

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TOPRAK KÖKENLİ MİKROFUNGUSLARDA LİPAZ ÜRETEN SUŞLARIN
ARAŞTIRILMASI, LİPAZ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Serdar ÜLKER

**ŞUBAT 2009
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TOPRAK KÖKENLİ MİKROFUNGUSLARDA LİPAZ ÜRETEEN SUŞLARIN
ARAŞTIRILMASI, LİPAZ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Serdar ÜLKER

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Enstitüye Verildiği Tarih: 16.01.2009
Tezin Savunma Tarihi : 06.02.2009**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehmet Ali AKPINAR**

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2009

ÖNSÖZ

Çay yetiştirilen topraklardan izole edilen mikrofunguslarda lipaz üreten suşların araştırılması, lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu amacıyla yapılan bu çalışma, Rize Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde yapılarak, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Tez konusunu belirleyen, çalışmalarım sırasında karşılaştığım bütün güçlüklerin aşılmasında beni yönlendiren, her türlü desteği ve imkânı sağlayarak değerli bilgilerinden yararlandığım, danışman hocam Doç. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na şükranlarımı sunarım. Doktora eğitimim boyunca ilgisini ve desteğini esirgemeyen, Rize Üniversitesi Rektörü sayın hocam Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI'ya, değerli hocam Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e, Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK hocama, tezin yazımı için kıymetli yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Şükrü ÇELİK'e, deneyler esnasında yardımcı olan Rize Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji ve Kimya Bölümü araştırma görevlileri ve öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca öğrencisi olduğum KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Manevi desteklerini daima üzerimde hissettiğim, beni yetiştiren ve bugün bulunduğum yerde olmamda sonsuz katkıları olan aileme şükranlarımı sunuyorum.

Bu tez çalışması, kısmi olarak 107T267 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında desteklenmiştir. Bu desteğinden ötürü TÜBİTAK'a da teşekkürlerimi sunarım.

Serdar ÜLKER
Trabzon 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Lipazların Özellikleri.....	2
1.3. Lipazların Katalitik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması	3
1.3.1. Özgül Olmayan Lipazlar	4
1.3.2. 1,3-Bağlarına Özgül Lipazlar	4
1.3.3. Yağ Asidi Özgül Lipazlar.....	5
1.4. Lipazların Uygulama Alanları	5
1.4.1. Lipazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	5
1.4.2. Lipazların Gıda Endüstrisinde Kullanımı.....	6
1.4.3. Lipazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı.....	7
1.4.4. Lipazların Biyodizel Üretiminde Kullanımı.....	7
1.4.5. Lipazların Organik Madde Sentezinde Kullanımı.....	7
1.4.6. Lipazların Su Ortamında Oluşan Biyolojik Dönüşümde Kullanımı	8
1.4.7. Lipazların Rasemik Asit ve Alkol Çözeltilerinde Kullanımı	8
1.4.8. Lipazların Bölge Seçici Açılışta Kullanımı	9
1.4.9. Lipazların Ester Sentezinde Kullanımı.....	9
1.4.10. Lipazların Oleokimya Endüstrisinde Kullanımı.....	9
1.4.11. Lipazların Biyosensörler Olarak Kullanımı	10
1.4.12. Lipazların Pestisit Üretiminde Kullanımı.....	10
1.4.13. Lipazların Deri Endüstrisinde Kullanımı	11

1.4.14.	Lipazların Çevre Yönetiminde Kullanımı	11
1.4.15.	Lipazların Kozmetik ve Parfüm Endüstrisinde Kullanımı	12
1.5.	Lipaz Kaynakları	12
1.6.	Protein Saflaştırma Teknikleri.....	15
1.6.1.	Çöktürme Yöntemleri	15
1.6.2.	Diyaliz	16
1.6.3.	Kromatografik Yöntemler	17
1.6.3.1.	Moleküler Elek Kromatografisi.....	17
1.6.3.2.	İyon Değişim Kromatografisi.....	18
1.6.3.3.	Afinite Kromatografisi	18
1.7.	Mikrofunguslar	20
1.7.1.	Mantarların Sınıflandırılması	21
1.7.1.1.	Zygomycetes Sınıfı.....	21
1.7.1.2.	Mucorales Ordosu	21
1.7.1.3.	<i>Mucor</i> Cinsi	22
1.8.	Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	23
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	25
2.1.	Materyal.....	25
2.1.1.	Kullanılan Cihazlar.....	25
2.1.2.	Kimyasallar.....	25
2.1.3.	Funguslar	26
2.1.4.	Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	28
2.2.	Metod.....	28
2.2.1.	Mikrofungusların Canlandırılması	28
2.2.2.	Mikrofungusların Tribütirin Agarda Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	28
2.2.3.	Sıvı Besi Yerinde Lipaz Üretimi	29
2.2.4.	Enzim Özütünün Hazırlanışı	30
2.2.5.	Lipaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	31
2.2.6.	Protein Tayini	31
2.2.7.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi	32
2.2.7.1.	Substrat Boyaması	33
2.2.8.	SDS Jel Elektroforezi	33
2.2.9.	Lipaz Saflaştırılması.....	35

