobik özelliği yüksek olan bu helis yapıların açılmasıyla oluşan biçimsel

değişiklikler substratın katalitik kısımlara geçmesini sağlamaktadır. Bu lipaza %45 oranında benzerlik gösteren *Candida cylindracea* lipazında ise, Asp yine, Glu ile birlikte katalitik üçlüde yer almaktadır. *Rhizomucor miehei* lipazı da A ve B olmak üzere iki izoforma sahiptir. His 257, Ser144 ve Asp203 aminoasit kalıntılarının birlikte oluşturduğu “katalitik üçlüsü”nü içeren tek bir etkin alana sahiptir. *Candida antarctica*’dan elde edilen B lipazı da yapısal olarak benzer özellikler göstermektedir: merkezde yer alan α/β bükümü, aktif katalitik üçlüsü kısmı ve sarmal kapak hareketi. *Pseudomonas glumae*’den elde edilen bakteriyel lipaz ile *Candida rugosa* lipazının üç etkin alanlı yapıya sahip olduğu belirtilmiştir (Wong, 1995).

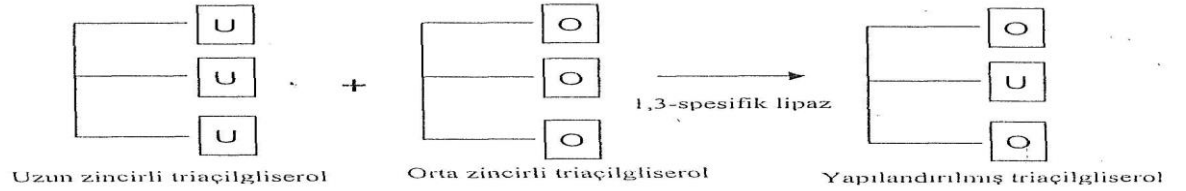
2.4. Mikrobiyal Lipaz Enziminin Seçiciliği

Lipaz aktivitesi ve seçiciliği lipazın tanımlanması için gerekli özelliklerdir. Lipazlar, yağ asitlerinin özelliklerine ve konumlarına göre TAG’ları sentezler veya hidrolizler. Sulu ortamlarda hidroliz baskın reaksiyon olup, TAG gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlenirken; organik ortamlarda mevcut suyun miktarı sınırlandığından reaksiyon TAG sentezlemek için ters dönebilir. Transesterifikasyon gibi yağların esterleşme ve ester değiştirme reaksiyonlarını etkin bir şekilde katalizler veya organik reaksiyonlar oluşabilir. İşte tüm bu reaksiyonlar mikrobiyal kaynaklardan elde edilen lipazların seçiciliği ile gerçekleşmektedir.

Lipaz enzimi üç ayrı şekilde seçicilik gösterir (Şahin, ve diğ. 2003; Can, 2004; Borgström, ve Brockman, 1984).

i. Substrat seçiciliği: Lipazlar, özel yağ asitlerine ve uzun, kısa veya orta zincir uzunluğundaki yağ asitlerine karşı spesifiktir. Örnek: *Geotrichum candidum* lipazı C-9 veya cis-9,12 ikili bağlara sahip uzun zincirli yağ asidine özgü seçicilik gösterirken, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazı hem orta hem de kısa zincirli yağ asitlerine karşı spesifiktir. Lipazlar sahip oldukları bu yağ asitleri seçiciliği sayesinde kısa zincirli yağ asitlerinin süt aroması olarak kullanılmak üzere üretiminde ve gıdaların uzun zincirli çoklu doymamış EPA (Eikosapentanoik Asit, 20:5) ve/veya DHA (Dokasoheksanoik Asit 22:6) gibi yağ asitlerince zenginleştirilmesinde kullanılabilmektedirler.

ii. Pozisyon seçiciliği: Bu gruptaki lipazların, sterik engeli nedeniyle sn-2 pozisyonundaki yağ asidinin aktif bölgeye girmesi engellenmektedir. Sadece sn-1,3 pozisyonunda yer alan dıştaki ester bağlarını parçalarlar (Şekil 2.2). Bu sn-1,3 spesifik lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon tepkimesi sonucunda ortamda TAG, 1,2 ve 2,3 DAG ve serbest yağ asitlerini içeren karışım oluşmaktadır. *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor javanicus* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar, sn-1,3 spesifik lipazlara örnek olarak verilmektedir. Bu gruptaki lipazlar, yağların enzimatik interesterifikasyon işleminde kullanılarak besinsel açıdan zenginleştirilmesini sağlamaktadırlar. Besin açısından değerli olan yağ asidi sn-2 pozisyonunda tutulur ve, 1 ve 3 pozisyonlarındaki yağ asitlerinin kompozisyonları istenen şekilde değiştirilerek spesifik TAG yapısı elde edilebilmektedir.



Şekil 2.2: 1,3-spesifik Lipaz Enzimi Varlığında Gerçekleşen Transesterifikasyon Reaksiyonu (Can, 2004).

iii. Stereospesifiklik: Lipaz enziminin rasemik karışımlarda bulunan molekül formülleri birbirine eşit, ancak atomların üç boyutlu yerleşimi birbirlerinin ayna aksi olan izomerlerden birine ilgi göstermesi ve onunla reaksiyona girebilmesidir. TAG'ların sn-1 ve sn-3 pozisyonlarındaki bu sterik farkından dolayı çok az lipaz buradaki esterleri ayırt edebilme özelliğine sahiptir. Bu tip lipazların katalizlediği reaksiyonlarda 1 ve 3 pozisyonları farklı hızlarda hidrolizlenir. *Candida rugosa*, *Chromabacterium viscosum*, *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmaların yer aldığı bu grupta, *Pseudomonas* belirli açıl gruplarını hidrolizleyerek stereospesifiklik gösterir. Son yıllarda, rasemik karışımların kullanıldığı ilaç sanayinde lipaz enzimlerinin stereospesifikliği büyük gelişmelere olanak sağlamıştır. Stereoizomerlerin ayrılması veya sentezlenmesinde lipaz enzimlerinin kullanılabilmesi, lipazların stereospesifik olarak üretilmesi yolundaki çalışmaların hızlanmasına yol açmıştır.

2.5. Mikrobiyal Lipaz Enzimi Üretimi

Endüstriyel olarak üretilen lipaz enziminin büyük bir kısmı mikrobiyal fermantasyon prosesi kullanılarak üretilmektedir. Enzim üretiminde ilk aşama belli bir enzim tipini üretebilecek en uygun mikroorganizmayı seçmektir. Kültür ortamı, mikroorganizmaların gereksinim duyduğu temel besin maddelerini ve istenen enzimin sentezi için gerekli indükleyici maddeleri içermelidir. Fermantasyon, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen gibi kontrollü çevre koşullarında mümkün olan en fazla miktarda enzim üretimini sağlayan bir yöntemdir. Lipaz enzimleri genellikle hücrelerden kültür ortamına geçebilen ekstraselüler enzimler olduğundan, fermantasyon sonunda, hücrelerden filtrasyon veya santrifüjlemeyle ayrılabilirler. Mikroorganizma gelişiminin ve enzim üretiminin en fazla gerçekleşeceği fermantasyon yöntemleri daldırma ve katı faz fermantasyon yöntemleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Mikrobiyal lipaz üretiminin katı faz fermantasyon yöntemi ile küflerden eldesine yönelik çalışmalar son yıllarda büyük bir artış göstermiştir (Demain ve Davies, 1999).

2.5.1. Katı Faz Fermantasyon Yöntemi

Katı faz fermantasyonu, mikrobiyal gelişim için yeterli derecede neme ve besin öğelerine sahip olan katı madde üzerinde gerçekleşen fermantasyon prosesidir (Pandey, 2003). Sterilize olmuş katı faz üzerine mikroorganizma inokülasyonu ile fermantasyon başlar ve kültürün katı substrat da gelişimi ile enzim üretimi gerçekleşir. Buğday kepeği, pirinç kepeği, ayçiçeği tohumu küspesi, mısır koçanı, soya küspesi, fıstık küspesi, şeker pancarı küspesi gibi çeşitli zirai atık substrat olarak kullanılabilir. Substrat kimyasal veya ısısal işlemle sterilize edildikten sonra mikroorganizma inokülasyonu ile steril odalarda bulunan sıcaklık, rutubet gibi faktörlerin kontrol edildiği reaktör tavalarında fermantasyon gerçekleştirilmektedir. Spesifik olarak seçilmiş olan katı substratın üzerinde veya etrafında 5 ila 12 gün boyunca mikrobiyal gelişme ve ürün oluşumu gözlemlenir. Bu proses sonunda, katı substratları içeren reaktör tavaları mikrobiyal biyomas ile tamamen kaplı hale gelmektedir. Tavaların üzerindeki bu kütle geniş ekstraksiyon kaplarına aktarılır. İstenmeyen katı partiküller suyla yıkama aşamasında giderilir. Lipaz ekstraktları, daha sonra ekstraksiyon sıvısına geçen mono ve oligosakkaritlerden, nükleotidlerden, serbest amino asitlerden vb. çözültide kalan diğer

maddelerden çöktürülerek kurtarılmaktadır. Proteinlerin çöktürülmesi, ortamın pH'ı ve ortamdaki organik ve tuz konsantrasyonlarının değiştirilmesiyle sağlanmaktadır. Örneğin, pH, enzimin izoelektrik noktasına ayarlanabilir (izoelektrik çöktürme); solvent ilavesi ile ortamın dielektrik sabiti değiştirilerek çöktürme (aseton ile çöktürme) yaptırılabilir veya yüksek bir tuz konsantrasyonunda proteinlerin sudaki çözünürlüğü azaltılarak çökmesi (amonyum sülfatla fraksiyonlama) sağlanabilir. Lipaz enzimleri, çöktürme yoluyla ön saflaştırma işleminin sonrasında, istenildiği ileri derecede saflaştırılabilmektedir. İleri saflaştırma yöntemleri olarak, elektroforez, değişim kromatografisi, jel filtrasyonu ve afinite kromatografisi yöntemlerinin biri veya birkaçı kullanılabilir. Genellikle enzimlerin tam bir karakterizasyonu istendiği koşullarda bu işlemler uygulanmaktadır (Whitehurst ve Law, 2002; Demain ve Davies, 1999).

Katı faz fermantasyon yöntemi kullanılarak lipaz enziminin üretilmesine uygun olan mikroorganizmalar; *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Penicillium* ve *Mucor*'dur. Ortam su aktivitesinin daha düşük olması nedeniyle bakteriyel kontaminasyon kontrol altına alınabilmektedir (Pandey ve diğ. 2000).

Katı faz fermantasyonunda substrat seçimi de önemli olan bir diğer faktördür. Seçilen substrat mikroorganizmanın gelişimini sağlayabilecek tüm besin maddelerini yeteri miktarda sağlamalı ve ayrıca onun için kolay gelişme ortamı yaratmalıdır. Ayrıca, düşük maliyetli, kolay temin edilebilen maddelerin substrat olarak seçilmesi gerekir. Substrat mikroorganizma gelişimi için besin açısından yetersiz ise inokülasyon öncesi, substrata çeşitli azot ve karbonhidrat kaynakları ile zenginleştirme işlemi gibi kimyasal veya mekanik çeşitli uygulamalar yapılabilmektedir.

Fermantasyon proseslerinde bazı maddeler ürün sentezini teşvik etmektedir. Elibol ve Özer (2000), immobilize *Rhizopus arrhizus* ile yaptığı daldırma yöntemiyle lipaz üretimi çalışmasında indükleyici varlığının lipaz üretimine etkisini incelemiş ve mısır yağı varlığında lipaz aktivitesinin 2,5 kat daha fazla olduğunu belirtmektedir. Aynı şekilde Valero ve diğ. (1988), zeytinyağın maya üretimini teşvik ederek lipaz aktivitesini arttırdığını belirtmektedir. Fadiloğlu ve Erkmén (1999), zeytinyağı, çay yağı ve oleik asit gibi substrat benzeri bileşenlerinin lipaz aktivitesini arttırdığını belirtmektedir. Ellaiah ve diğ. (2001), farklı zeytinyağı konsantrasyonlarının *Aspergillus niger* küfünden

elde edilen lipaz üretimine etkisini inceleyerek, maksimum lipaz üretiminin (4290 U/L) %1 oranındaki zeytinyağı ilavesi ile elde edildiğini belirtmektedir. Bu sonuç zeytinyağının lipaz indükleyici olduğunu göstermektedir.

Katı faz fermantasyonunda substrat olarak genellikle tarımsal atık ve yan ürünler kullanılmaktadır. Pirinç küspesi ve kepeği, buğday kepeği, yağlı tohum küspeleri, şeker kamışı ve pancarı küspesi, kahve tohumu küspesi bu amaçla kullanılan başlıca tarımsal atık ve/veya yan ürün arasında yer almaktadır (Pandey ve diğ. 2000).

Kamini ve diğ. (1998), *Aspergillus niger* küfünden katı faz fermantasyonu ile değişik substratlardan lipaz üretimini inceleyerek buğday kepeğinden (214,3 U/g) en yüksek lipaz aktivitesinin elde edildiğini belirtmektedir.

Mahadik ve diğ. (2002), *Aspergillus niger* NCIM küfünü çeşitli tarımsal atıklar üzerinde geliştirerek katı faz fermantasyon yöntemiyle lipaz üretimini gerçekleştirerek, bu doğal substratlar arasında enzim üretimini en fazla teşvik eden katı besiyerinin, buğday kepeği olduğunu belirtmektedir.

ul_Haq ve diğ. (2002), katı faz fermantasyon yöntemini kullanarak buğday kepeğinde 30°C sıcaklıkta, 48 saat boyunca, 10 farklı küf türünün inkübe edildiğini, bu mikroorganizmaların lipaz aktivitelerine göre incelenerek, en fazla lipaz aktivitesinin 30 U/g değeriyle, *Rhizopus oligosporus* küfү tarafından elde edildiğini belirtmektedir. Diğer küf türlerinin ise ancak 7 U/g seviyesinde lipaz aktivitesi gösterebildikleri ayrıca belirtilmektedir.

2.5.1.1. Pirinç Kepeği

Pirinç tanesi, hasat edildiğinde ham pirinç veya çeltik olarak bilinir ve %18-20'si kavuzdur. Kavuz uzaklaştırıldıktan sonra tanenin görünür rengine bakılmaksızın esmer pirinç olarak adlandırılır. Pirinç kepeği ise esmer pirincin üst tabakası yani kavuzun hemen altındaki tabaka olup kabuk soyma (pealer) makinelerinin aşındırıcı etkisi ile uzaklaştırılmaktadır.

Pirinç kepeği esas olarak perikarp , testa ve alöron ile toz haline gelmiş embriyo ve bir miktarda nişastalı endosperm'den oluşmuştur (Saunders, 1990). Ancak uygulanan parlatma derecesine bağlı olarak bir miktar nişastalı endosperm de öğütülerek kepeğe

karışmaktadır. Çeltiğin çeşidine, öğütme derecesine ve öğütülmüş pirincin derecesine bağlı olarak çeltiğin ağırlığının %8-10'u miktarında pirinç kepeği elde edilmektedir.

Pirinç tanesinin alöron tabakası ile hemen bunun altında depolamış olan yağlar, cilalama işlemi ile tamamen pirinç kepeğine geçtiğinden pirinç kepeği, ortalama %20 yağ içeriği ile soya ve pamuk tohumu gibi yağ içeren bitkisel bir yağ hammaddesi durumundadır (Sayre, 1988). Tablo 2.3'de Pirinç kepeğinin ortalama bileşen miktarları % olarak verilmektedir .

Tablo 2.3: Pirinç Kepeğinin Bileşimi (Carroll, 1990).

Bileşen	Bileşim (%)
Nem	8-12
Protein	12-16
Yağ	16-22
Ham elyaf	8-12
Kül	7-10

Pirinç kepeği Tablo 2.3.'de görüldüğü gibi besleyici değeri yüksek olan bir maddedir. Proteini ve yağı dışında içerdiği doğal vitaminlerden, vitamin B kompleksi ve vitamin E yönünden de oldukça zengindir. Bu nedenle son yıllara kadar hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında pirinç tarımının yaygın bir şekilde yapıldığı diğer ülkelerde örneğin Japonya, Hindistan, Burma ve Amerika'da endüstriyel yağ hammaddesi olarak değerlendirilmektedir (Carroll, 1990; Saunders, 1985).