2.2.9.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	35
2.2.9.2. Diyaliz	35
2.2.9.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi	36
2.2.9.4. İyon Değişim Kromatografisi	36
2.2.9.5. Analitik Jel Filtrasyon Kromatografisi	36
2.2.10. Lipazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	37
2.2.10.1. Lipaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	37
2.2.10.2. Lipaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	37
2.2.10.3. Lipaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	38
2.2.10.4. Lipaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	38
2.2.10.5. Hill Eğrisi	38
2.2.10.6. Lipaz'ın pH Kararlılığı	38
2.2.10.7. Lipaz'ın Isıl Kararlılığı.....	39
2.2.10.8. Lipaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	39
3. BULGULAR	40
3.1. Mikrofungusların Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	40
3.2. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i> IDM11B suşunun Lipaz Üretimi	44
3.3. <i>p</i> -NPP Standardı	44
3.4. Lipaz Saflaştırılması	45
3.4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	45
3.4.2. Diyaliz	45
3.4.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi	46
3.4.4. İyon Değişim Kromatografisi.....	46
3.4.5. Analitik Jel Filtrasyon	48
3.5. Lipazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	49
3.5.1. Lipaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	49
3.5.2. Lipaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	50
3.5.3. Lipaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	51
3.5.4. Lipaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	52
3.5.5. Hill Eğrisi	54
3.5.6. Lipaz'ın pH Kararlılığı	54
3.5.7. Lipaz'ın Isıl Kararlılığı.....	55
3.5.8. Lipaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	56

4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	58
5.	ÖNERİLER	66
6.	KAYNAKLAR.....	68
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Bu çalışmada, Rize ilinde çay yetiştirilen topraklardan izole edilen 15 cinse ait 213 mikrofungusun ekstraselüler lipaz aktiviteleri kalitatif olarak test edildi. Bu mikrofunguslar arasında en yüksek aktiviteye sahip olan tür *Mucor hiemalis* f. *corticola* IDM11B olarak belirlendi. Bu suşun ürettiği lipaz saflaştırılarak karakterize edildi.

M. hiemalis f. *corticola* IDM11B suşuna ait ekstraselüler lipaz, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, Sephadex G-75'in kullanıldığı jel filtrasyon ve Q-Sepharose Fast Flow iyon değişim kromatografileri kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma basamaklarında fraksiyonlardaki toplam protein miktarları ve lipaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Enzim, %27.7 verimle 12.63 kat saflaştırıldı. Saflaştırma basamaklarında elde edilen protein örnekleri SDS-PAGE'te yürütüldü ve moleküler ağırlıklarına göre ayrımları yapıldı. Ayrıca analitik jel filtrasyon yapılarak, enzimin moleküler ağırlığının 46 kDa olduğu belirlendi. Saflaştırılmış enzimin optimum pH'sı, optimum sıcaklığı, sıcaklık ve pH stabilitesi, K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı. Enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi incelendi. Enzimin optimum pH'sı 7.0, optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi. pH 7.0–9.0 aralığında, 4 °C'de 72 saat inkübasyondan sonra enzimin oldukça kararlı olduğu gözlemlendi. Isıl kararlılık eğrisi incelendiğinde, 90 dakikalık inkübasyon sonunda enzimin 30 °C'de kararlı olduğu, 50 °C'ye kadar aktivitesini %50 civarında koruduğu tespit edildi. *p*-NPP varlığında *M. hiemalis* f. *corticola* IDM11B lipazının K_m ve V_{maks} değerleri, Hanes-Woolf grafiği yardımıyla sırasıyla, 1.327 mM ve 91.11 µmol/dk olarak belirlendi. Farklı son konsantrasyonlardaki bazı metal iyonlarının aktiviteyi önemli oranda etkilemediği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Mikrofungus, *Mucor hiemalis* f. *corticola*, lipaz, enzim, saflaştırma, karakterizasyon

SUMMARY

Investigating of Lipase Producing Strains of Microfungi with Origin Soil, Purification and Characterization of Lipase

In this study, extracellular lipolytic activities of 213 microfungal strains belonging to 15 genera isolated from tea growing soil in Rize were investigated. Among these microfungi, *Mucor hiemalis* f. *corticola* IDM11B was found as a strain with the highest lipolytic activity. The extracellular lipase of *Mucor hiemalis* f. *corticola* IDM11B was homogeneously purified using a combination of ammonium sulphate precipitation, dialyze, gel filtration column chromatography with Sephadex G-75 and ion exchange chromatography with Q-Sepharose Fast Flow. The total protein quantities and lipase activities in the fractions through purification steps were determined by spectrophotometric method. Enzyme was purified 12.63 folds with a yield of 27.7%. Protein samples collected at the purification steps were run with SDS-PAGE, and separated in terms of molecular weights. In addition, molecular weight of enzyme was determined to be 46 kDa by analytical gel filtration. Optimum pH, optimum temperature, stability of both temperature and pH, K_m , and V_{maks} of purified enzyme were calculated and effects of some metal ions on enzyme activity were investigated. Optimum pH and optimum temperature of enzyme were determined as 7.0 and 40 °C, respectively. The enzyme activity was observed to be quite stable at the pH range of 7.0–9.0, after 72 hours incubation at 4 °C. When thermostability data were evaluated, it was seen that the enzyme was stable at 30 °C after 90 minutes incubation and nearly retained 50% of its original activity until 50 °C. In the presence of *p*-NPP as substrate, K_m and V_{maks} values of *M. hiemalis* f. *corticola* IDM11B lipase were calculated by Hanes-Woolf plot as 1.327 mM and 91.11 $\mu\text{mol/dk}$, respectively. It was determined that different final concentrations of some metal ions did not significantly affect enzyme activity.

Key Words: Microfungi, *Mucor hiemalis* f. *corticola*, lipase, enzyme, purification, characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Lipazların katalizlediği çeşitli reaksiyonlar	3
Şekil 2. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i> (Hagem) Schipper'in petri kabındaki ve mikroskopik görüntüsü	22
Şekil 3. <i>Mucor hiemalis</i> türünün mikroskopik görüntüsü.	23
Şekil 4. Tribütirin içeren tüplerde lipolitik aktivitenin incelenmesi	29
Şekil 5. Spor süspansiyonunun hazırlanışı	30
Şekil 6. Seçilen suşların tribütirin agarlı tüplerdeki lipolitik aktiviteleri	43
Şekil 7. Farklı <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i> suşlarının lipolitik aktiviteleri	44
Şekil 8. Standart olarak kullanılan 4-nitrofenol grafiği	45
Şekil 9. Sephadex G-75 kolon kromatografi fraksiyonlarında lipaz aktivitesi ve protein miktarları	46
Şekil 10. Q-Sepharose Fast Flow kolon kromatografi fraksiyonlarında lipaz aktivitesi ve protein miktarları	47
Şekil 11. <i>M. hiemalis</i> f. <i>corticola</i> suşunun protein profilleri	48
Şekil 12. İyon değişim kromatografisi neticesi alınan farklı fraksiyonlarda SDS-PAGE ve doğal PAGE görüntüleri	48
Şekil 13. Analitik jel filtrasyon standart grafiği	49
Şekil 14. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i> lipazı üzerine pH'nın etkisi	50
Şekil 15. <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i> lipazı üzerine sıcaklığın etkisi	51
Şekil 16. Protein konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi	52
Şekil 17. <i>p</i> -NPP varlığında lipazın substrat doygunluk eğrisi	53
Şekil 18. <i>p</i> -NPP varlığında lipaz aktivitesi için Hanes-Woolf grafiği	53
Şekil 19. <i>p</i> -NPP varlığında elde edilen Hill eğrisi	54
Şekil 20. <i>M. hiemalis</i> f. <i>corticola</i> lipazının pH kararlılığı	55
Şekil 21. <i>M. hiemalis</i> f. <i>corticola</i> lipazının ısıl kararlılığının zamanla değişimi	56

Şekil 22. *M. hiemalis* f. *corticola* lipazı üzerine bazı metal iyonlarının etkisi..... 57

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen lipazların optimum pH ve sıcaklık aralıkları	13
Tablo 2. Endüstriyel olarak önemli lipaz üreticileri ve üretim şirketleri	14
Tablo 3. Kullanılan cihazlar.....	25
Tablo 4. Kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmalar	25
Tablo 5. Çalışmada kullanılan mikrofunguslar.....	27
Tablo 6. Protein tayininde kullanılan çözeltiler.....	31
Tablo 7. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinin bileşenleri.....	32
Tablo 8. SDS ve doğal poliakrilamid jel elektroforezinin bileşenleri	33
Tablo 9. SDS ayırma ve yükleme jellerinin bileşenleri	34
Tablo 10. Kullanılan tamponlar ve hazırlanışları	37
Tablo 11. Suşların tribütirin agarlı tüplerdeki lipolitik aktiviteleri	40
Tablo 12. <i>M. hiemalis</i> f. <i>corticola</i> lipazına ait saflaştırma tablosu.....	47

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Sığır serum albumini
cm	: Santimetre
dH ₂ O	: Saf su
E.C.	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilen daimin tetra asetik asit
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
<i>p</i> -NPP	: para nitrofenil palmitat
PDA	: Patates Dekstroz Agar
PMSF	: Fenil metan sülfonil florid
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEAE-	: Trietil amino etil
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
U	: Ünite
vd.	: ve diğerleri
α	: Alfa
β	: Beta
μ g	: Mikrogram
μ l	: mikrolitre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler; karbon, oksijen, hidrojen, azot ve kükürtten oluşan, kimyasal tepkimelerde katalizör olarak rol alan protein yapısında moleküllerdir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü değişikliğe uğratmadan düzenlerler. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimler, proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler.

Enzimler, doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilirler ve bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi ve enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Enzimler; gıda, deterjan, ecza, tekstil, kâğıt, deri ve kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Çeşitli uygulamalarda giderek daha büyük önem kazanan enzimler ticari olarak üretilmektedir. 2000 yılında, enzimlerin endüstriyel pazardaki değerinin yaklaşık 1.5 milyar dolar olduğu bilinmektedir. Endüstriyel enzim pazarında en önemli yeri, proteaz, lipaz, amilaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimler tutmaktadır. Enzim kullanılan süreçlere olan ilginin artmasının nedenleri arasında, enzimatik reaksiyonların yüksek özgülüğü ve kullanılan ılımlı reaksiyon koşulları sayılmaktadır (Pandey vd., 1999; Houde vd., 2003).

Günümüzde endüstriyel teknolojilerin birçoğunda ve genel olarak biyoteknolojik işlemlerde enzimlerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Ancak maliyetleri ve elde edilebilmelerindeki problemler gibi bazı dezavantajlarından dolayı enzimlerin bazı endüstriyel alanlarda uygulanması sınırlı olmaktadır. Bu açıdan protein mühendisliği ve biyoteknolojik yöntemlerle endüstrinin ihtiyaç duyduğu, bir biyolojik kaynaktan büyük miktarlarda üretilen, yüksek sıcaklıklara ve kullanılacağı endüstriyel uygulama alanındaki çeşitli kimyasal ortamlara dayanıklı enzimlerin geliştirilmesi konusunda oldukça çarpıcı çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar, E.C. 3.1.1.3), yağ-su ara yüzeyinde triacilgliserollerin hidrolizini katalizleyerek di- ve monoacilgliserollere ve gliserole dönüştürme (Veraragavan, 1990; Mogensen, 2005), susuz ortamda ise ester bağlarını sentezleme (Kim vd., 1996) yeteneğine sahiptirler.