Venkata ve diğ. (1993), mikroorganizma olarak *Candida rugosa*'nın kullanıldığı pirinç kepeği substratında gerçekleşen katı faz fermantasyonu prosesinde, 48 saatin sonunda maksimum lipaz aktivitesine (37 U/g) ulaşmaktadır.

2.5.1.1.1. Pirinç Kepeği Üretimi

Çeltik, dünyanın her kıtasında yetiştirilmektedir. Çin, Hindistan, Endonezya, Bangladeş, Vietnam, Japonya ve Amerika çeltik üretiminde önemli ülkelerdir. Tablo 2.4'de Dünya'da pirinç üreten belli başlı ülkelere ait ham pirinç, pirinç, pirinç kepeği ve yağı potansiyelleri gösterilmektedir. Dünya çeltik üretimi incelendiğinde, en büyük üretici ülke durumunda olan Çin Halk Cumhuriyeti, 1997 rakamlarıyla dünya çeltik üretiminin %37,5'ine sahip olup bu ülkeyi %21,6'lık bir payla Hindistan izlemektedir.

Tablo 2.4: 1997 Yılında Dünya’da Üretilen Çeltik, Pirinç, Pirinç Kepeği ve Pirinç Kepeği Yağı Potansiyeli (Tüm değerler x 1000 ton) (FAO, 1997)

Ülkeler	Ham Pirinç (a)	Pirinç (b)	Pirinç Kepeği (c)	Pirinç Kepeği Yağı Potansiyeli (d)
Çin	202 701	134 999	10 780,0	1 617,0
Hindistan	125 263	83 425	6 674,0	1 001,1
Endonezya	49 253	32 802	2 624,0	393,6
Bangladeş	28 182	18 769	1 501,5	225,2
Vietnam	27 645	18 411	1 472,9	220,9
Tayland	22 431	14 939	1 195,1	179,3
Japonya	12 531	8 346	667,7	100,2
Filipinler	11 269	7 505	600,4	90,1
Brezilya	9 293	6 189	495,1	74,3
Dünya	579 575	385 997	30 789,8	4 632,0

a. FAO

b. Çeltiğin 0,666’sı olarak tahmin edilen pirinç miktarı.

c. Pirincin %8’i olarak hesaplanan pirinç kepeği.

d. Kepeğin %15’i olarak hesaplanan pirinç kepeği yağı.

Ülkemizdeki çeltik ekim alanı, üretim ve verim miktarları Tablo 2.5’de verilmiştir. Türkiye, çeltik tarımı için uygun bir ekolojiye sahip olmasına rağmen sulama olanaklarının yetersizliği, çeltik tarımının gelişmesini önemli ölçüde kısıtlamaktadır.

Tablo 2.5: 1990-1996 Yılları Arası Çeltik Ekiliş, Üretim ve Verim Miktarları (Yücel, 1999)

Yıllar	Ekiliş Alanı (Hektar)	Üretim (Ton)	Verim (kg/da)
1990	53 000	230 000	434
1991	40 000	200 000	495
1992	43 000	215 000	500
1993	45 000	225 000	500
1994	41 000	202 000	493
1995	52 051	269 123	517
1996	544 999	287 955	528

Çeltik, ülkemizde toplam tahıl ekim alanı içinde ancak %0,31; üretimde ise %0,74 pay almaktadır. Çeltik tarımı 40 ilde yapılmakta, üretim özellikle Marmara ve Karadeniz bölgelerinde yoğunlaşmaktadır. Bu iki bölgemiz 1996 yılı rakamlarıyla Türkiye çeltik ekiliş ve üretiminin yaklaşık %91’ini oluşturmaktadır. Bu bölgelerde üretimi yapılan çeltiğin verimi dünya ortalamasının (335 kg/da) çok üzerindedir. Ülkemizde ortalama

Çeltik verimi 528 kg/da'dır. GAP projesinin devreye girmesi ile Türkiye eltik üretiminin 1996 yılı rakamlarına göre 2 katına çıkması planlanmaktadır. GAP bölgesindeki eltik ekim alanının 38 217 hektar olması öngörülmüştür. Üretim miktarının ise 141 838 ton pirinç olacağı tahmin edilmektedir. Bu da yaklaşık 230-240 bin ton eltik demektir ki bu miktar řu anda Türkiye'de üretilen eltik miktarına eşittir. Türkiye'de ortalama eltik üretimi 180 000 ton/yıl olarak alındığında yılda yaklaşık 36 000 ton kabuk ve 12 600 ton pirinç kepeği elde edildiği belirtilmiştir (Yücel, 1999).

2.5.1.2. Buğday Kepeği

Buğday tanesinin uzunlama kesiti incelendiğinde endosperm, kepek, ve germ (ruşeym) olmak üzere üç ana kısımdan oluştuğu görülmektedir. Kepek, tanenin yaklaşık %14,5'lik kısmını oluşturur. Çoğunlukla ğtme sırasında uzaklaştırılıp yem olarak kullanılmakla beraber tam dane unu (düz kırma) tüm kepeği içerir.

Lisin buğdayda ve çoğu hububatta sınırlı temel aminoasittir. Protein miktarı tür, çeşit, evre koşulları (iklim, toprak, hastalık ve zararlılar) ve üretim koşullarına (gübreleme, sulama, makinalı tarım) bağlı olarak %6-22 arasında değişmektedir. Buğday tanesinin lipid içeriği tipik olarak %2-4 arasında olup tane içinde düzenli bir dağılım göstermemektedir. Vitaminler buğday germi ve kepeğinde yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, mineraller özellikle kepekte yoğunlaşmıştır. Madensel maddeler endospermde %0,3, kepekte %6-8 kadar olup dıştan içe doğru azalmaktadır. Ortalama %1,34 - 2,1 arasında değişen külün bileşimi yetiştiği topraktaki mineral madde miktarına ve gübreleme durumuna bağlı olmaktadır (nal ve diğ. 1996).

Dünya buğday üretimi 2004 hasat yılında 624 milyon tona ulaşırken, Türkiye tahmini buğday üretimi 19 milyon ton olarak varsayılmaktadır. Azot gübrelemesi ve yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesi buğday üretimine önemli katkıda bulunmaktadır.

2.5.1.3. Ayçiçeği Tohumu

Ayçiçeği tohumu ülkemizde ve dünyada yağlık ve çerezlik olmak üzere iki farklı tipte üretilir. Çerezlik tipteki ayçiçeği tohumları çizgili ve iri, yağlık tiplere göre kalın kabuklu olup, kabuğu çabuk ayrılmaya müsaittir. Bu tiplerden iri olmayanlar, kuşyemi olarak değerlendirilmektedir. Yağlık tiplerden daha düşük yağ oranına ve test ağırlığına sahiptirler. Yağlık ayçiçeği tohumları ise, genelde siyah renkli, ince kabuklu ve linoleik ve oleik yağ asitleri içeren tiplerdir. Taneleri %38-50 arasında yağ ve %20 oranında protein içerir. A, B, D ve E vitaminleri dışında kalsiyum, demir, fosfor, sodyum ve potasyum gibi mineralleri de ihtiva eder. Yağı kolay sindirilen ayçiçeği tohumunda vücuda gerekli 8 temel amino asit bulunduğundan en değerli protein kaynakları arasında sayılabilir (Türkay, 1980).

2.5.1.3.1. Ayçiçeği Tohumu Üretimi

Ülkemizin bitkisel yağ üretiminde %50 ile en büyük payı alan ve yağ bitkileri üretiminde başta gelen ayçiçeği, başta Trakya, Ege ve Karadeniz Bölgesi olmak üzere birçok bölgemizde yetişebilmektedir. Ülkemizde hayvan yemi olarak ayçiçeği küspesi kullanımı, diğer yem ve yağ bitkileri arasında giderek önem kazanmaktadır. Tohumlarında %45-50 oranındaki yağ içeren ayçiçeği, margarin ve yağ sanayinde kullanılmakta, çerez olarak tüketilmekte ve küspesinden de hayvan yemi olarak yararlanılmaktadır. Ayçiçeği tohumu hayvan beslenmesinde silaj olarak da değerlendirilebilmektedir. Ülkemizdeki yağlık ayçiçeğinin mevcut durumu (Oil World Annual, 2002) Tablo 2.6’da verilmiştir.

Tablo 2.6: Ülkemizdeki Ayçiçeği Ekim Alanı, Üretim, Verim, Ayçiçeği Tohumu İşleme, İthalat ve İhracat Miktarları (Kaya, 2004)

Yıllar	Ekim Alanı Ha	Üretim Bin Ton	Verim Kg/Da	İşleme Bin Ton	İthalat Bin Ton	İthalat Milyon \$	İhracat Bin ton	İhracat Milyon \$
1997	560	672	120	1122	545	139,8	4	1,2
1998	586	850	145	1355	679	177,1	5	1,2
1999	595	820	138	1400	484	121,0	6	1,5
2000	540	630	117	1200	523	104,6	5	1,0
2001	580	530	110	900	267	60,1	5	1,1

2.5.1.4. Ayçiçeği Tohumu Küspesi

Ayçiçeği kabuğu her bitkide olduğu gibi, taneyi kaplar ve dış etmenlerden korur. Yağlık ayçiçeği tohumunun toplam ağırlığın yaklaşık %21-30'u kabuktur. Çerezlik çeşitlerde bu oran %36-50 arasında değişir. Ancak  erezlik ve yağlık tiplerin kimyasal kompozisyonları arasında,  erezliklerin biraz daha fazla lif içermesi hariç, belirgin bir fark yoktur. Ayçiçeğinde tanedeki kabuk ve yağ oranı arasındaki ters bir korelasyon söz konusudur. Tanedeki yağ oranı arttıkça kabuk oranı düşer. İyi bir yağlık ayçiçeği hibrit  eşitdin tanesindeki yağ oranı %50'nin üzerinde ve kabuk oranı ise, %20 civarında olmalıdır. Gerek yağlık, gerekse  erezlik taneler, yüksek oranda lif (ham selüloz) düşük miktarlarda da ham yağ ve k l içerir. Kabuktaki selüloz, lignin, hemi-selüloz miktarları %74-90 olup, arta kalan kısmı da lipit, protein ve mineral maddelerdir. Kabuğun kimyasal bileşimi Tablo 2.7'da verilmiştir. Ülkemizde ayçiçeği işleyen bazı fabrikalarda kabuk tamamen küspe eldesinde kullanılmaktadır. Ayçiçeği kabukları sığır yetiştiriciliğinde saman yerine altlık olarak kullanılabilir.       saman ile aynı oranda sıvı emme kapasitesine sahiptir. Ayrıca bu kabuklar kereste endüstrisinde dolgu ve yalıtım maddesi, biyolojik yakıt eldesinde ve paketleme materyali olarak da kullanılır. Ayrıca, Kanada'da silindir şeklinde preslenerek  ıra malzemesi ve Rusya'da da etil alkol ve boya malzemesi eldesinde kullanılır Ayçiçeği kabuğunun bir diğer kullanım alanı da, özellikle de bazı türlerde kabuğunda içerdiği antosiyanin olarak bilinen kırmızı boya maddesi nedeniyle gıdalarda doğal katkılı boya olarak kullanılmasıdır (Dorrel ve Vick, 1997).

Ülkemizdeki ayçiçeği küspesi tüketimi yıllara göre değişmekle birlikte, 550-850 bin ton civarındadır. Bu ihtiya ın çoğunluğu ülkemizde işlenen ayçiçeğinden karşılanmakla beraber, son yıllarda yurt dışında oluşan fiyata ve uygulanan gümrük vergilerine de bağlı olarak, oldukça yüksek oranda bir ithalat söz konusu olmaktadır. Küspe ithalatımızın büyük çoğunluğu genelde Rusya, Ukrayna, Romanya ve Bulgaristan'dan gerçekleştirilmektedir. Ülkemizdeki ayçiçeği küspesi tüketim, ithalat ve ihracat miktarları (Oil World Annual, 2002) Tablo 2.8'de verilmiştir.

Tablo 2.7: Ayçiçeği Tohumu Kabuğunun Kimyasal Bileşimi (Dorrel ve Wick, 1997)

Bileşen	Miktar
Kuru Madde	%85-92
Ham Protein	%3,5-9
Hazmolunabilir Protein	%2-4
Hazmolunabilir Besin Maddesi Toplamı	%35-45
Ham Selüloz	%40-50
Lignin	%13-16
Kül	%2-3
Yağ	%0,05-3
Ca	%0,37
Mg	%0,15-0,25
P	%0,12

Tablo 2.8: Ülkemizdeki Ayçiçeği Küspesi Tüketim, İthalat ve İhracat Miktarları (Kaya, 2004)

Yıllar	Üretim (BinTon)	İthalat (Bin Ton)	İhracat (Bin Ton)	Ülke içi Tüketim (Bin Ton)
1997	538	24	2,0	560
1998	650	31	-	682
1999	672	133	-	805
2000	580	281	2,3	859
2001	435	120	1,5	553

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Kf Kültürleri

Katı faz fermantasyon yöntemi ile küflerden lipaz enzimi üretiminin incelendiği bu çalışmada kullanılan kf kültürleri, piyasadan temin edilen ayçiçeği tohumu küspesi, pirinç kepeği, buğday kepeği ve ayçiçeği tohumları kullanılarak İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm laboratuvarlarında, tarafımızca izole edilerek *Aspergillus candidus*, *Aspergillus versicolor*, *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. ve *Ulocladium* spp. olarak tanımlanmışlardır.

Rhizopus oryzae (70083-947-D1) kf kültürü ise, TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü'nden liyofilize formda temin edilmiştir.

Kf kültürleri MEA (Malt Ekstrakt Agar) (Merck, Dramstadt, Almanya) zerinde 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir. İnokülasyon işlemleri öncesinde stok kültürler MEA içeren petrilerde 25°C'de 7 gün inkübe edilerek tazelenmişlerdir.

3.1.2. Substratlar ve Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan buğday kepeği ve pirinç kepeği Torunlar Gıda San. ve Tic. A.ř. 'den (Bandırma-Balıkesir), ayçiçeği tohumu ve ayçiçeği tohumu küspesi Trakya Birlik A.ř. (Çorlu-Tekirdağ) 'dan temin edilmiş ve analiz süresine kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

Çalışma kapsamında yapılan analizlerde kullanılan kimyasallar laboratuvarda literatürde belirtilen formülasyonlara uygun olarak hazırlanmıştır.

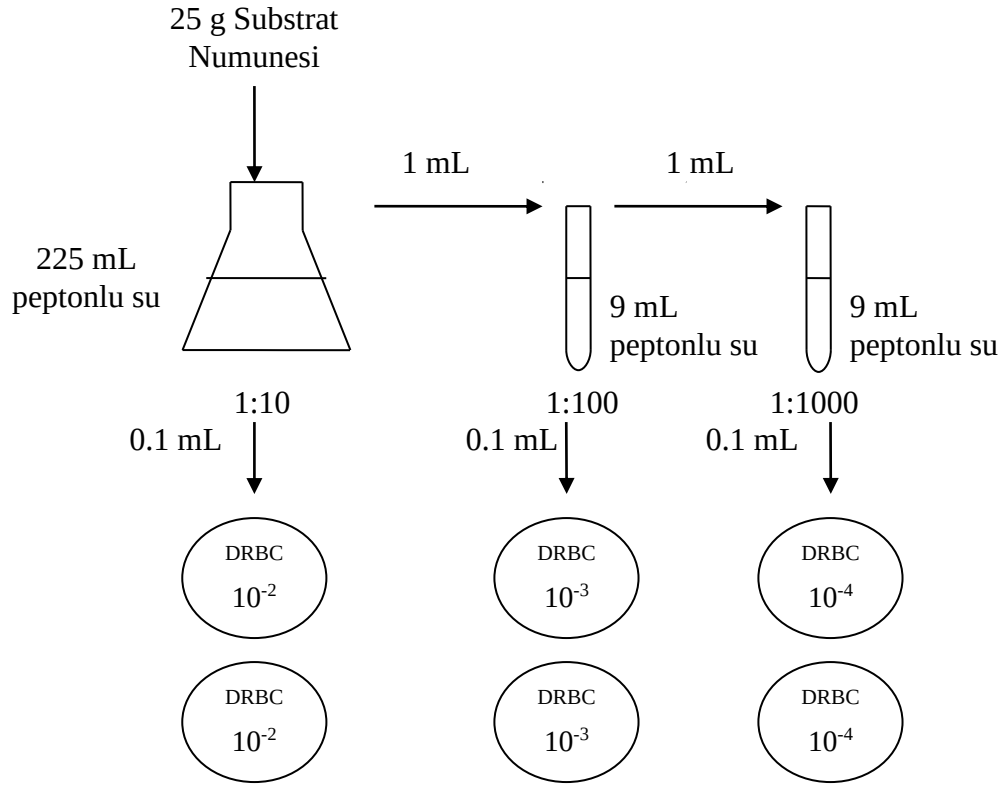
3.2. Metotlar

3.2.1. Mikrobiyolojik Analizler

3.2.1.1. Küflerin İzolasyonu

Küf izolasyonları sırasıyla DRBC Agar (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar, Acumedia, ABD) ve MEA besiyeri kullanılarak seyreltim ve direkt ekim yöntemleri ile yapılmıştır.

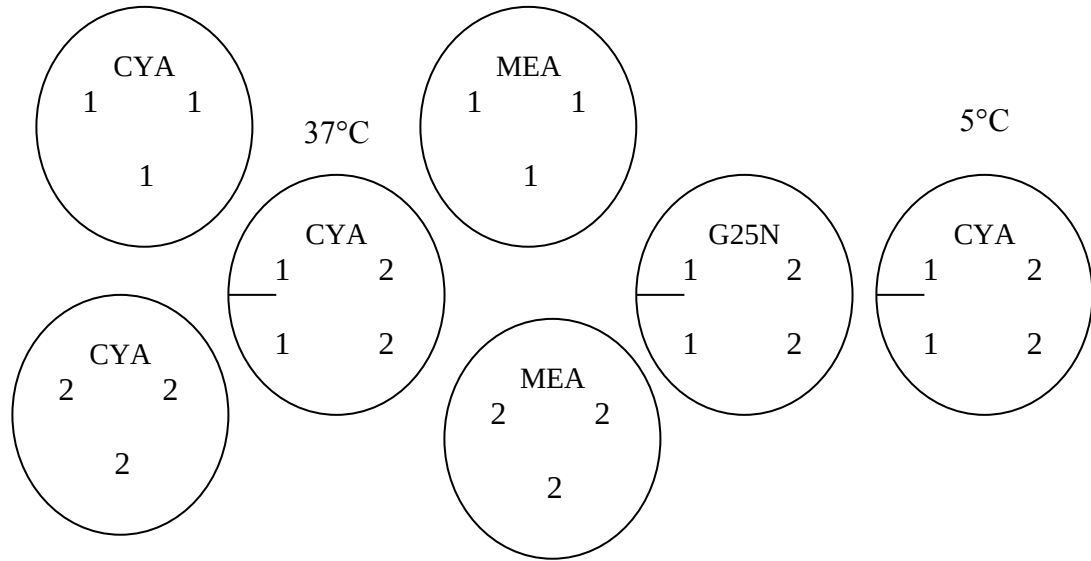
Substrat numuneleri (25 g) 225 mL peptonlu su içinde homojenize edilmiş, 30 dak. beklendikten sonra DRBC üzerine yayma plak yöntemiyle inokülasyon yapılmış ve petriler 25°C’de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Küf izolasyonunun şematik gösterimi Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1: Küf İzolasyonunun Şematik Gösterimi

DRBC besiyerinde 25°C’de inkübe edilen petriler incelenerek steril bir öze ile MEA, CYA (Czapek Yeast Ekstrakt Agar) ve G25N (%25’lik Glycerol Nitrate Agar) besiyerlerine üç nokta olacak şekilde ekilmiştir. Besiyerleri 7 gün için üç farklı sıcaklık derecesinde; 5°C, 25°C ve 37°C’de geliştirilmiştir. İdentifikasyon yönteminin şematik gösterimi Şekil 3.2’de verilmiştir. İnkübasyondan sonra morfolojik ve mikroskopik özellikler incelenerek Samson ve diğ. (1995) ve Pitt ve Hocking (1997) tarafından belirtilen özellikler dikkate alınarak küfler tanımlanmıştır.

Ayrıca, substrat numunelerinden direkt ekim yöntemiyle de DRBC ve MEA Agarlara inokülasyon yapılmış ve petriler 25°C’de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2: Küf İzolatlarının İdentifikasyonunun Şematik Gösterimi (Pitt ve Hocking, 1997).

3.2.1.2. Küflerin İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerlerinin Bileşimleri

Çalışmalarda kullanılan CYA Agar ve G25N besi yerleri aşağıda belirtilen formülasyonlarda (Pitt ve Hocking, 1997) hazırlanmıştır.

CYA

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek Konsantresi	10 mL
İz Element Çözeltisi	1 mL
Maya Ekstraktı	5 g
Sakaroz	30 g
Agar	15 g

Distile su 1 litre

Czapek Konsantresi

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Distile su	100 mL

Czapek konsantresi steril edilmeden buzdolabında saklanır ve CYA formülüne ilave edilir.

İz Element Çözeltisi

ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,5 g
Distile su	100 mL

İz element çözeltisi steril edilmeden buzdolabında saklanır ve CYA formülüne ilave edilir.

G25N

K ₂ HPO ₄	0,75 g
Czapek konsantresi	7,5 g
Mayat Ekstrakt	3,7 g
Gliserol	250 g
Agar	12 g
Distile su	750 mL

Besiyerleri 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş, Şekil 3.2’de şematik olarak gösterildiği gibi MEA ve CYA besiyerlerine her bir küf izolatından üç nokta ekim yapılmış, kültürler 25°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 °C ve 37°C’lerde inkübe edilen CYA ve 25°C’de inkübe edilen G25N besiyerlerine aynı anda iki küf izolatu iki nokta şeklinde ekilerek 7 gün beklenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda petri kutuları koloni çapları, koloni yapıları ve morfolojik özellikleri göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

Bu değerlendirme kriterlerinden yola çıkılarak *Aspergillus candidus*, *Aspergillus versicolor*, *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. ve *Ulocladium* spp. cinsi 5 adet küf identifiye edilmiştir.

3.2.2. Lipaz Enzimi Üretiminde Kullanılan Substratların Temel Bileşen Analizleri

3.2.2.1. Protein Tayini

Substrat numunelerinin içermiş olduğu protein miktarının tayini Kjeldahl yöntemi ile azot tayin cihazı (VELP SCİENTİFİCA_UDK 126 A, Almanya) kullanılarak yapılmıştır (AOAC 920.87, 1990). Bu yöntemde 1 g toz halindeki numuneler yakma tüpüne tartılarak 420°C’de bakır sülfat ve potasyum sülfat katalizörlüğünde yakılmış ve yakma işlemi renk açık yeşile döndükten sonra 30 dakika daha sürdürülmüştür. Yakma işlemi sonunda %4’lük borik asit içinde tutulan azot, 0,2 N HCl çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon sarfiyat değerleri kullanılarak ilk olarak numunelerin % azot miktarı belirlenmiştir. Bulunan bu değer 6,25 faktörü ile çarpılarak substratların içerdiği toplam protein miktarları saptanmıştır.

3.2.2.2. Yağ Tayini

Substrat numunelerinin içermiş olduğu yağ miktarının tayininde Soxhlet Ekstraksiyonu yöntemi kullanılmıştır (AOAC 920.39C, 1990). Örnek filtre kağıdına tartılan öğütülmüş 10 g substrat örnekleri, yöntemde belirtildiği şekilde katlanan filtre kağıdı içinde ekstraksiyon hazinesine yerleştirilerek, hekzan çözücüsü ile 5 saat ekstrakte edilmiştir. Elde edilen karışımdan çözgen döner buharlaştırıcı da kuruluğa dek uçurulmuştur. Yapılan hesaplamalar neticesinde substrat numunelerindeki yağ miktarı belirlenmiştir.

3.2.2.3. Nem Tayini

Substrat numunelerinin içermiş olduğu % nemin hesaplanması için etüvde (Memmert UM 400, Almanya) kurutma yöntemi (AOAC, 925.09B, 1990) kullanılmıştır. Yöntemde önceden etüvde sabit tartıma getirilmiş, desikatörde soğutulmuş ve tartılmış metal kaba 2 g substrat numuneleri tartılmıştır. Etüvde 135°C’de kapağı yarı açık vaziyette 2 saat süresince kurutulmuş, sürenin sonunda kapak kapatılarak desikatöre alınmış ve oda sıcaklığına gelince tartımı yapılmıştır. Deney sonunda kaplarda oluşan ağırlık kaybının substrat numunelerinden ayrılan su olduğu ilkesi kullanılarak % nem miktarları belirlenmiştir.

3.2.2.4. Kül Tayini

Substrat numunelerinin içermiş olduğu kül miktarları Sistek-ST 2000 (Almanya) kül fırınında kuru yakma yöntemi (AOAC, 923.03, 1990) kullanılarak yapılmıştır. Yöntemde darası alınmış krozeler içine alınan 3 g substrat numunesi 425°C'deki fırına yerleştirilip fırın kapağı açık tutularak 45 dakika beklenmiştir. Süre sonunda sıcaklık 485°C'e çıkarılmış ve kapak yarım kapatılmıştır. 45 dakika sonra sıcaklık 550 °C'e çıkarılarak kapak tam kapatılmıştır. Yakma işlemine açık gri kül elde edilene kadar 15 saat süreyle devam edilmiş ve bu işlemin ardından oda sıcaklığına gelen krozeler tartılarak substrat numunelerindeki kül miktarları saptanmıştır.

3.2.2.5. Karbonhidrat Tayini

Substrat numunelerinin % protein, nem, yağ ve kül değerlerinin belirlenmesinden sonra hesaplama yöntemiyle % karbonhidrat miktarları saptanmıştır.

3.2.2.6. pH Ölçümleri

Substrat numunelerinin pH ölçümleri, HANNA instruments pH211 microprocessor pHmeter (Romanya, 2004) ile ölçülmüştür.

3.2.3. İnokulum Hazırlanması

MEA içeren petriler üzerinde üretilmiş olan 7 günlük küf kültürleri, 18 mL peptonlu suda süspanse edilerek spor süspanسیونları hazırlanmıştır. Bu spor süspanسیونlarının DRBC Agar üzerinde yapılan ekimlerinde yaklaşık 10^5 - 10^6 spor/mL içerdiği belirlenmiştir.

3.2.4. Katı Faz Fermentasyon Besi Ortamının Hazırlanması

Katı faz fermentasyon yöntemi ile lipaz enzimi üretimi amacıyla mikroorganizmaların gelişebileceği ve maksimum lipaz aktivitesinin elde edileceği katı faz besi ortamları hazırlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, bölüm laboratuvarında izole edilen ve TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen *Rhizopus oryzae* küflerinden maksimum lipaz aktivitesini elde edebileceğimiz küfün ve substratın tayini için tarama çalışması yapılmıştır. Tarama çalışmasında substrat olarak buğday kepeği, pirinç kepeği, ayçiçeği tohumu küspesi ve ayçiçeği tohumu, küf olarak ise *Aspergillus candidus*, *Aspergillus versicolor*, *Ulocladium* spp., *Rhizopus* spp. ve

Mucor spp. ve *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1) kullanılmıştır. Her substrat 20 saniye öğütülerek 0,21-0,42 mm partikül büyüklüğüne getirildikten sonra 250 mL'lik erlenlere 10'ar gram tartılmış (ul-Haq ve diğ. 2002; Kamini ve diğ. 1998; Mahadik ve diğ. 2002), üzerlerine % 1 zeytinyağı ve 15 mL saf su ilave edilerek besi ortamları hazırlanmıştır. Erlenler alüminyum folyo ile kapatılmıştır.

Hazırlanan bu besi ortamları küf sporları ile inokülasyon öncesi 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.2.5. İnokülasyon

Spor süspansiyonlarından 3'er mL alınarak erlen içerisindeki steril katı faz besi ortamlarına inokülasyon yapılmış ve sonrasında bu besi ortamları tarama çalışması için 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası alınan numunelerin lipaz aktiviteleri belirlenerek, en yüksek lipaz aktivitesinin elde edildiği iki ayrı katı faz besi ortamı ve ayrıca en yüksek lipaz aktivitesinin elde edildiği küf ile çalışmaya devam edilmiştir (ul-Haq ve diğ. 2002).

3.2.6. Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu

Katı faz besi ortamında inkübasyon sonrasında lipaz enziminin ekstraksiyonu için önce biyokütleler steril “stomacher” poşetleri içine alınmış, daha sonra üzerlerine 50 mL fosfat tampon çözeltisi [41,3 mL KH_2PO_4 (1/15 mol/L) + 58,7 mL Na_2HPO_4 (1/15 mol/L) pH=7] ilave edilmiş, poşetlerin ağızları stomacher klipsleri ile kapatılmış ve 1 dak. “stomacher”de homojenize edilmiştir. Homojenize edilen karışımlar 1 saat süre ile oda sıcaklığında yatay bir çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakılmışlardır. Bu işlemi takiben iki katlı tülbentten süzölmüş ve süzöntü 4000 devirde 20 dak. santrifüjlenmiştir (Universal 32 R, Hettich, Almanya, 2005). Böylece elde edilen bu çözelti, çalışmalarımızda “Lipaz ekstraktı” olarak adlandırılmıştır. Lipaz ekstraktının hacmi ölçülerek lipaz aktivitesi hesabında kullanılmak üzere kaydedilmiştir (Macris ve diğ. 1996; Palma ve diğ. 2000; Mahadik ve diğ. 2002). Lipaz ekstraktının protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak saptanmıştır (Bradford, 1976).

3.2.7. Amonyum Sülfat ile Çöktürme Yoluyla Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Yöntemin esası, enzim çözeltisine elektrolit katılarak proteinlerin sudaki çözünürlüğünün azaltılması ve bu yolla enzim proteinlerinin çökmesini sağlamaktır. Elektrolit olarak her iyonik tuz bu amaçla kullanılabilirse de amonyum sülfat ucuz ve suda yüksek çözünürlük göstermesinden dolayı en fazla kullanılan tuzdur. Küflerden katı faz fermentasyon yöntemiyle elde edilen mikrobiyal lipazın kısmen saflaştırılmasında amonyum sülfat kullanılmış ve optimum amonyum sülfat konsantrasyonu tespiti için 2 ayrı amonyum sülfat doygunluk derecesinde çöktürme işlemleri yürütülmüştür. Bu amaçla, lipaz ekstraktlarına amonyum sülfat konsantrasyonu %30 ve %60 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilmiştir. Katı amonyum yavaş yavaş 500 devir/dakika hızla karıştırılan ekstrakta katılmış, daha sonra bu karışım 3 saat boyunca 4 °C’da bekletilmiştir. Bu esnada çöken enzim 4000 devirde 20 dakika santrifüjlenerek çözeltiden ayrılmış, numune kabına alınarak havalı etüvde kurutulmuş ve kullanılabileceği kadar buzdolabında saklanmıştır. Elde edilen çökeleklerin lipaz aktiviteleri Bölüm 3.2.8.’de açıklanan yöntemle göre ve protein konsantrasyonları Bradford yöntemi kullanılarak (Bradford, 1976) saptanmış ve en yüksek lipaz aktivitesi gösteren amonyum sülfat doygunluk derecesi optimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

3.2.8. Lipaz Aktivite Tayini

Lipaz preparatlarının spesifik aktivitesi, 1 mL lipaz ekstraktı veya (10-20 mg) enzim tozu tarafından 1 dakika içerisinde zeytinyağı trigliserollerinden açığa çıkarılan yağ asitlerinin μmol cinsinden miktarı olarak tarif edilmektedir.