Hidroliz, çeşitli esterleşme reaksiyonları, lipid sentezleri (Hong vd., 1998), biyotransformasyon, organik sentezler gibi çeşitli reaksiyonları katalizleyen ve yağ kimyası, deterjanlar, mandıracılık gibi endüstri alanlarında çok fazla kullanılan lipaz enzimi; insan ve diğer memelilerin pankreas ve bağırsaklarından, mantarlardan (Taipa, 1992; Fuciños, 2005; Sağiroğlu, 1993), mikroorganizmalardan (mantar ve bakteriyel), hayvansal ve bitkisel kaynaklardan farklı metodlarla izole edilmiş ve saflaştırmışlardır (Veraragavan, 1990, Bosc-Bierne vd., 1984; Eliana vd., 2001; Yadav, 1998).

Lipazların biyoteknoloji alanında çok geniş uygulama alanları bulunmaktadır (Rua vd., 2003). Günlük endüstriyel üretimlerde, yağ işleminde, yüzey aktif maddelerin üretiminde, ilaç endüstrisinde, deterjan katkı maddelerinde, çeşitli tekstil sentezlerinde ve organik kimyada sentetik reaksiyonların biyokatalizörleri olarak lipazlar kullanılmaktadır (Mohamed vd., 2000).

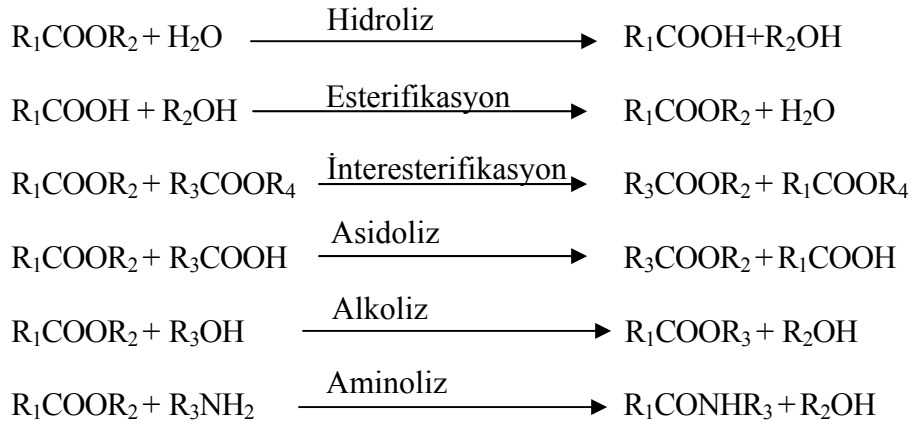
1.2. Lipazların Özellikleri

Lipazlar ilk kez Clause Bernard tarafından 1856'da tanımlanmıştır. 1943 yılında bildirilen kan plazmasındaki lipoprotein lipazlar "temizleyici faktör" olarak nitelendirilmiştir. Daha sonra Anfinsen ve arkadaşları temizleyici faktörü lipolitik enzimlerin varlığı olarak yorumlamışlardır. Birçok bakterinin lipaz ürettiği ve salgıladığı yaklaşık 100 yıl önce, mikrobiyolog C. Eijkmann tarafından rapor edilmiştir (Huang, 2002). Günümüzde enzimlerin kullanıldığı pek çok alanda lipazların önemi giderek artmaktadır. Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantiyo seçicilik, bölge seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur. Lipazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmekle birlikte, endüstriyel olarak daha çok mikrobiyal kökenli lipazlar tercih edilmektedir. Büyük miktarda üretimin mümkün olması ve diğer kaynaklara göre daha ucuza maledilmesi mikrobiyal kaynakların tercih edilmesinde önemli etkenlerdir.

Son zamanlarda lipazların üç boyutlu yapılarının belirlenmesine yönelik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, yapı-işlev ilişkilerinin irdelendiği araştırmalara da ışık tutacaktır (Saxena vd., 1999; Jaeger vd., 2002; Houde vd., 2003).

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar E.C.3.1.1.3) büyük fizyolojik öneme ve endüstriyel potansiyele sahip enzimler olup, gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden şekillenen esterlerin, sentez ve hidrolizini kataliz ederler. Esterazların aksine, lipazlar sadece yağ-su ara yüzeylerine adsorbe olduklarında aktive edilirler ve çözülmüş substratlar üzerinde etkin değildirler. Gerçek lipazlar, triolein ve tripalmitin gibi uzun zincirli yağ asitleri ile gliserolün emülsifiye esterlerini parçalarlar. Lipazlar serin hidrolazlardır ve çözünebilir substratları içeren sulu çözeltilerdeki aktiviteleri düşüktür. Ökaryotik lipazları, absorpsiyon, yeniden düzenleme ve yağ sindirimini içeren lipit metabolizmalarının farklı aşamalarında görev yaparlar. Bitki lipazları ağırlıklı olarak, enerji depolayan dokularda üretilmektedir (Sharma vd., 2001).

Lipazların, trigliseritler üzerindeki hidrolitik aktivitelerinin yanı sıra, esterifikasyon, interesterifikasyon, asidolizis, alkolizis ve aminolizis gibi reaksiyonları da kataliz etme yetenekleri vardır. Lipazlar tarafından kataliz edilen farklı reaksiyonlar Şekil 1'de gösterilmiştir (Houde vd., 2003).