Aktivite tayininde, trigliserol substratı olarak zeytinyağı (Riviera tipi) kullanılmıştır. 2 mL zeytinyağı, 0,5 mL 0,1M CaCl_2 , 3 mL fosfat tampon çözeltisi [$41,3 \text{ mL KH}_2\text{PO}_4$ (1/15 mol/L) + $58,7 \text{ mL Na}_2\text{HPO}_4$ (1/15 mol/L) pH=7] ve 5mL distile su karışımı önce, çalkalayıcılı su banyosunda 10 dak. 37°C’da karıştırılmıştır. Böylece reaktanların sıcaklığı 37°C’a getirilmiştir. Daha sonra bu karışıma, 1 mL serbest enzim (ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen lipaz ekstraktı) veya enzim tozu (10-20 mg) ilave edilmiş ve aynı sıcaklıkta 20 dakika daha karışım çalkalanmıştır. Süre sonunda, bu karışıma 20 mL

aseton-etil alkol karışımı (1:1 hacmen) katılarak enzim inaktive edilmiş ve hidroliz reaksiyonu sonucu zeytinyağından açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı 0,02 M NaOH ile fenolftalein indikatörüne karşı pH 10'a kadar titre edilerek belirlenmiştir. Paralel olarak, aynı koşullarda şahit denemeler de yapılmıştır (Uozaki ve diğ. 1997).

Reaksiyon sonunda enzimin 1 dakikalık zaman içerisinde açığa çıkardığı yağ asitleri miktarı, μmol olarak, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Uozaki ve diğ. 1997):

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mL veya g)} (\mu\text{mol /dak.mL veya mg}) = (V_1 - V_2) * C * 1000 / 20 * E$$

$$V_1 = \text{Numune için sarf edilen NaOH hacmi (mL)}$$

$$V_2 = \text{Şahit için sarf edilen NaOH hacmi (mL)}$$

$$C = \text{NaOH konsantrasyonu (mol/L)}$$

$$E = \text{Numunenin miktarı (mL veya mg)'dır.}$$

Toplam aktivite, spesifik aktivitesi saptanan örneğin ekstrakt hacmi (mL) ile aktivite değerinin çarpılmasıyla hesaplanır.

3.2.9. Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkileri

Küf tarama çalışmasında en yüksek lipaz aktivitesinin elde edildiği küf cinsi ile yine en yüksek lipaz aktivitesinin elde edildiği iki ayrı katı faz besi ortamı kullanılarak farklı azot kaynaklarının lipaz enzimi aktivitesine etkileri incelenmiştir. Bunun için, katı faz besi ortamlarının her ikisine birden üç farklı azot kaynağı (Amonyum klorür, Maya ekstraktı, Tripton) % 0,75 oranında ilave edilerek Bölüm 3.2.5'de açıklandığı şekilde saf küf süspansiyonları besi ortamlarına inoküle edilmiş ve inkübasyon sıcaklığının sürekli kontrol edildiği 6 gün boyunca besiyerleri inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik periyotlarda bu besiyerlerinden numune alınarak Bölüm 3.2.6'da açıklanan yöntemle göre enzim ekstraksiyonu yapılmış ve yine Bölüm 3.2.8'de belirtilen şekilde lipaz enziminin aktivitesi saptanmıştır. 6 günlük deney süresi boyunca yukarıda açıklanan yöntemle göre enzimin aktivite değerleri bulunmuştur. Her iki besi ortamı için saptanan aktivite değerlerinin zamanla değişim eğrileri çizilmiş bu eğrilerden maksimum lipaz aktivitesi gösteren inkübasyon zamanı belirlenmiştir. En yüksek lipaz aktivitesi gösteren besiyeri ise lipaz enziminin karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.10. Lipaz Enziminin Karakterizasyonu

3.2.10.1. Optimum pH Tayini

Çalışmamızın bu bölümünde, Bölüm 3.2.9’da açıklanan yöntemle göre seçimi yapılmış katı faz besi ortamında daha önce belirlenen küfün üremesi sağlanmış, bu ortamda oluşan lipaz enzimi ekstrakte edilmiştir. Bu enzimin optimum pH’ının tayininde aşağıdaki yöntem kullanılmıştır. 2 mL zeytinyağı, 0,5 mL 0,1 M CaCl_2 , 3 ml istenilen pH değerinde tampon çözeltisi ve 5mL distile su çalkalayıcılı su banyosunda 10 dak. 37°C ’da karıştırılmıştır. Böylece reaktanların sıcaklığı 37°C ’a getirilmiştir. Daha sonra bu karışıma, 1 mL serbest enzim ilave edilmiş ve aynı sıcaklıkta 20 dakika daha karışım çalkalanmıştır. Süre sonunda, bu karışıma 20 mL aseton-etil alkol karışımı (1:1, hacmen) katılarak enzim inaktive edilmiştir. Hidroliz sonucu açığa çıkan yağ asitleri Bölüm 3.2.8’deki açıklanan aktivite tayini yöntemine göre belirlenmiş ve lipaz enziminin incelenen pH değerindeki aktivitesi saptanmıştır. pH 4-10 arasında yukarıda açıklanan yöntemle göre enzimin aktivite değerleri bulunmuştur. Deneysel olarak saptanan bu aktivite değerlerinin pH’a göre değişim grafiği çizilerek katı faz fermentasyon yöntemi ile küflerden elde edilen lipaz enziminin etkin aktivite gösterdiği pH aralığı ve optimum pH yani maksimum aktivite gösterdiği pH değeri (veya değerleri) grafik üzerinden belirlenmiştir.

3.2.10.2 Optimum Sıcaklık Tayini

Lipaz enziminin optimum sıcaklık değerinin bulunmasında da yine en yüksek aktivite gösterdiği azot kaynağı ilaveli katı faz besi ortamında lipaz enzimi üretilmiş ve optimum pH değerinde (veya değerlerinde) enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık saptaması yapılmıştır. $30-55^\circ\text{C}$ arasında, optimum pH’da hazırlanan zeytinyağı, CaCl_2 , lipaz ekstraktı ve tampon çözelti içeren bir seri karışıma, Bölüm 3.2.8’de açıklanan aktivite tayin yöntemi aynen uygulanmış ve her sıcaklık derecesinde enzimin gösterdiği aktivite değeri saptanmıştır. Deneysel olarak saptanan bu aktivite değerlerinin sıcaklığa göre değişim grafiği çizilerek katı faz fermentasyon yöntemi ile küflerden elde edilen lipaz enziminin optimum sıcaklığı yani en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık grafik üzerinden belirlenmiştir.

3.2.10.3. Hidroliz ve Esterifikasyon Aktiviteleri

Çalışmamızın bu bölümünde optimum pH ve sıcaklığını saptadığımız lipaz enziminin hidroliz ve esterleşme aktiviteleri belirlenmiştir. Hidroliz reaksiyonunda oleik asit substrat olarak seçilmiştir. Hidroliz reaksiyonunda uygulanan yöntem aşağıda açıklanmıştır.

Hidroliz reaksiyonu 100 mL'lik cam balonda yürütülmüştür. Balona 1 g zeytinyağı, 5 mL su, 50 mL hekzan, gram yağ başına belirlenen miktarda enzim konulduktan sonra reaksiyon kabı sıcaklığı ayarlanabilen orbital çalkalayıcıya (Edmund Bühler, KS-15, Almanya) yerleştirilmiştir ve reaksiyona enzimin optimum sıcaklığında 9 saat devam edilmiştir. Hidroliz reaksiyonu yürüyüşü, belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin serbest yağ asitleri içeriği saptanarak takip edilmiştir. Bu amaçla alınan numunelere önce 20 mL aseton-etil alkol karışımı (1:1, hacmen) katılarak lipaz enziminin inaktive edilmesi sağlanmış, daha sonra bu karışım 0,02 M NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Böylece titrasyon sonucu zeytinyağından açığa çıkan yağ asitleri miktarları belirlenerek yağ asitleri miktarının zamanla değişim grafiği çizilmiştir. Aynı koşullarda 1,3-spesifik Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) lipazı kullanılarak zeytinyağının hidroliz reaksiyonları da gerçekleştirilmiş ve reaksiyon yürüyüşlerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Ürettiğimiz lipaz enziminin esterleşme aktivitesinin belirlenmesi için tripalmitin ile kaprik asitin (C 10:0) asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Asidoliz reaksiyonları 25 mL'lik kahverengi, ısıya dayanıklı cam reaksiyon kaplarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon kabına 0,9 g civarı substrat karışımı (belirli reaktan oranında tripalmitin ve kaprik asitten hazırlanmış karışım) ve 5,0 mL hekzan konulduktan sonra, reaksiyon kabı sıcaklığı ayarlanabilen orbital çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. Çalkalayıcının sıcaklığı reaksiyon süresi boyunca enzimin optimum sıcaklığında sabit tutulmuştur. Çalkalayıcıya yerleştirilen karışımın sıcaklığı optimum sıcaklığa erişince ortama %10 enzim ilavesi yapılarak reaksiyonun başlaması sağlanmıştır. Reaksiyon sonlandırılana kadar reaksiyon karışımı 220 rpm sabit hızla karıştırılmıştır. 4 saatin sonunda çalkalayıcı durdurulmuş ve reaksiyon karışımından 2 mL'lik numune alınmıştır. Bu numunenin analizi yapılarak asidoliz reaksiyonunun değerlendirilmesi yapılmıştır.

Asidoliz reaksiyonu için, ürün karışımından alınmış numuneler 90-100°C'lik su banyosunda önce 15 dakika ısıtılmıştır. Böylece lipaz enziminin inaktive edilmesi sağlanarak reaksiyon tamamıyla sonlandırılmıştır. Bilindiği üzere, asidoliz reaksiyonunun ana ürünü tripalmitinin triaçilgliserollerinden türemiş yeni bir yağ asiti profiline sahip TAG'dir. Bu TAG'ler ortamda reaksiyona girmemiş kaprik asit ile tripalmitinden açığa çıkan YA (yağ asitleri) ile birlikte bulunurlar. Yeni oluşmuş bu TAG'lerin analizlerinin yapılabilmesi için ortamda bulunan serbest YA'lerinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla numunelere 5 mL hekzan ve 5 mL etil alkol ilave edilmiş, fenoftalein eşliğinde dikkatli bir şekilde 0,02 M NaOH çözeltisi ile titrasyonu yapılmıştır. Bu esnada numune içerisinde bulunan serbest yağ asitlerinin sodyum tuzları haline geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu karışım içerisinde su ve hekzan bulunan ayırma hunisine aktarılmış, TAG fraksiyonunu içeren hekzan fazının yağ asitleri sodyum sabunlarını içeren sulu fazdan ayrılması için belli bir süre beklenmiştir. Ayırma hunisinden alınan hekzan fazı daha sonra döner buharlaştırıcı da çözücüsü tamamen uçurulana kadar evapore edilmiştir. Böylece saf olarak TAG ürünleri elde edilmiştir.

Elde edilen TAG fraksiyonları metalonik sodyum hidroksit ve BF₃ ile metil esterlerine dönüştürülmüş ve Hewlett-packard 5890 Seri II (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) gaz kromatografi cihazına beslenmiştir. Uygulanan kromatografik analiz yönteminin özel ayrıntısı aşağıda açıklanmıştır:

Dedektör Tipi	: FID ⁽¹⁾
Dedektör sıcaklığı (°C)	:280
İnjesiyon sıcaklığı (°C)	:250
Gaz hızları (mL/dak)	
Azot	:1,6
Hidrojen	:33
Hava	:460
Dağıtma oranı	:88:1
Fırın sıcaklığı	: 150°C (5dak)
	:150-275°C (5°C/dak)
	:275°C(30dak)
Kolon tipi	:Kapiler kolon
	:Ultra ⁽²⁾

(1) Alev iyonizasyon dedektörü

(2) 25m x 0,32mm, 0,52µm film kalınlığında %5 difenil ve %95 dimetil polisiloksan

Kromatogramlarda yer alan piklerin tanımlanmasında, 8:0,12:0,14:0,16:0,16:1,18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ve 20:0 yağ asitlerinin metil esterlerini içeren standart yağ asitleri metil esterlerinin aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramları kullanılmıştır.

Gaz kromatogramlarının değerlendirilmesi ile yeniden yapılandırılmış TAG'lerin yağ asidi bileşimleri ve tripalmitine katılan kaprik asitin yüzdesi belirlenmiştir. Aynı koşullarda 1,3-spesifik Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) lipazı kullanılarak tripalmitinin kaprik asit ile asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve reaksiyon sonuçlarının karşılaştırılması yapılmıştır. Böylece bizim elde ettiğimiz lipaz enziminin hidroliz ve transesterifikasyon reaksiyonlarında etkinliğini ve de spesifik özellik gösterip göstermediği ortaya çıkarılmıştır.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

Varyans analizi (ANOVA) Minitab 12 for Windows paket programı kullanılarak yapılmıştır. İnkübasyon süresinin ve farklı azot kaynaklarının, pirinç kepeği ve ayçiçeği tohumu küspesi üzerinde geliştirilen küfün toplam lipaz aktivitesi üzerine etkisi “İki yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Diğer analizlerde “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi kullanılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testi uygulanarak bulunmuştur.

Küf İzolatları	İzole Edildiği Kaynak
-----------------------	------------------------------

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kullanılan Substratların Bileşimi

Çalışmada kullanılan substrat numunelerinin temel bileşen analizleri sonunda elde edilen % bileşen değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Substrat Numunelerinin % Bileşimi

Substrat Bileşim (% w/w)	Buğday Kepeği (*)	Pirinç Kepeği	Ayçiçeği Tohumu Küspesi	Ayçiçeği Tohumu
Protein	11,69	9,14	16,00	9,16
Yağ	4,52	17,40	3,85	34,29
Nem	12,30	13,01	8,86	5,65
Kül	3,95	6,51	4,59	3,18
Karbonhidrat	67,54	53,94	66,70	47,72

*(Sağlam, 2004).

4.2. Substrat Numunelerinden İzole Edilen Küf Kültürleri

Substrat numunelerinin direk ekim ve yayma plak yöntemiyle seyreltik ekimleri yapılmış, besiyerlerinde gelişmelerinin morfolojik ve mikroskopik özellikleri gözlemlenerek Samson (1995) ve Pitt ve Hocking (1997)’e göre tanımlanmıştır. Katı faz fermantasyon yöntemiyle lipaz enzimi üretimi çalışmasında kullanılmak üzere tanımlanan bu küf izolatları ve izole edilen kaynakları Tablo 4.2’de verilmiştir. Saflaştırılan kültürlerin stok çözeltileri hazırlanmış ve yatık MEA’da 4°C’de muhafaza edilmiş ve inokülasyon işlemleri öncesinde MEA içeren petrilerde 25°C’de 7 gün inkübe edilerek tazelenmişlerdir.

<i>Aspergillus candidus</i>	Pirinç Kepeği
<i>Aspergillus versicolor</i>	Ayçiçeği Tohumu
<i>Rhizopus</i> spp.	Ayçiçeği Tohumu
<i>Mucor</i> spp.	Pirinç Kepeği
<i>Ulocladium</i> spp.	Buğday Kepeği

Tablo 4.2: Substratlardan İzole Edilen ve Tanımlanan Küfler

4.3. Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Tayinleri

Çalışma kapsamında, üzerinde çalışılacak küf türünün belirlenmesi amacıyla, öğütülerek toz haline getirilmiş, %60 oranında nemlendirilmiş ve %1 oranında zeytinyağı ilave edilmiş dört farklı substrat üzerine, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus versicolor*, *Ulocladium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1) ve *Mucor* spp. küf türleri aşılansarak, 30°C sıcaklıkta 3 gün süreyle inkübe edilmiş ve süre sonunda lipaz aktivite değerleri belirlenmiştir. Yapılan bu tarama çalışması sonucu bütün küflerin her bir substratta ayrı ayrı çok iyi gelişme gösterdiği tespit edilmiş ve uygun küf türünün ve uygun substratın seçimi için lipaz aktivitesi değerleri baz alınmıştır. Lipaz aktivitesi mikroorganizma türüne ve bu küf türlerinin izole edildikleri ortama göre değişiklik gösterebilmektedir. ul-Haq ve diğ. (2002), 10 farklı *Rhizopus* cinsi küf ile yaptıkları çalışmada bazı küflerin çok iyi lipaz aktivitesi gösterdiğini, bunlardan bazılarının ise düşük düzeylerde lipaz ürettiklerini tespit etmişlerdir. Bu durumda, *Rhizopus* spp. ve *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1) küflerinin aynı substratta birbirlerinden farklı lipaz aktivitesi göstermelerinin normal olduğu düşünülmektedir. Bu küf türlerinin farklı substratlardaki lipaz aktiviteleri Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6’da verilmiştir.

Substrat olarak pirinç kepeğinin kullanıldığı tarama çalışmasında elde edilen spesifik lipaz aktivitesi ve toplam lipaz aktivitesi sonuçlarına göre en yüksek lipaz aktivitesini ayçiçeği tohumundan izole edilen *Rhizopus* spp. göstermiştir. *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1) ikinci sırada yer alırken pirinç kepeğinden izole edilen *Mucor* spp. en az lipaz aktivitesi gösteren küf olmuştur (Tablo 4.3).

Bu tarama çalışmasında kullanılan küflerin tümü, pirinç kepeği substratında 30°C’deki 3 günlük inkübasyon sonucu çok iyi gelişme gösterdiğinden pirinç kepeğinin katı substrat olarak küf gelişimini teşvik ettiği ve bu nedenle lipaz enziminin katı faz fermantasyon yöntemi ile küflerden eldesi prosesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Pirinç

kepeği substratında geliştirilen *Mucor* spp. küfünün toplam ve spesifik lipaz aktivite değerlerinin diğer küf cinslerinden daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo A.1, Tablo A.2).

Tablo 4.3: Pirinç Kepeğinde Farklı Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Değerleri
Aynı sütundaki aynı harflerle işaretlenmiş olan ortalama değerler arasında fark gözlenmemiştir ($p<0,05$).

Küf Kültürleri	Spesifik Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (Unit)
<i>Rhizopus</i> spp.	7,10±0,70 ^a	379,60±32,80 ^a
<i>Rhizopus oryzae</i> (70083-947-D1)	6,58±0,67 ^a	370,78±24,00 ^a
<i>Aspergillus candidus</i>	6,03±1,09 ^{ab}	325,35±59,18 ^{ab}
<i>Aspergillus versicolor</i>	5,38±0,60 ^{ab}	290,25±32,46 ^{ab}
<i>Ulocladium</i> spp.	5,28±0,31 ^{ab}	282,10±13,29 ^{ab}
<i>Mucor</i> spp.	3,70±0,84 ^b	199,80±45,82 ^b

Buğday kepeğinde en yüksek lipaz aktivite değerleri *Rhizopus* spp. ve *Aspergillus candidus* küflerinden elde edilmiştir (Tablo 4.4). Pirinç kepeği substratında gözlemlendiği gibi buğday kepeği substratında da en düşük toplam ve spesifik lipaz aktiviteleri *Mucor* spp. küfünde gözlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo A.3, Tablo A.4).

Tablo 4.4: Buğday Kepeğinde Farklı Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Değerleri
Aynı sütundaki aynı harflerle işaretlenmiş olan ortalama değerler arasında fark gözlenmemiştir ($p<0,05$).

Küf Kültürleri	Spesifik Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (Unit)
<i>Rhizopus</i> spp.	6,93±0,39 ^a	377,55±26,09 ^a
<i>Aspergillus candidus</i>	5,90±0,35 ^{ab}	307,05±26,72 ^{ab}
<i>Rhizopus oryzae</i> 70083-947-D1	5,03±0,25 ^b	266,33±13,11 ^b
<i>Aspergillus versicolor</i>	4,83±0,46 ^b	255,40±17,53 ^b
<i>Ulocladium</i> spp.	4,55±0,03 ^{bc}	234,33±3,21 ^{bc}
<i>Mucor</i> spp.	3,15±0,21 ^c	165,45±13,36 ^c

Buğday kepeğinde küf gelişimi istenildiği düzeyde gerçekleştiği halde pirinç kepeğine göre daha düşük aktivite değerleri saptandığından, buğday kepeği ile çalışılmaya devam edilmemiştir.

Tablo 4.5: Ayçiçeği Tohumu Küspesinde Farklı Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Değerleri

Küf Kültürleri	Spesifik Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (Unit)
<i>Rhizopus</i> spp.	9,25±0,92 ^a	462,50±25,96 ^a
<i>Rhizopus oryzae</i> 70083-947-D1	7,85±1,20 ^{ab}	381,15±23,85 ^{ab}
<i>Aspergillus versicolor</i>	5,95±0,35 ^b	287,88±19,05 ^b
<i>Aspergillus candidus</i>	5,88±0,38 ^b	282,75±21,00 ^b
<i>Ulocladium</i> spp.	5,48±1,09 ^b	268,28±26,70 ^b
<i>Mucor</i> spp.	4,70±0,56 ^b	230,30±27,71 ^b

Aynı sütundaki aynı harflerle işaretlenmiş olan ortalama değerler arasında fark gözlenmemiştir (p<0,05).

Farklı substratların kullanıldığı tarama çalışmasında ayçiçeği tohumu küspesi Tablo 4.5’de görüldüğü üzere en yüksek lipaz aktivitelerinin elde edildiği katı substrat olmuştur. *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1) küfü önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (p<005). *Mucor* spp. küfü en az aktivite gösteren küf olmuştur (p<005) (Tablo A.5, Tablo A.6).

Yapılan tarama çalışmasında en yüksek lipaz aktivitesi değeri substrat olarak ayçiçeği tohumu küspesinin kullanıldığı aşamada elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmada bu sanayi yan ürününün katı substrat olarak kullanılmasına devam edilmiştir.

Tablo 4.6: Ayçiçeği Tohumunda Farklı Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Değerleri

Küf Kültürleri	Spesifik Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (Unit)
<i>Rhizopus oryzae</i> 70083-947-D1	6,75±1,13 ^a	364,50±12,09 ^a
<i>Aspergillus candidus</i>	6,50±0,49 ^a	334,23±11,70 ^a
<i>Rhizopus</i> spp.	5,35±0,24 ^{ab}	288,90±5,65 ^{ab}
<i>Aspergillus versicolor</i>	5,00±0,14 ^{ab}	265,00±7,49 ^{ab}
<i>Ulocladium</i> spp.	3,70±0,35 ^{bc}	203,75±24,68 ^{bc}
<i>Mucor</i> spp.	2,68±0,53 ^c	144,45±28,63 ^c

Aynı sütundaki aynı harflerle işaretlenmiş olan ortalama değerler arasında fark gözlenmemiştir (p<0,05).

Ayçiçeği tohumunun katı faz besiyeri olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada ise, *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1) küfünde diğer substratlarda gözlemlendiği gibi önemli derecede yüksek lipaz aktivitesi gözlenirken *Mucor* spp. küfünde önemli ölçüde düşük lipaz aktivitesi gözlenmiştir (p<0,05) (Tablo 4.6, A.7, A.8). Fadiloğlu ve Erkmen (1999), *Rhizopus oryzae* ile , Nahas (1988) *Rhizopus oligosporus* ile yaptığı çalışmada, spesifik

lipaz aktivitesinin biyokütle üretimi ve toplam lipaz aktivitesi ile paralel olarak artmadığını belirtmiştir.

Ayçiçeği tohumunda küf gelişmesi istenen düzeyde gerçekleşmesine rağmen diğer üç substratla karşılaştırıldığında en düşük lipaz aktivite değerleri elde edilmiştir. Bundan dolayı çalışmanın diğer aşamalarında katı substrat olarak kullanılmamaktadır. Ayçiçeği tohumu ile yürütülen bu çalışmada küfler çok iyi gelişme gösterdikleri halde lipaz aktivite değerlerinin ayçiçeği tohumu küspesinde tespit edilen değerlere göre daha düşük oluşunun, ayçiçeği tohumunun yüksek yağ içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan birkaç çalışmada ortama yağ ilavesinin lipaz üretimini yaklaşık 10 kat kadar düşürdüğü tespit edilmiş, bunun nedeni olarak ise ortamda mevcut yağların lipaz enziminin salınımını baskıladığı şeklinde açıklanmıştır (Haas ve Joerger, 1995). Yüksek yağ içeriğine sahip olan ayçiçeği tohumunda, küflerin çok iyi gelişmesine rağmen düşük lipaz aktivite değerlerinin elde edilmesi, lipaz aktivitesinin ortamdaki yağ oranının yüksek olması nedeniyle düşebileceği yönündeki sonuçlarla tutarlıdır.

Pirinç kepeği, buğday kepeği, ayçiçeği tohumu ve ayçiçeği tohumu küspesinin farklı katı faz besiyerleri olarak, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus versicolor*, *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Ulocladium* spp. ve *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1)'in farklı küf cinsleri olarak kullanıldığı tarama çalışmasında, üç farklı substratın her birinde de en yüksek spesifik ve toplam lipaz aktivitesi değerini gösteren *Rhizopus* spp. küfö ile çalışmaya devam edilmiştir. Pirinç kepeğinden izole edilen bu küfün toplam aktivite değerleri; pirinç kepeğinde $379,60 \pm 32,80$ (U), buğday kepeğinde $377,55 \pm 26,09$ (U), ayçiçeği tohumu küspesinde $462,50 \pm 25,96$ (U) ve ayçiçeği tohumunda $288,90 \pm 5,65$ (U)'dir. Tarama çalışması sonunda, ayçiçeği tohumu küspesi ve pirinç kepeği en yüksek lipaz aktivitesinin elde edildiği ilk iki katı faz besiyeri olmuştur. Çalışmanın devamında bu iki substratın kullanılmasına karar verilmiştir.

4.4. Farklı Azot Kaynakları İlavesinin Lipaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkileri

Farklı azot kaynaklarının lipaz enzimi aktivitesi üzerine etkilerinin incelendiği bu kısımda, katı faz besiyeri olarak ayçiçeği tohumu küspesi ve pirinç kepeği, mikroorganizma olarak ise, tarama çalışmasında en yüksek lipaz aktivitesi gösteren *Rhizopus* spp. ile çalışılmıştır. Ayçiçeği tohumu küspesi ve pirinç kepeğine % 1

zeytinyağı ilave edilmiş ve % 60 oranında nemlendirilmiştir. Hazırlanan bu besiyerlerine azot kaynağı olarak % 0,75 oranında tripton, maya ekstraktı ve amonyum klorür ilave edilmiştir. Bu üç farklı azot kaynağının küf gelişimine olan etkisi ve farklı inkübasyon zamanlarında lipaz enzimi aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. İnkübasyon süresi 144 saat olarak yürütülmüş ve 24 saatlik periyotlarda numune alınarak lipaz enziminin aktivitesine bakılmıştır.

Fadıloğlu ve Erkmen, kepek çözeltisi, soya unu ve peynir altı suyunu proteose pepton, tripton ve maya ekstraktı gibi farklı azot kaynakları ile zenginleştirerek, zeytinyağlı ve yağsız ortamlarda *Rhizopus oryzae* (1999) ve *Candida rugosa* (2002) gelişimini ve oluşan lipaz aktivitesine etkilerini incelemiştir. *Rhizopus oryzae*, yağlı ortama proteose peptone ilavesiyle en yüksek lipaz aktivitesi değerini (14,38 U/mL) gösterirken, *Candida rugosa* en yüksek lipaz aktivitesini (5,58 U/mL) yağlı ortama maya ekstraktı ve proteose pepton ilavesiyle göstermiştir. Zeytinyağlı substrata ilave edilen organik azot kaynakları, *Rhizopus oryzae* ve *Candida rugosa*'dan lipaz sentezini artırarak lipaz aktivitesini yükseltmiştir.

4.4.1. Ayçiçeği Tohumu Küspesinde Lipaz Aktivite Değerleri

Ayçiçeği tohumu küspesi ile hazırlanan katı faz besiyerine % 0,75 oranında ilave edilen tripton, maya ekstraktı ve amonyum klorürün lipaz aktivitesine etkileri, deney süresince alınan numunelerin analizleri neticesinde belirlenmiştir (Tablo 4.7)(Şekil 4.1).

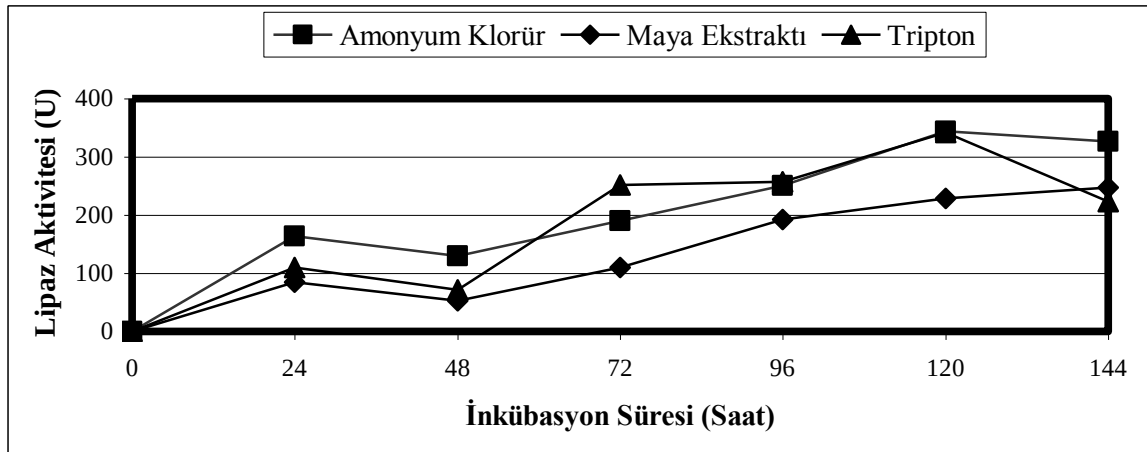
Tablo 4.7: Farklı Azot Kaynaklarının Ayçiçeği Tohumu Küspesinde Lipaz Eldesine Etkileri

Azot Kaynağı	Amonyum Klorür		Maya Ekstraktı		Tripton	
	Spesifik aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)
24	3,20±0,07	163,20±0,14	1,60±0,07	84,80±0,14	2,15±0,03	109,65±3,28
48	2,45±0,03	129,85±3,42	0,95±0,03	52,25±1,59	1,35±0,02	71,55±1,09
72	3,73±0,10	189,98±5,40	2,15±0,07	109,65±3,60	4,75±0,10	251,75±1,23
96	4,83±0,53	250,90±7,35	3,85±0,03	192,50±1,76	4,85±0,07	257,05±1,44
120	6,50±0,14 ^a	344,50±3,39 ^a	4,40±0,07 ^b	228,80±0,84 ^b	6,45±0,02 ^a	341,85±4,84 ^a
144	6,15±0,07	325,95±3,74	4,58±0,03	247,05±1,90	4,20±0,07	222,60±1,83

Aynı sütundaki aynı harflerle işaretlenmiş olan ortalama değerler arasında fark gözlenmemiştir (p<0,05).

Ayçiçeği tohumu küspesinde yapılan çalışmada, amonyum klorür ilavesiyle yürütülen 144 saatlik deney sonucunda diğer azot kaynaklarına göre daha yüksek aktivite değerleri saptanmıştır. En fazla değere ise 120 saatin sonunda (toplam lipaz aktivite $344,50 \pm 3,39$ U), (spesifik aktivite $6,50 \pm 0,14$ U/mL) ulaşılmıştır. Daha sonraki aşamalarda ise lipaz aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Farklı azot kaynaklarının ve farklı inkübasyon süresinin spesifik ve toplam lipaz aktiviteleri üzerindeki etkisi istatistiksel olarak ($p < 0,05$) önemli bulunmuştur (Tablo A.9, A.10). Zaman ile azot kaynağı etkisi değişmektedir. 120 saatin sonunda en yüksek lipaz aktiviteleri amonyum klorür ve tripton ilave edildiği koşullarda saptanmış, iki koşul arasında istatistiksel anlamda fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Maya ekstraktı ilaveli besiyerinde ise elde edilen lipaz aktivitesi değerleri diğerlerinden daha düşük çıkmıştır ($p < 0,05$) (Tablo A.13, A.14).

Mahadik ve diğ. (2002), *Aspergillus niger* küfünü kullanarak buğday kepeğinde, 120 saatin sonunda en fazla lipaz aktivitesine ulaşıldığını ve artan inkübasyon süresinin lipaz aktivitesini ve enzim verimini arttırmadığını belirtmiştir.