Şekil 1. Lipazların katalizlediği çeşitli reaksiyonlar (Houde vd., 2003)

1.3. Lipazların Katalitik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Lipazlar, hidrolazlar sınıfında olmakla birlikte yağ asidi esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Katalizleme, suda çözünmeyen substratın oluşturduğu ara yüzeyde gerçekleşir. Su ve yağın oluşturduğu bu ara yüzey enzim aktivitesi için

gereklidir. Lipazın immobilizasyonu sırasında lipaz ile birlikte immobilize edilmiş olan su, bu ara yüzeyin oluşmasını sağlar.

Lipazlar tarafından katalizlenen bir ester hidroliz-ester sentez reaksiyonunu Şekil 1’de gösterilmiştir. Reaksiyon geri dönüşümlü olup, reaksiyonun gidişi H_2O ve $R'OH$ derişimlerine bağlıdır. Suyun fazla olması enzimin hidrolitik aktivitesine, alkolün fazla olması ise enzimin sentez aktivitesine neden olmaktadır (Muller vd., 1987).

Dünyada ticari olarak üretilen enzimlerin % 3’ünü lipazlar oluşturmaktadır (Wiseman, 1986). Lipazlar özelliklerine göre özgül olmayan lipazlar, 1,3-bağlarına spesifik lipazlar ve yağ asidi spesifik lipazlar olarak üç ayrı grupta incelenebilir.

1.3.1. Özgül Olmayan Lipazlar

Bu gruba giren lipazlar, triaçilgliserollerin tüm pozisyonlarındaki açil gruplarını koparabilme yeteneğine sahip olup; sonuçta triaçilgliserolleri, gliserol ve serbest yağ asitlerine parçalarlar. Reaksiyonda ana ürün olarak mono- ve diaçilgliseroller oluşur. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girerler. Özgüllüğü olmayan lipazlarla yapılan iç esterleşme reaksiyonlarında meydana gelen ürünler kimyasal iç esterleşme reaksiyonlarında oluşan ürünlere çok benzer, ancak reaksiyon şartları daha yumuşaktır (Sökmen, 2005).

1.3.2. 1,3-Bağlarına Özgül Lipazlar

Bu gruba giren lipazlar, nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından özgül olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda triaçilgliserollerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diaçilgliseroller ve 2-monoaçilgliseroller oluşur. 1,2 (2,3)-diaçilgliseroller ve 2-monoaçilgliseroller, kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçilgliserollere ve 2-monoaçilgliserollere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilir ve sonuçta 1,3-bağlarına özgül lipazlar da özgül olmayan lipazlar gibi triaçilgliserolleri gliserol ve serbest yağ asitlerine kadar parçalayabilirler.

Aspergillus niger, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-bağlarına özgüldür. Bu lipazlar, yağ iç

esterleşmesinde kullanıldığından elde edilen triaçilgliserollerin karışımı kimyasal iç esterleşme sonucunda elde edilen triaçilgliserollerin karışımından çok farklıdır. Çünkü açıl göçü 1 ve 3 pozisyonlarında sınırlandırılmıştır. İç esterleşme reaksiyonları organik fazda gerçekleştiğinden, izomerleşme olamayacağından dolayı triaçilgliserollerin 2-pozisyonundaki açıl grubu değişmez ve böylece iç esterleşme olayını kısmen kontrol altında tutma imkânı doğar (Sökmen, 2005).

1.3.3. Yağ Asidi Özgül Lipazlar

Bu grup lipazlar, triaçilgliserollerdeki bazı yağ asitlerine özgül olup sadece bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar. Yağ asidi özgül lipazlar, iç esterleşme reaksiyonunda kullanılırsa oluşacak ürünler çok sınırlı olmakta ve bu sayede amaca uygun triaçilgliseroller sentezlenebilmektedir (Akşamoğlu, 1997).

1.4. Lipazların Uygulama Alanları

Lipazlar yağların işlenmesinde, gıda işlenmesinde, deterjan endüstrisinde ticari bakımdan önemli bazı kimyasalların sentezinde, kâğıt yapımında, ecza ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipazlar ayrıca yağlı atıkların ve poliüretanın parçalanmasını hızlandırmak için de kullanılırlar (Sharma vd., 2001).

1.4.1. Lipazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

Yağları hidroliz edebilme yeteneklerinden dolayı lipazlar, endüstriyel olarak veya evlerde kullanılan deterjanlara eklenmektedir. Düşük substrat özgülüğü, yıkama koşullarına (pH: 10.0-11.0, 30-60 °C) dayanabilme yeteneği ve birçok deterjanın formülasyonunda yer alan çeşitli enzim ve surfaktanlara dayanıklılık; deterjan endüstrisinde kullanılacak lipazlar için aranan özelliklerdir (Sharma vd., 2001).

Biyolojik deterjan üretimi hızla büyüyen bir teknolojidir. Lipaz, amilaz, proteaz ve selülaz deterjanlara katılan başlıca enzimlerdir. Lipazlar, deterjan içeriğine yağlı yemek kalıntılarını temizlemek üzere katılırlar. Bu enzimler deterjanlara genellikle proteaz ve selülazla birlikte eklenirler. Peroksidaz, oksidaz ve pektinaz deterjanlara eklenebilen diğer enzimlerdir (Schmid vd., 1998).

Bir fungus türü olan *Thermomyces lanuginosus* kökenli lipaz, *Aspergillus oryzae*'de eksprese edilmiş ve ilk ticari rekombinant lipaz olarak 1994 yılında Novo Nordisk tarafından üretilmiştir. “Genencor International” firması 1995 yılında, *Pseudomonas mendocina*'dan “Lumafast” ve *Pseudomonas alcaligenes*'den “Lipomax” isimli iki bakteriyel lipaz üretmiştir. 1998 yılında *Pseudomonas alcaligenes* M-1 suşundan elde edilen, modern çamaşır makinelerinde kullanılabilen ve yağ lekelerini oldukça iyi çıkaran, alkali bir lipaz rapor edilmiştir (Sharma vd., 2001).

Trigliseritlerin kimyasal kullanım alanlarından birisi sabun üretimidir. Bugün için tercih edilen kimyasal yöntemde sabun üretimi, yağın içeriğinden bağımsız olarak 100 °C'de birkaç dakika içinde yüksek verimde gerçekleşmekte, enerji tüketim döngüsü ile en aza indirgenmektedir. Bu süreç kullanılarak yılda yaklaşık 2 milyon ton sabun üretilmektedir. Japonya'da Miyoshi Yushi fabrikasında sabun üretimi, *Candida rugosa* lipazı kullanılarak katı ve sıvı yağların hidroliz edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Schmid vd., 1998).

1.4.2. Lipazların Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Katı ve sıvı yağlar gıdaların önemli bileşenleridir. Trigliseritlerin fiziksel özellikleri, besin değeri ve lezzeti; gliserol omurgasındaki yağ asidinin konumundan, zincir uzunluğundan ve doymunluk derecesinden etkilenir. Lipazlar, gliserol omurgasındaki yağ asidi zincirinin konumunu değiştirerek, lipitlerin özelliklerinin değişimine olanak sağlar. Göreceli olarak ucuz olan bu yöntem, yağın daha değerli bir yağa dönüşümüne olanak tanır (Sharma vd., 2001).

Metabolik etkilerinden dolayı doymamış yağ asitleri son zamanlarda, eczacılıkta ve gıda katkılarında giderek artan miktarlarda kullanılmaktadır. Doymamış yağ asitlerinin çoğu, membran lipitlerinin ve prostoglandinlerin normal sentezi için gereklidir. Mikrobiyal lipazlar, menhaden, tuna ve borage yağı gibi hayvansal ve bitkisel yağlardan, doymamış yağ asitlerinin elde edilmesinde kullanılır. Serbest doymamış yağ asitleri ve onların mono ve digliseritleri; kolesterol düzeyini düşüren, iltihabı ve kanın pıhtılaşmasını engelleyen çeşitli ilaçların üretilmesinde kullanılırlar. Lipazlar ayrıca peynirlerde istenen lezzetlerin elde edilmesinde, geleneksel kimyasal esterifikasyon reaksiyonları ile elde edilemeyen modifiye açilgliserollerin, sıvı ve katı yağlardan interesterifikasyon ile elde edilmesinde

kullanılır. Bu enzimlerden ayrıca balık ve et ürünlerinden yağların uzaklaştırılmasında yararlanır (Sharma vd., 2001).

1.4.3. Lipazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı

Ağacın hidrofobik içeriği olarak tanımlanan trigliseritler ve mumlar, kağıt hamuru ve kağıt yapımında sorun yaratmaktadır. Lipazlar kağıt yapımı için kullanılan kağıt hamurundan belirtilen maddelerin uzaklaştırılması için kullanılır (Jaeger vd., 1998; Sharma vd., 2001).

1.4.4. Lipazların Biyodizel Üretiminde Kullanımı

Alternatif bir enerji kaynağı olan biyodizelin önemi günden güne artmaktadır. Biyodizel, kanola, soya ve aspir gibi çeşitli bitkiler kullanılarak kimyasal yollarla üretilmektedir. Yenilenebilir bir enerji kaynağı olması ile tercih nedeni olmaktadır. Bitkisel yağlardan transesterifikasyon reaksiyonu (alkoliz) ile biyodizel elde edilmektedir. Transesterifikasyon reaksiyonunda triağliserol, monohidrik bir alkolle (etanol, metanol), katalizör (asidik, bazik katalizörler ile lipazlar) varlığında ana ürün olarak yağ asidi esterleri ve gliserol vererek esterleşir. Ayrıca esterleşme reaksiyonunda yan ürün olarak di-ve monogliseridler ile serbest yağ asitleri oluşur. Bununla beraber endüstriyel boyutta üretimi, katalizörlerin pahalılığı nedeniyle maliyeti yüksektir. Enzimler suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsüllerde tutuklanmakla immobilize edilirler. *P. fluorescens* lipazının immobilize edilerek kullanılması ve *Saccharomyces cerevisiae*'de ifade edilen *Rhizopus oryzae* lipazının biyokatalizör olarak kullanılması sonucu maliyetler düşürülmektedir (Iso vd., 2001; Matsumoto vd., 2001).

1.4.5. Lipazların Organik Madde Sentezinde Kullanımı

Lipazlar organik kimyasalların sentezinde giderek daha çok kullanılmaktadır. Lipazlar, “kemo”, “regio” ve “stereo seçici” transformasyon reaksiyonlarının birçok çeşidini katalize edebilirler. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır. Bu enzimler hidrofilik-lipofilik ara yüzde çalışırlar ve reaksiyon karışımındaki organik çözücülere tolerans gösterirler (Sharma vd., 2001).

Lipazlar, su-yağ ara yüzeyinde suya karışmayan trigliseritlerin hidrolizini katalize ederler. Belirli koşullar altında reaksiyon karışımındaki su miktarı, lipaz tarafından katalize edilen reaksiyonun yönünü belirler. Suyun çok az miktarda olduğu ya da hiç olmadığı zamanlarda, yalnızca esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları meydana gelirken su içeriğinin yüksek olduğu koşullarda hidroliz reaksiyonları oluşur (Sharma vd., 2001).