Şekil 4.1: Ayçiçeği Tohumu Küspesine Farklı Azot Kaynakları İlavesinin Lipaz Aktivitesine Etkisi

4.4.2. Pirinç Kepeğinde Lipaz Aktivite Değerleri

Pirinç kepeği bu çalışma kapsamında üzerinde çalışılan bir diğer substrattır. Bu substrat ile hazırlanan katı faz besiyerine % 0,75 oranında ilave edilen tripton, maya ekstraktı ve amonyum klorürün lipaz aktivitesine etkileri, deney süresince alınan numunelerin

analizleri neticesinde belirlenmiştir. Tablo 4.8’de 24 saatlik aralıklarda, spesifik ve toplam lipaz aktivite değerleri verilmiştir. Grafiksel gösterimi ise Şekil 4.2’de verilmiştir.

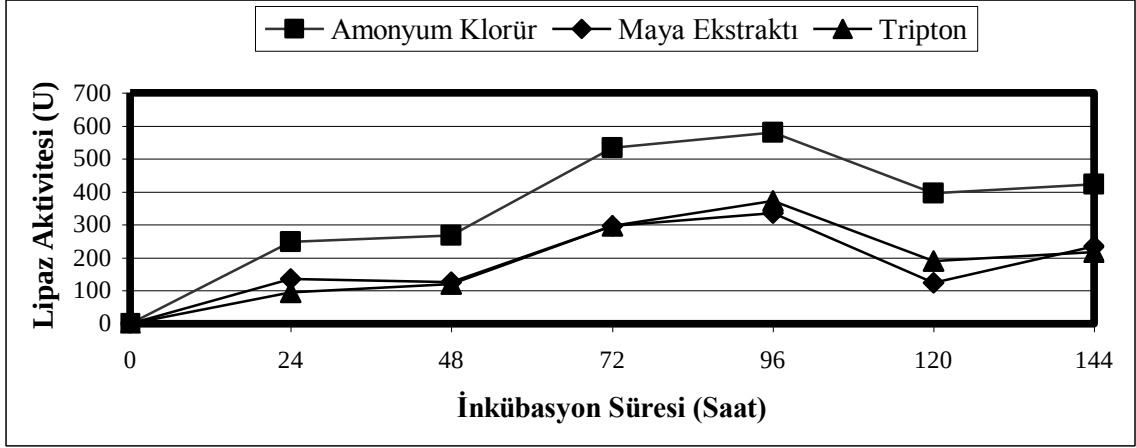
Pirinç kepeği ile yapılan azot kaynağı ilaveli bu çalışmada ise yine amonyum klorür ilaveli besi ortamında daha fazla lipaz elde edilerek toplam ve spesifik aktivite değerlerinin yüksek miktarda olduğu gözlenmiştir. Standart koşullarda pirinç kepeğine üç farklı azot kaynağı ilave edilerek yürütülen deneyde 96 saat sonunda maksimum enzim sentezi elde edilmiş ve en fazla spesifik aktivite ($10\pm0,35$ U/mL) ve en fazla toplam aktivite ($580\pm3,53$ U) belirlenmiştir. Farklı azot kaynaklarının ve farklı inkübasyon süresinin spesifik ve toplam lipaz aktiviteleri üzerindeki etkisi istatistiksel olarak ($p<0,05$) önemli bulunmuştur (Tablo A.11, A.12).

Tablo 4.8: Farklı Azot Kaynaklarının Pirinç Kepeğinde Lipaz Eldesine Etkileri

Azot Kaynağı	Amonyum Klorür		Maya Ekstraktı		Trypton	
	Spesifik aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)
24	4,15 $\pm$ 0,03	249,00 $\pm$ 2,28	2,28 $\pm$ 0,10	136,50 $\pm$ 6,36	1,58 $\pm$ 0,03	94,50 $\pm$ 2,12
48	4,40 $\pm$ 0,07	268,40 $\pm$ 2,40	2,10 $\pm$ 0,07	126,00 $\pm$ 2,82	2,10 $\pm$ 0,07	120,95 $\pm$ 4,17
72	9,03 $\pm$ 1,25	532,48 $\pm$ 5,48	5,10 $\pm$ 0,98	295,80 $\pm$ 25,73	5,20 $\pm$ 1,14	296,30 $\pm$ 0,70
96	10,00 $\pm$ 0,35 ^a	580,00 $\pm$ 3,53 ^a	5,98 $\pm$ 0,53 ^b	334,60 $\pm$ 29,64 ^b	6,53 $\pm$ 0,60 ^b	372,35 $\pm$ 5,93 ^b
120	6,60 $\pm$ 0,07	396,00 $\pm$ 0,70	2,10 $\pm$ 0,07	123,90 $\pm$ 2,75	3,10 $\pm$ 0,07	189,10 $\pm$ 2,89
144	7,05 $\pm$ 0,03	423,00 $\pm$ 2,12	4,05 $\pm$ 0,28	234,90 $\pm$ 16,40	3,80 $\pm$ 0,07	217,50 $\pm$ 4,10

Aynı sütundaki aynı harflerle işaretlenmiş olan ortalama değerler arasında fark gözlenmemiştir ($p<0,05$).

Zaman ile azot kaynağı etkisi değişmektedir. 96 saatin sonunda maya ekstraktı ve triptonun azot kaynağı olarak kullanıldığı koşullarda aktivite değerleri amonyum klorüre göre daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo A.15, A.16).



Şekil 4.2: Pirinç Kepeğine Farklı Azot Kaynakları İlavesinin Lipaz Aktivitesine Etkisi

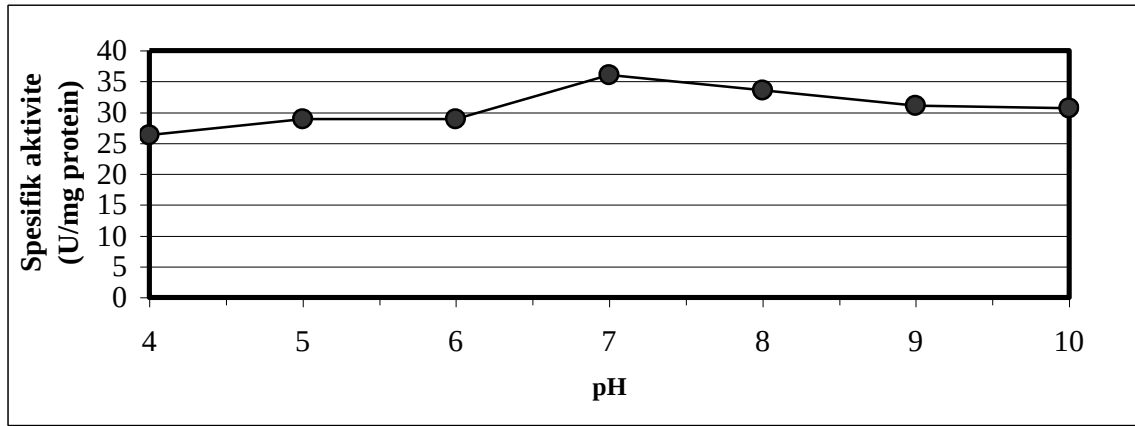
Reaksiyon başında enzim deneysel koşullara adapte olmuş 96 saat sonunda maksimum aktivite değerine ulaşmış ve ardından aktivitesinin bir kısmını kaybetmiştir. Benzer durum Essamri ve diğ. (1998)'de *Rhizopus oryzae* ile yapılan çalışmada 96 saatin sonunda lipaz aktivitesinde azalma meydana gelmiştir, bunun nedeni olarak aynı gelişme fazında oluşan proteazların lipazları proteoliz etmiş olabileceği veya mevcut besin elementlerinin azalmasından veya nem kaybından meydana gelebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, hücre gelişiminin belirli bir seviyeye ulaştığında lipaz üretimi de maksimuma eriştiği vurgulanmıştır. Ellaiah ve diğ. (2001), *Aspergillus niger* küfü ile yaptıkları çalışmada 96 saatin sonunda maksimum lipaz üretimini (4090 U/L) gerçekleştirmişlerdir. ul-Haq ve diğ.(2002) ise 48 saatin sonunda lipaz aktivitesinde azalma meydana gelmiştir.

4.5. *Rhizopus* spp. Lipaz Enziminin Optimum pH ve Sıcaklığının Saptanması

Rhizopus spp. lipaz enziminin optimum pH değerinin saptanması için, pH 4-10 aralığında hazırlanan fosfat tamponlarının kullanıldığı (Kaplan ve Colowick, 1955), bir seri deneme yapılmıştır. Örneklerin spesifik aktiviteleri Bölüm 3.2.8'de açıklanan aktivite yöntemine göre belirlenmiş ve lipaz enziminin incelenen pH değerindeki aktivitesi saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.9'da verilmiştir. Enzim aktivitesinin pH ile değişim eğrisi Şekil 4.3'de görülmektedir.

Tablo 4.9: *Rhizopus* spp. Lipaz Enzimi Aktivitesinin pH İle Değişimi (Lipaz ekstraktı protein içeriği = 0,18 mg protein/ mL)

pH	Spesifik aktivite (U/mg protein)
4	26,28
5	28,89
6	28,89
7	36,11
8	33,61
9	31,11
10	30,72



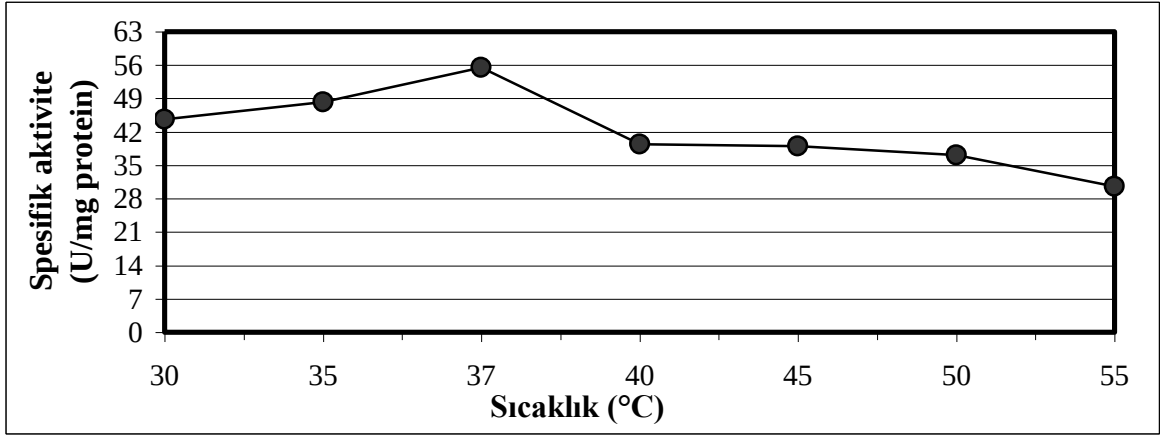
Şekil 4.3: *Rhizopus* spp. Lipaz Enzimi Aktivitesinin pH İle Değişim Eğrisi

Rhizopus spp. lipaz enzimi pH 7’de 36,11 (U/mg protein) spesifik aktivite ile maksimum değerine ulaşmıştır. Bu enzimin pH 7 ila 9 aralığında oldukça aktif olduğu dikkat çekmektedir.

Rhizopus spp. lipaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesinde, önceki aşamada optimum olarak elde edilen pH 7 fosfat tamponu kullanılarak 30-55°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık saptaması yapılmıştır. Bu amaçla elde edilen lipaz ekstraktlarının aktivite analizleri Bölüm 3.2.8’de açıklanan yöntemle göre her sıcaklık derecesinde belirlenerek elde edilen sonuçlar Tablo 4.10’da verilmiştir. Lipaz enzimi aktivitesinin sıcaklıkla değişim grafiği ise Şekil 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.10: *Rhizopus* spp. Lipaz Enzimi Aktivitesinin Sıcaklık İle Değişimi (Lipaz ekstraktı protein içeriği = 0,18 mg protein/ mL)

Sıcaklık (°C)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
30	44,58
35	48,19
37	55,55
40	39,44
45	39,03
50	37,08
55	30,56



Şekil 4.4: *Rhizopus* spp. Lipaz Enzimi Aktivitesinin Sıcaklık İle Değişim Eğrisi

Rhizopus spp. lipaz enziminin, Şekil 4.4'den 35-40°C aralığında yüksek aktivite göstererek optimum sıcaklığının 37°C olduğu ve bu değerde maksimum lipolitik aktiviteye (55,55 U/mg protein spesifik aktivite) ulaştığı gözlemlenmektedir. Sıcaklığın yükselmesi ile beraber hızlı bir aktivite kaybı başlamaktadır.

ul-Haq ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2002), *Rhizopus oligosporous* küfünün katı faz fermentasyon yöntemi ile lipaz üretimini gerçekleştirerek enzimin karakteristik özelliklerini incelenmiştir. Buna göre 45°C'de maksimum aktivite gösteren enzimin pH 7,0-8,5 aralığında stabil olduğu vurgulanmıştır.

4.6. Lipaz Tozu Eldesi İçin Optimum Amonyum Sülfat Doygunluk Derecesinin Saptanması

Enzimler, su ile minimum temas yüzeyi gösteren globuler protein yapıları sayesinde su aktivitesi düşük doğal ortamlarında enzimatik faaliyetlerini mükemmel olarak yürütmektedirler. Doğal ortamlarından uzaklaştıkları takdirde ise, kısa zamanda mikro çevrelerinin değişmesi sonucu aktivite kaybetmektedirler. Enzimlerin aktivite kaybının yani inaktivasyonunun ilk aşamasında, su moleküllerinin etkisiyle enzim moleküllerinin küresel yapısı kısmen gevşeyip açılmaktadır. Bu aşamada, protein moleküllerinde kimyasal değişme tam olarak gerçekleşmemektedir. Bu kademedede, sıcaklığın düşürülmesi ve enzimin kısa zamanda susuz hale getirilmesi (liyofilizasyon, aseton veya amonyum sülfat ile çöktürme) işlemleri enzimlere kısa vadede depolanma stabilitesi kazandırılabilir. Burada açıklanan nedenlerden dolayı, çalışmanın bu aşamasında lipaz ekstraktından enzim çöktürülerek susuz katı fazda elde edilmiştir. Böylece enzimin hem kısmi saflaştırılması sağlanmış hem de daha stabil hale getirilmiştir. Çöktürme işlemi amonyum sülfat ilavesiyle yapılmıştır. Çöktürülmüş enzim çalışmada “Lipaz çökeleği” olarak adlandırılmıştır.

Çöktürme işleminde, mümkün olan en yüksek aktivitede lipaz çökeleği elde etmek için kullanılan amonyum sülfatın ortamdaki konsantrasyonu (doygunluk derecesi) değiştirilmiştir. Optimum pH ve optimum sıcaklıkta elde edilen lipaz ekstraktına amonyum sülfat doyma derecesi %30 ve %60 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilmiştir. Bu deneyler sonucu elde edilen lipaz çökelek miktarları, protein içerikleri ve spesifik aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11: Amonyum Sülfat Doygunluk Derecesine Göre Çöktürülen Lipaz Çökelek Miktarı, Protein İçeriği ve Spesifik Aktivitesi

Doygunluk Derecesi	Çökelek		Spesifik Aktivite (U/mg protein)
	Miktarı (mg)	Protein içeriği (mg protein)	
% 30	20,50	3,63	1,20
% 60	101,00	10,70	1,89

Tablo 4.11’de farklı amonyum sülfat doygunluk derecelerinde elde edilen lipaz çökelekleri karşılaştırıldığında, %30 doygunluk derecesinde daha fazla protein çöktürülmüştür. Ancak, %60 doygunluk derecesinde çöktürülen enzim diğerine göre 1,5 kat daha yüksek aktivitelidir. Enzim miktarı fazlalığı ve daha yüksek spesifik aktivite değeri göz önüne alınarak, hidroliz ve esterleşme deneyleri için lipaz çökeleklerinin eldesinde %60 amonyum sülfat doygunluk derecesinde çalışılmaya karar verilmiştir.