1.4.6. Lipazların Su Ortamında Oluşan Biyolojik Dönüşümde Kullanımı

Ester hidrolizi, iki-fazlı su ortamında lipazlar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. *Pseudomonas cepacia*'dan elde edilen lipazın, n-heptanda bulunan *p*-nitrofenil palmitatı (*p*-NPP) hidroliz ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca çeşitli transformasyon reaksiyonları için hidrofobik sol-jel matrisine içine tespit edilmiş lipazlar kullanılmıştır (Sharma vd., 2001).

Lipazların enantiyo seçiciliğini arttırmak üzere, çeşitli mutageniz çalışmalarını yapılmaktadır. Örneğin, bir kiral esterin hidrolizini katalize eden lipazın enantiyo seçiciliği, dört mutasyon döngüsü sonucunda % 2'den % 81'e kadar artırılabilmiştir. *Candida parapsilosis*'ten elde edilen lipaz-açıl transferaz, bir yağ asidi olan hidroksiamik asidin tek fazlı sıvı/sulu ortamdaki biyosentezini katalize eder. Reaksiyon substratları, yağ asidi ya da yağ asidi metil esterleri gibi açıl vericileri ve hidroksilamindir. Verici bir esterden, Hidroksilamine açıl grubu transferi, serbest yağ asitlerinin reaksiyonuna benzer şekilde kataliz edilmiştir. Bu özellik, *Candida parapsilosis* lipazını sulu ortamda yağların doğrudan biyolojik dönüşümü için seçilen bir enzim haline getirmiştir. Öte yandan, *Burkholderia* sp.'den elde edilen ve bir ester olan t-bütilloktonatı (TBO) hidrolize edebilen yeni bir lipaz bulunmuştur. Bu lipazın sahip olduğu hidroliz yeteneğinin, diğer ticari lipazlara oranla 100 kez daha fazla olduğu doğrulanmıştır (Sharma vd., 2001).

1.4.7. Lipazların Rasemik Asit ve Alkol Çözeltilerinde Kullanımı

Stereo seçici özelliklerinden dolayı lipazlar, birbiriyle karışmayan tek fazlı sistemlerde çeşitli rasemik organik asit karışımlarını çözmek için kullanılmaktadır. Rasemik alkoller aynı zamanda, lipazların kataliz ettiği transesterifikasyon reaksiyonları ile oluşturulan saf enantiyomerler içinde de çözülebilirler.

Başka bir çalışmada *Candida rugosa*'dan elde edilen ham ve saflaştırılmış lipazların, çok az hidrate olmuş hidrofobik organik çözücüde ve tamamen susuz organik çözücüler

içindeki davranışı karşılaştırılmıştır. Saflaştırılmış lipazın, kuru n-heptan içindeki aktivitesi, saf olmayan lipaza göre nispeten daha düşüktür. Buna karşın su konsantrasyonunun çok düşük olduğu koşullarda n-bütanolü rasemik 2-(4-klorofenoksi) propanoik asitin esterifikasyonunda, yalnızca saf enzim aktivite göstermiştir.

Mikroorganizmalar ve enzimlerin özellikle rasemik karışımları sonlandırmak için kullanışlı oldukları kanıtlanmıştır. Böylece saf (S)-ibuprofen, lipazın katalize ettiği hidroliz ya da esterifikasyon reaksiyonu aracılığıyla elde edilmiştir. Benzer bir şekilde 2-fenoksi-1-propanol; *Pseudomonas* sp. lipazı kullanılarak ve enantioseçici transesterifikasyon reaksiyonu yoluyla kendi enantiyomerleri içinde çözülmüştür (Sharma vd., 2001).

1.4.8. Lipazların Bölge Seçici Açilasyonda Kullanımı

Lipazlar bazı steroidleri, şeker ve şeker türevlerini yüksek bir bölge seçiciliği ile açillerler. Monoaçillenmiş şekerler, trietil karboksilatlar ve çeşitli monosakkaritlerden, susuz piridin içinde üretilirler. *Aspergillus niger*'den elde edilen lipazın, bir açilasyon reaksiyonunun aksine, preaçillenmiş metil β -D-glikopiranozitin, bölge seçici deaçilasyonunu katalize ettiği saptanmıştır (Sharma vd., 2001).

1.4.9. Lipazların Ester Sentezinde Kullanımı

Lipazlar esterlerin sentezinde etkin katalizörler olarak kullanılmaktadır. Kısa zincirli yağ asitlerinden elde edilen esterler, gıda endüstrisinde tatlandırıcı ve lezzet arttırıcı olarak, uzun zincirli yağ asitlerinin metil ve etil esterleri ise, dizel yakıtları zenginleştirmede kullanılmaktadır. Literatürde *Candida antarctica*'dan elde edilen lipaz ile hekzan içinde gerçekleştirilen, alkol ve laktik asit esterifikasyon çalışmaları yer almaktadır (Sharma vd., 2001).

1.4.10. Lipazların Oleokimya Endüstrisinde Kullanımı

Oleokimyasal işlemlerde lipazların kullanılması, alkololizis, asidolizis, hidroliz ve gliserolizis süreçlerinde harcanan ısıyı azaltarak, enerji tasarrufu sağlamaktadır (Sharma vd., 2001).