4.7. *Rhizopus* spp. Lipaz Enziminin Hidroliz ve Esterleşme Aktivitelerinin Saptanması

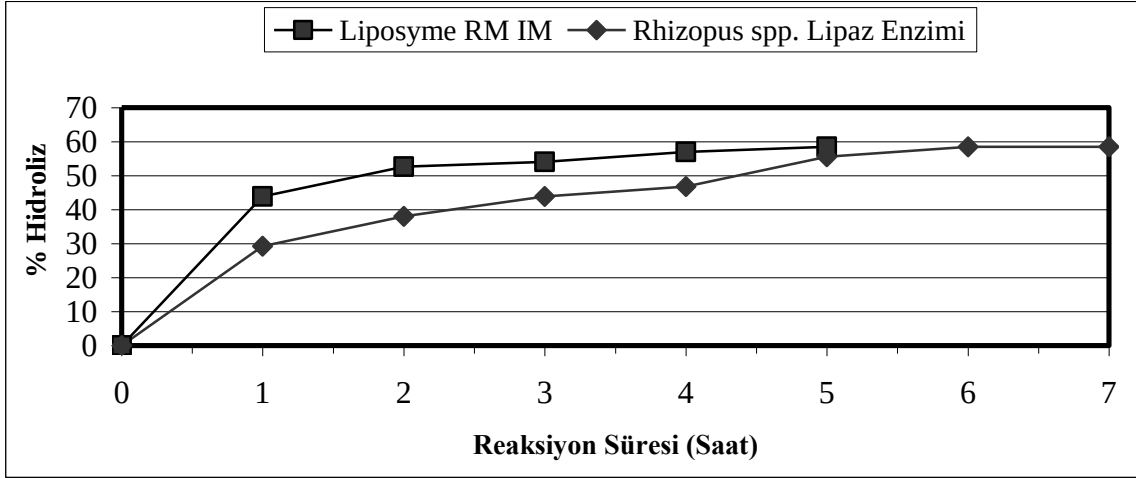
Hidroliz kabiliyetini belirlemek için hekzan ortamında zeytinyağının hidroliz reaksiyonu yürütülmüştür. Hidroliz reaksiyonu Bölüm 3.2.10.3’de tariflenmiş çalışma prosedürüne göre gerçekleştirilmiş ve reaksiyon 7 saat sürdürülmüştür. Karışımdan her saat başında alınan örneklerin yağ asitleri miktarları ve zeytinyağının hidrolizlenme derecesi Tablo 4.12’de verilmiştir. Ticari enzim Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) kullanılarak da aynı reaksiyon tekrarlanmış, elde edilen veriler aynı tabloya yerleştirilmiştir. Tablolarda yer alan zeytinyağının hidrolizlenme derecelerinin zamanla değişim eğrileri Şekil 4.5’de ayrıca gösterilmiştir.

Tablo 4.12: Zeytinyağın Hidroliz Reaksiyonunun Hekzan Ortamında Yürüyüşü

Reaksiyon Süresi (Saat)	Lipozyme RM IM (<i>Rhizomucor miehei</i>)		<i>Rhizopus</i> spp. Lipaz Enzimi	
	YA Miktarı (mmol) ^a	% Hidroliz ^b	YA Miktarı (mmol) ^a	% Hidroliz ^b
1	1,5	43,9	1	29,2
2	1,8	52,6	1,3	38
3	1,85	54,1	1,5	43,9
4	1,95	57	1,6	46,8
5	2	58,5	1,9	55,6
6	2	58,5	2	58,5
7	2	58,5	2	58,5

a. Hidroliz reaksiyonunda açığa çıkan yağ asitleri,

b. Açığa çıkan yağ asitleri molünün toplam yağ asitleri molüne oranıdır.



Şekil 4.5: Zeytinyağının Hidrolizlenme Derecesinin Zamanla Değişimi

Şekil 4.5 incelendiğinde elde ettiğimiz *Rhizopus* spp. lipaz enziminin, ticari lipaz enzimi ile aynı hidrolizlenme kabiliyetine sahip olduğu görülmektedir. Enzim saflaştırılması ve enzim miktarının artırılması ile yüksek hidroliz derecelerine ulaşılabileceği öngörülmektedir.

Rhizopus spp. lipazının esterifikasyon aktivitesini belirlemek amacıyla tripalmitinin kaprik asit ile asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Asidoliz reaksiyonunun çalışma prosedürü Bölüm 3.2.10.3’de detaylı olarak verilmiştir. 4 saat sürdürülen reaksiyon sonucunda karışımdan izole edilen TAG’ların gaz kromatografisi ile yağ asidi bileşimi saptanmış ve elde edilen asidoliz ürünü TAG’ların, yağ asidi bileşimi Tablo 4.13’de görülmektedir. Bu asidoliz reaksiyonu, ticari lipaz enzimi Liposyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) ile paralel olarak yürütülmüş ve elde edilen asidoliz ürünü TAG’ların, yağ asidi bileşimleri yine aynı tabloda verilmiştir.

Tablo 4.13: Tripalmitinin Kaprik Asit İle Asidoliz’inde Elde Edilen TAG’ların Yağ Asitleri Bileşimi

Yağ Asitleri	% Yağ Asitleri		
	Tripalmitin	Lipozyme RM IM (<i>Rhizomucor miehei</i>)	<i>Rhizopus</i> spp. Lipaz Enzimi
10:0 (Kaprik Asit)	-	27,21	12,75
12:0 (Laurik Asit)	0,07	0,07	0,34
14:0 (Miristik Asit)	0,44	0,44	0,5
16:0 (Palmitik Asit)	96,51	69,13	79,8
18:2 (Linoleik Asit)	-	0,11	1,28
18:1 (Oleik Asit)	-	0,65	2,22
18:0 (Stearik Asit)	2,92	2,40	3,11

Tablo 4.13 incelendiğinde Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) ile tripalmitine % 27,21 kaprik asit bağlandığı, *Rhizopus* spp. lipazı ile aynı koşullarda kaprik asit katılımının % 12,75 olduğu belirlenmiştir. Üretilen mikrobiyal enzim saflaştırılmamış olmasına rağmen beklenenden daha fazla esterleşme aktivitesi göstermiştir. Saflaştırma işlemi yapıldığı takdirde ve reaksiyon koşulları sistematik olarak optimize edilmesi durumunda daha etkin bir esterleşme aktivitesi gösterebilecektir. Sonuç olarak bu çalışmada üretilen mikrobiyal lipaz enzimi hidroliz ve esterleşme reaksiyonlarında başarıyla kullanılabilecek özelliğe sahiptir.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, pirinç kepeği, buğday kepeği, ayçiçeği tohumu ve ayçiçeği tohumu küspeleri substrat olarak kullanılmış, lipaz enzimi katı faz fermantasyon tekniği ile laboratuvar şartlarında izole edilen küflerden üretilmiş ve elde edilen enzimin spesifik özellikleri araştırılmıştır. Ön çalışma olarak izole edilen küflerden tarama çalışması yapılmış, *Rhizopus* spp en fazla lipaz aktivitesine sahip küf, ayçiçeği tohumu küspesi ve pirinç kepeği ise en fazla lipaz üretiminin gerçekleştiği besiyerleri olarak seçilmiştir. Standart koşullarda hazırlanan bu besiyerlerine amonyum klorür, yeast ekstrakt ve tripton ilave edilerek azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkileri incelenmiştir. Her iki besi ortamı için saptanan aktivite değerlerinin zamanla değişim eğrileri çizilmiş ve bu eğrilerden maksimum lipaz aktivitesi gösteren inkübasyon zamanı belirlenmiştir. En yüksek lipaz aktivitesi gösteren besiyeri ise lipaz enziminin karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

Bu koşullarda pirinç kepeğine amonyum klorür (%0,75) ilavesi ile gerçekleştirilen katı faz fermantasyonunda, 96 saatin sonunda maksimum enzim sentezi elde edilerek, en fazla spesifik aktivite ($10 \pm 0,35 \text{ U/mL}$) ve en fazla toplam aktivite ($580 \pm 3,53 \text{ U}$) olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen koşullarda üretilen *Rhizopus* spp. lipaz enzimi besi ortamında fosfat tampon çözeltisi ile ekstrakte edilmiş, lipaz ekstraktlarının optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri saptanmıştır. Elde ettiğimiz *Rhizopus* spp. lipazının pH 7’de ve 37°C sıcaklıkta en yüksek spesifik aktivite gösterdiği deneysel olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızın bundan sonraki aşamasında, enzim %60 doyumluk konsantrasyonunda amonyum sülfat ile çöktürülerek lipaz çökeleği elde edilmiştir. Elde edilen çökeleğin spesifik aktivitesi 1,89 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Kısmen saflaştırılmış bu enzimin hidroliz ve esterleşme kabiliyetini ölçmek amacıyla zeytinyağının çözücü ortamında hidroliz ve tripalmitinin kaprik asit ile asidoliz reaksiyonları

gerçekleştirilmiştir. Aynı koşullarda ticari lipaz enzimi Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) ile reaksiyonlar tekrarlanmıştır.

Üretilen *Rhizopus* spp. lipazının hidroliz kabiliyetinin ticari Lipozyme RM IM ile aynı olduğunu, asidoliz reaksiyonundaki etkinliğini ise referans lipaza göre yarı değerlerine eriştiği belirlenmiştir. Enzimimizin saflaştırıldığı taktirde esterleşme kabiliyetinin artması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Akoh, C.C. ve Min, D.B.,** 1998. Microbial lipases. In: Food lipids, Marcel Dekker Inc. New York, USA. p.640-657.
- Borgström, B. and Brockman, H.L.,** 1984. Lipases, pp. 443-466, Elsevier, New York.
- Bradford, M., M.,** 1976 "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.
- Can, A.,** 2004. Lipaz enzimi kullanılarak fındık yağının uzun zincirli çoklu doymamış omega-3 yağ asitlerince zenginleştirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Carroll, L.E.,** 1990. Functionnal properties and applications of stabilized rice bran in bakery products, *Food Tech.*, 74-76.
- Demain, L.A., Davies, J.E.,** 1999. Manual of Industrial microbiology and biotechnology, ASM Pres, Washington, D.C.
- Dorrel, D.G. and Vick, B. A.,** 1997. Properties and Processing of Oilseed Sunflower. In: A. Schneiter (Ed), Sunflower Technology and Production. Agronomy Monogram,. 35.ASA,CSSA, and SSSA, Madison, WI. USA. p. 709-764.
- Elibol, M. ve Özer, D.,** 2000. Lipase production by immobilized *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochem.*, **36**, 219-223.
- Ellaiah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B.,Thaer Taleb, A., Adinarayana, K.,** 2001. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*, *Process Biochem.*, **39** (5), 525-528.
- Erdoğan, F.,** 2002. Ayçiçek asidik yağının enzimatik hidroliz reaksiyonunun incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Essambri, M., Deyris, V., Comeau, L.,** 1998. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents, *J. Biotechnol.*, **60**, 97-103.
- Fadıloğlu, S. ve Erkmen, O.,** 1999. Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1936-1938.
- Fadıloğlu S. ve Erkmen, O.,** 2002. Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*, *Turkish J. Eng. Env. Sci.*, **26**, 249-254.
- FAO,** 1997. Food and Agricultural Organization, FAO Statistics.
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T.,** 1990. Microbial Enzymes and Biotechnology, 2nd Edition, pp. 255-270, Elsevier Science Publishers, New York.
- Haas, M.J. and Joerger, R.D.,** 1995. Lipases of genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*: versatile catalysts in nature and the laboratory. In: Food Biotechnology Mikroorganisms, Eds. Y.H. Hui and George G. Khachatourians. pp.549-600. Wiley-VHC, New York.
- Helrich, K.,** 1990. Official methods of analysis of the association analytical chemists (AOAC), Fifteenth edition, Virginia, USA.
- Kamini, N.R., Mala, J.G.S., Puvanakrishnan, R.,** 1997. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake, *Process Biochem.*, **33**, 505-511.
- Kaplan, N.O., Colowick, S.P.,** 1955. Methods in Enzimology, Volume I., Academic Pres, New York.
- Kaya, Y.,** 2004. Ülkemizde yağlık Ayçiçeği Tarımının Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Edirne.
- Macris, J.B., Kourentzi, E., Hatzinikolau, D.G.,** 1996. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, **31**, 807-812.

- Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M., Gokhale, D.V.,** 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Process Biochem.*, **38**, 715-721.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O.,** 1995. Introduction to Food-Borne Fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.
- Saunders, R.M.,** 1985. Fluorimetric assay of lipase in rice bran, and its application to determination of conditions for rice bran stabilization, *J. Cereal Sci.*, **3**, 79-86.
- Saunders, R.M.,** 1990. Rice bran composition, stabilization and nutritional properties, *Food Quality Research Report*, Western Regional Research Center, United States Department of Agriculture, Albany, California.
- Sayre, R.N.,** 1988. Rice bran as a source of edible oil and higher value chemicals, *The American Association of Cereal Chemists, 73rd Annual Meeting*, San Diego, California, October 12.
- Şahin, N., Özçelik, B., Karaali, A.,** 2003. Yapılandırılmış yağlar ve üretimlerinde lipaz enzimlerinin kullanımı, *Dünya-Gıda*, **8**, 72-77.
- Palma, M.B., Pinto, A.L., Gombert, A.K., Seitz, K.H., Kivattintz, S.C., Castilho, L.R., Freire, D.M.G.,** 2000. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 84-86.
- Pandey, A.,** 2003. Solid-state fermentation, *J. Biochem. Eng.*, **13**, 81-84.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchel, D.,** 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.*, **35**, 1153-1169.
- Pandey, A., Benjamin S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger N., and Soccol, V.T.,** 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 119-131.

- Pitt, J.I. and Hocking, A.D.**, 1997. Fungi and Food Spoilage, 2nd Edition, Blackie Academic and Professional, London.
- 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, *Turk J Biol*, **24**, 79–93, TÜBİTAK.
- Türkay, M.Ş.**, 1980. Katı madde ekstraksiyonu ile bitkisel yağlı maddelerden olan ayçiçeği tohumlarının yeni bir sistemle ekstraksiyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M.I.**, 2002. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation, *Process Biochem.*, **37**, 637-641.
- Uozaki, R.R., Iwasaki, Y. and Yamane, Y.**, 1997. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production of solid-phase glycerolysis of olive oil, *JAACS*, **74**, 445-450.
- Ünal, S.S., Olçay, M., Özer, Ç.**, 1996. Bazı ekmeklik buğday çeşitlerinin kalite niteliklerinin belirlenmesi, *Gıda*, **21** (6), 451-456.
- Valero, F., Ayats, F., Lopez-Santin, J., Poch, M.**, 1988. Lipase production by *Candida rugosa*: fermentation behaviour, *Biotechnol Letter.*, **10**, 741-744.
- Venkata, R.P., Kunthala, C.M., Jayaraman C.M., Lakshmanan, C.M.**, 1993. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation 1: determination of significant process variables, *Process Biochem.*, **28**, 385-389.
- Yücel, S.**, 1999. Pirinç kepeği yağının yerinde esterleşmesi ile yağ asitleri monoesterleri üretimi. *Doktora Tezi*, İ.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Whitehurst, J.R., Law, B.A.**, 2002. Enzymes in Food Technology, CRC Pres, New York.
- Wong, D.S.W.**, 1995. Food Enzymes Structure and Mechanism, pp. 170-200, Chapman and Hall, New York.

EKLER

EK A

Tablo A.1. Pirinç Kepeği substratında geliştirilen çeşitli küflerin toplam lipaz aktivitelerinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
İşlem	44123	5	8825	6,24*	0,023
Hata	8485	6	1414		
Toplam	52608	11			

p<0,05 olasılık düzeyinde küflerin toplam lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır.

Tablo A.2. Pirinç Kepeği substratında geliştirilen çeşitli küflerin spesifik lipaz aktivitelerinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
İşlem	14,02	5	2,80	7,77*	0,013
Hata	2,16	6	0,36		
Toplam	16,18	11			

p<0,05 olasılık düzeyinde küflerin spesifik lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır.

Tablo A.3. Buğday Kepeği substratında geliştirilen çeşitli küflerin toplam lipaz aktivitelerinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
İşlem	50675	5	10135	29,47*	0,00
Hata	2064	6	344		
Toplam	52739	11			

p<0,05 olasılık düzeyinde küflerin toplam lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır.

Tablo A.4. Buğday Kepeği substratında geliştirilen çeşitli küflerin spesifik lipaz aktivitelerinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
İşlem	16,29	5	3,25	32,94*	0,00
Hata	0,59	6	0,09		
Toplam	16,89	11			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde küflerin spesifik lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır.

Tablo A.5. Ayçiçeği tohumu küspesinde geliştirilen çeşitli küflerin toplam lipaz aktivitelerinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
İşlem	74356	5	14871	8,38*	0,011
Hata	10646	6	1774		
Toplam	85003	11			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde küflerin toplam lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır.

Tablo A.6. Ayçiçeği tohumu küspesinde geliştirilen çeşitli küflerin spesifik lipaz aktivitelerinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
İşlem	28,73	5	5,74	8,44*	0,01
Hata	4,09	6	0,68		
Toplam	32,82	11			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde küflerin spesifik lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır.

Tablo A.7. Ayçiçeği tohumunda geliştirilen çeşitli küflerin toplam lipaz aktivitelerinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
İşlem	67056	5	13411	15,03*	0,002
Hata	5355	6	892		
Toplam	72411	11			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde küflerin toplam lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır.

Tablo A.8. Ayçiçeği tohumunda geliştirilen çeşitli küflerin spesifik lipaz aktivitelerinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
İşlem	25,06	5	5,01	15,41*	0,002
Hata	1,95	6	0,32		
Toplam	27,01	11			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde küflerin spesifik lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır.

Tablo A.9. İnkübasyon süresi ve farklı azot kaynaklarının ayçiçeği tohumu küspesi üzerinde geliştirilen *Rhizopus* spp. küfünün toplam lipaz aktivitesi üzerine etkisinin “İki yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
Azot	41331	2	20665	203,46	0,00
Zaman	212521	5	42504	418,48	0,00
Azot*Zaman	23978	10	2398	23,61	0,00
Hata	1828	18	102		
Toplam	279658	35			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde azot kaynakları ve zaman etkisi istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo A.10. İnkübasyon süresi ve farklı azot kaynaklarının ayçiçeği tohumu küspesi üzerinde geliştirilen *Rhizopus* spp. küfünün spesifik lipaz aktivitesi üzerine etkisinin “İki yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
Azot	14,99	2	7,49	326,08	0,00
Zaman	78,56	5	15,71	683,60	0,00
Azot*Zaman	8,05	10	0,80	35,03	0,00
Hata	0,41	18	0,02		
Toplam	102,02	35			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde azot kaynakları ve zaman etkisi istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo A.11. İnkübasyon süresi ve farklı azot kaynaklarının ayçiçeği pirinç kepeği üzerinde geliştirilen *Rhizopus* spp. küfünün toplam lipaz aktivitesi üzerine etkisinin “İki yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
Azot	304576	2	152288	96,57	0,00
Zaman	356353	5	71271	45,19	0,00
Azot*Zaman	22460	10	2246	1,42	0,24
Hata	28386	18	1577		
Toplam	711775	35			

$p < 0.05$ olasılık düzeyinde azot kaynakları ve zaman etkisi istatistiksel olarak önemlidir

Tablo A.12. İnkübasyon süresi ve farklı azot kaynaklarının pirinç kepeği üzerinde geliştirilen *Rhizopus* spp. küfünün spesifik lipaz aktivitesi üzerine etkisinin “İki yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
Azot	81,99	2	40,99	91,34	0,00
Zaman	115,32	5	23,06	51,39	0,00
Azot*Zaman	6,04	10	0,60	1,35	0,28
Hata	8,08	18	0,45		
Toplam	211,43	35			

$p < 0.05$ olasılık düzeyinde azot kaynakları ve zaman etkisi istatistiksel olarak önemlidir

Tablo A.13. Ayçiçeği tohumu küspesinde 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen toplam lipaz aktivitelerine farklı azot kaynakları etkisinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
Azot	15458,40	2	7729,20	24,10*	0,014
Hata	962,30	3	320,80		
Toplam	16420,70	5			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde azot kaynaklarının toplam lipaz aktivitelerine etkisi istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo A.14. Ayçiçeği tohumu küspesinde 120 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen spesifik lipaz aktivitelerine farklı azot kaynakları etkisinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
Azot	5,95	2	2,97	340,33*	0,00
Hata	0,02	3	0,008		
Toplam	5,98	5			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde azot kaynaklarının spesifik lipaz aktivitelerine etkisi istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo A.15. Pirinç kepeğinde 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen toplam lipaz aktivitelerine farklı azot kaynakları etkisinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
Azot	68341	2	34171	36,80*	0,008
Hata	2786	3	929		
Toplam	71127	5			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde azot kaynaklarının toplam lipaz aktivitelerine etkisi istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo A.16. Pirinç kepeğinde 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen spesifik lipaz aktivitelerine farklı azot kaynakları etkisinin “Tek yollu ANOVA” istatistiksel yöntemi ile değerlendirme sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri (Hesaplanan)	P
Azot	18,55	2	9,27	42,99*	0,006
Hata	0,65	3	0,21		
Toplam	19,20	5			

$p < 0,05$ olasılık düzeyinde azot kaynaklarının spesifik lipaz aktivitelerine etkisi istatistiksel olarak önemlidir.

ÖZGEÇMİŞ

İstanbul’da 1979 yılında doğan Dilber Selin Karakoç orta ve lise öğrenimini 1997 yılında Özel Saint-Benoit Fransız Lisesinde tamamladı. İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nden 2002 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl girdiği İ.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı’nda halen öğrencidir.

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1	Ticari Lipazlar ve Üretildikleri Kaynaklar..... 5
Tablo 2.2	Farklı Küf Lipazlarının Moleküler Özellikleri..... 6
Tablo 2.3	Pirinç Kepeğinin Bileşimi..... 12
Tablo 2.4	1997 Yılında Dünya’da Üretilen Çeltik, Pirinç, Pirinç Kepeği ve Pirinç Kepeği Yağı Potansiyeli..... 13
Tablo 2.5	1990-1996 Yılları Arası Çeltik Ekiliş, Üretim ve Verim Miktarları. 13
Tablo 2.6	Ülkemizdeki Ayçiçeği Ekim Alanı, Üretim, Verim, Ayçiçeği Tohumu İşleme, İthalat ve İhracat Miktarları..... 15
Tablo 2.7	Ayçiçeği Tohumu Kabuğunun Kimyasal Bileşimi..... 17
Tablo 2.8	Ülkemizdeki Ayçiçeği Küspesi Tüketim, İthalat ve İhracat Miktarları..... 17
Tablo 4.1	Substrat Numunelerinin % Bileşimi..... 31
Tablo 4.2.	Substratlardan İzole ve Tanımlanan küfler..... 32
Tablo 4.3	Pirinç Kepeğinde Farklı Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Değerleri..... 33
Tablo 4.4.	Buğday Kepeğinde Farklı Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Değerleri..... 33
Tablo 4.5	Ayçiçeği Tohumu Küspesinde Farklı Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Değerleri..... 34
Tablo 4.6	Ayçiçeği Tohumunda Farklı Küf Kültürlerinin Lipaz Aktivite Değerleri..... 34
Tablo 4.7	Farklı Azot Kaynaklarının Ayçiçeği Tohumu Küspesinde Lipaz Eldesine Etkileri..... 36
Tablo 4.8	Farklı Azot Kaynaklarının Pirinç Kepeğinde Lipaz Eldesine Etkileri..... 38
Tablo 4.9	<i>Rhizopus</i> spp. Lipaz Enzimi Aktivitesinin pH İle Değişimi..... 40
Tablo 4.10	<i>Rhizopus</i> spp. Lipaz Enzimi Aktivitesinin Sıcaklık İle Değişimi.... 41
Tablo 4.11	Amonyum Sülfat Doygunluk Derecesine Göre Çöktürülen Lipaz Çökelek Miktarı, Protein İçeriği ve Spesifik Aktivitesi..... 42
Tablo 4.12	Zeytinyağın Hidroliz Reaksiyonunun Hekzan Ortamında Yürüyüşü..... 43
Tablo 4.13	Tripalmitinin Kaprik Asit İle Asidoliz’inde Elde Edilen TAG’ların Yağ Asitleri Bileşimi..... 45
Tablo A.1	Pirinç Kepeği Substratında Geliştirilen Çeşitli Küflerin Toplam Lipaz Aktivitelerinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları..... 52
Tablo A.2	Pirinç Kepeği Substratında Geliştirilen Çeşitli Küflerin Spesifik Lipaz Aktivitelerinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları..... 52

Tablo A.3	Buğday Kepeği Substratında Geliştirilen Çeşitli Küflerin Toplam Lipaz Aktivitelerinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	52
Tablo A.4	Buğday Kepeği Substratında Geliştirilen Çeşitli Küflerin Spesifik Lipaz Aktivitelerinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	53
Tablo A.5	Ayçiçeği Tohumu Küspesinde Geliştirilen Çeşitli Küflerin Toplam Lipaz Aktivitelerinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	53
Tablo A.6	Ayçiçeği Tohumu Küspesinde Geliştirilen Çeşitli Küflerin Spesifik Lipaz Aktivitelerinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	53
Tablo A.7	Ayçiçeği Tohumunda Geliştirilen Çeşitli Küflerin Toplam Lipaz Aktivitelerinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	53
Tablo A.8	Ayçiçeği Tohumunda Geliştirilen Çeşitli Küflerin Spesifik Lipaz Aktivitelerinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	54
Tablo A.9	İnkübasyon Süresi ve Farklı Azot Kaynaklarının Ayçiçeği Tohumu Küspesi Üzerinde Geliştirilen <i>Rhizopus</i> spp. Küfünün Toplam Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin “İki Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	54
Tablo A.10	İnkübasyon Süresi ve Farklı Azot Kaynaklarının Ayçiçeği Tohumu Küspesi Üzerinde Geliştirilen <i>Rhizopus</i> spp. Küfünün Spesifik Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin “İki Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	54
Tablo A.11	İnkübasyon Süresi ve Farklı Azot Kaynaklarının Pirinç Kepeği Üzerinde Geliştirilen <i>Rhizopus</i> spp. Küfünün Toplam Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin “İki Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	55
Tablo A.12	İnkübasyon Süresi ve Farklı Azot Kaynaklarının Pirinç Kepeği Üzerinde Geliştirilen <i>Rhizopus</i> spp. Küfünün Spesifik Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin “İki Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	55
Tablo A.13	Ayçiçeği Tohumu Küspesinde 120 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonunda Elde Edilen Toplam Lipaz Aktivitelerine Farklı Azot Kaynakları Etkisinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	55
Tablo A.14	Ayçiçeği Tohumu Küspesinde 120 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonunda Elde Edilen Spesifik Lipaz Aktivitelerine Farklı Azot Kaynakları Etkisinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	55
Tablo A.15	Pirinç Kepeğinde 96 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonunda Elde Edilen Toplam Lipaz Aktivitelerine Farklı Azot Kaynakları Etkisinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	56
Tablo A.16	Pirinç Kepeğinde 96 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonunda Elde Edilen Spesifik Lipaz Aktivitelerine Farklı Azot Kaynakları Etkisinin “Tek Yollu ANOVA” İstatistiksel Yöntemi İle Değerlendirme Sonuçları.....	56

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan ve daima yol gösteren değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Necla ARAN ve Sayın Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans tez aşamasında yaşadığım zorlukları paylaşarak bana destek olan sevgili laboratuvar arkadaşım, Ar. Gör. Volkan Kalender Köseoğlu'na, ve tüm diğer hocalarıma ve arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca her zaman olduğu gibi bu çalışmam sırasında da yanımda olan ve bana destek olan aileme teşekkür ederim.

Şubat, 2006

Dilber Selin KARAKOÇ

LIPASE PRODUCTION FROM FUNGI BY SOLID-STATE FERMENTATION

SUMMARY

The fungi isolated from wheat and rice bran, sunflower seed and sunflower seed wastes and one mould species obtained from a culture collection were used in this study. Moulds were previously screened for their lipase activities following their growth on these solid substrates. Among the moulds *Rhizopus* spp. isolated from sunflower seed exhibited the highest lipase activity ($462,5 \pm 25,96$ U). Sunflower seed waste and rice bran were found to be the most suitable substrates for lipase production. The effects of different nitrogen sources including tryptone, yeast extract and ammonium chloride on the growth and lipase production of the moulds were also investigated. The highest yields of enzyme activity ($580 \pm 3,53$ U) was obtained on rice bran substrate at the end of 120 h/30°C of incubation when ammonium chloride was used as the nitrogen source. The rice bran substrate contained olive oil (1%), water (60%) and ammonium chloride (0,75%). The optimum pH and temperature values for enzyme activity were found to be 7 and 37°C respectively. *Rhizopus* spp. lipase precipitate obtained by partially purifying with ammonium sulfate showed similar hydrolysing capacity to Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) whereas activity in acidolysis reaction was half of the reference lipase enzyme.

KÜFLERDEN KATI FAZ FERMANTASYON YÖNTEMİ İLE LİPAZ ÜRETİMİ

ÖZET

Çalışmada pirinç kepeği, buğday kepeği, ayçiçeği tohumu ve ayçiçeği tohumu küspesinden izole edilen küfler ile bir merkezden temin edilen küf kültürü kullanılmıştır. Bu substratlar üzerinde katı faz fermentasyon tekniği ile geliştirilen küflerin lipaz aktiviteleri saptanmıştır. Küfler arasında en yüksek lipaz aktivitesini ($462,5 \pm 25,96$ U) ayçiçeği tohumundan izole edilen *Rhizopus* spp. cinsi küfün gösterdiği gözlenmiştir. Lipaz aktivitesinin en yüksek olduğu substratlar ayçiçeği tohumu küspesi ve pirinç kepeği olarak belirlenmiştir. Çalışmada tripton, amonyum klorür ve maya ekstraktı gibi farklı azot kaynaklarının küf gelişimi ve lipaz aktiviteleri üzerindeki etkileri de ayrıca incelenmiştir. En yüksek enzim aktivitesine ($580 \pm 3,53$ U) pirinç kepeğinin substrat, amonyum klorürün azot kaynağı olarak kullanıldığı koşullarda 30°C 'de 120 saatlik inkübasyon sonucunda ulaşılmıştır. Fermantasyon ortamına amonyum klorür (% 0,75) yanında zeytinyağı (%1) ve su (%60) ilave edilmiştir. Bu koşullarda üretilen *Rhizopus* spp.'den elde edilen lipaz enziminin pH 7 ve 37°C sıcaklıkta en yüksek spesifik aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Amonyum sülfat ile çöktürme yoluyla kısmi saflaştırılarak elde edilen lipaz çökteltisinin hidroliz kabiliyetinin ticari Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) ile aynı, asidoliz reaksiyonundaki etkinliğinin ise referans lipaza göre yarı değerlerde olduğu gözlenmiştir.

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : <i>Geotrichum candidum</i> Mikrobiyal Lipazının Stereo Görüntüsü.....	6
Şekil 2.2 : 1,3-Spesifik Lipaz Enzimi Varlığında Gerçekleşen Transesterifikasyon Reaksiyonu.....	8
Şekil 3.1 : Küf İzolasyonunun Şematik Gösterimi.....	19
Şekil 3.2 : Küf İzolatlarının İdentifikasyonunun Şematik Gösterimi.....	20
Şekil 4.1 : Ayçiçeği Tohumu Küspesine Farklı Azot Kaynakları ilavesinin Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	37
Şekil 4.2 : Pirinç Kepeğine Farklı Azot Kaynakları ilavesinin Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	39
Şekil 4.3 : <i>Rhizopus</i> spp. Lipaz Enzimi Aktivitesinin pH İle Değişim Eğrisi...	40
Şekil 4.4 : <i>Rhizopus</i> spp. Lipaz Enzimi Aktivitesinin Sıcaklık İle Değişim Eğrisi.....	41
Şekil 4.5 : Zeytinyağının Hidrolizlenme Derecesinin Zamanla Değişimi.....	44