1.4.11. Lipazların Biyosensörler Olarak Kullanımı

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir sensörü bulunan ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, analiz edilecek madde miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. Biyosensörler; biyolojik, kimyasal, biyokimyasal ve elektronik bileşenlerden oluşur. Biyosensörlerin bileşenleri arasında; enzimler, antikorlar, proteinler, hücreler, hücre özütleri, immobilize ya da bağlı konumda uygun sinyal üreticileri yer alabilir. Katı ve sıvı yağ endüstrisinde, gıda teknolojisinde ve klinik uygulamalarda, triaçilgliserol miktarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Analiz için kullanılan kimyasal yöntemler pahalı ve zaman alan tekniklerdir. Son zamanlarda lipazların biyosensör bileşeni olarak kullanımı, umut verici bir gelişme olarak kabul edilmektedir.

Uygulamalı tıpta bakteriyel biyoluminesanslı biyosensörler yapılmıştır. Tıpta lipidlerin tanımlanmasında, lipazların analitik kullanımı önem taşımaktadır. Lipazlar, triaçilgliserolden gliserol eldesinde kullanılmakta, kimyasal ve enzimatik yöntemlerle ayrılan gliserol miktarı hesaplanabilmektedir.

Biyosensör bileşeni olarak lipazlar tıptaki uygulamaların yanı sıra, gıda ve içecek endüstrisinde, kirlilik ve pestisit kalıntılarının analizinde de kullanılırlar (Pandey vd., 1999).

1.4.12. Lipazların Pestisit Üretiminde Kullanımı

Lipazların kullanımı, maliyeti ve çevresel kirlenmeyi azaltma potansiyeli taşıdığından, kimyasal madde üreticileri, bu enzimlerden pestisit üretimi ve çeşitli yeni ürünlerin/süreçlerin geliştirilmesi için yararlanma çabasına girmişlerdir. Aktivitesini uzun süre koruyan immobilize lipaz formlarının kullanılması maliyeti de düşürmektedir. Son zamanlarda, lipaz uygulamaları ile üretilen çeşitli pestisitler (insektisitler, herbisitler, fungusitler ve onların öncülleri) kullanılmaktadır. Lipazların pestisitlerin ve optik olarak aktif bileşiklerin üretimine yönelik kullanımları, en önemli uygulama alanları arasında yerini almaktadır. Bu bileşikler genellikle, karboksilik esterler ya da alkollerin rasemik karışımlarının çözeltilerinden üretilirler (Pandey vd., 1999).

1.4.13. Lipazların Deri Endüstrisinde Kullanımı

Deri işlemeciliğinde; deri altındaki yağların uzaklaştırılması ve kılların yok edilmesi gerekir. Lipaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimleri içeren enzim kombinasyonlarıyla, deri işlenmesinde yeni bir yol açılmaktadır. Derinin, içinde su bulunan bir küvete alınarak yıkanması ve kıllarından arındırılmasını içeren yeni bir enzimatik yöntemle, deri tabaklamaya hazır hale getirilmektedir. Ortam pH'sının 8.0-13.0 aralığında olduğu küvetlerde, alkali lipaz kullanılmaktadır. Bu işlemde suya batırma, yıkama, kıldan arındırma basamaklarında bir çeşit yüzey aktif ajan (tensit) kullanılarak, deterjan kullanımı en düşük seviyeye indirilir. Tabaklama işlemleri genellikle bazik ortamda yapılır. Bu yüzden alkalofilik mikroorganizma kaynaklı enzimler, bu tip uygulamalarda daha yararlı olmaktadır. Yüksek alkali koşullarda büyüeyebilen ve enzimleri deri işlenmesinde kullanılmak üzere elverişli olan birçok *Bacillus* türü bulunmuştur. Alkalen lipazlar; alkalen/nötral proteazlar ve sürfaktan içeren bir karışım içinde kullanılabilirler (Pandey vd., 1999).

1.4.14. Lipazların Çevre Yönetiminde Kullanımı

Atıkların yok edilmesi için yapılan biyoremediasyon (toprak ya da suda meydana gelen kalıntıların, çeşitli organizmalar veya ürettikleri enzimler sayesinde uzaklaştırılması) işlemi, biyoteknolojide kullanılan yeni bir yöntemdir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen lipazlar kullanılarak, yağlı atıklar ve yağ kalıntıları temizlenebilmektedir. Lipazlar ayrıca atık suların arıtılmasında geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Geliştirilen bir teknoloji ile fabrikalarda atık suların arıtımı sırasında oluşan tortulardan biyogaz elde edilmektedir. Bu teknolojide, içinde lipazın da yer aldığı enzim karışımları kullanılmaktadır.

Yapılan bir başka çalışmada, atıkların, lipofilik mikroorganizmaların doğrudan atık içinde üretilmesi yoluyla arıtılması hedeflenmektedir. Lipazların kullanıldığı diğer bir uygulamada, kullanışlı ürünler içindeki polyester atıkları indirgenerek, laktonların ve esterifiye olmamış yağ asitlerinin üretimi sağlanmaktadır. Lipazların biyoremediasyonda kullanımının önemi, gerçekleştirilen başarılı uygulamalar sayesinde artmıştır. Lipazlar; su soğutma sistemlerinde oluşan biyofilm tortularının kaldırılmasında, atık yağların değerlendirilmesi ve fabrikalardan çıkan atık gazların saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Lipofilik mikroorganizmaların, özellikle mayaların kullanılması ile endüstriyel atıklardan

tek hücre proteini üretimi; atık yönetiminde lipazların farklı uygulama alanlarının oluşmasına yol açmaktadır. Lipazlar, yağ fabrikalarının atık sularına karışan zeytinyağı gibi yağların yok edilmesi için de kullanılmaktadır. Bu işlem, atıkların içinde lipaz üreten mikroorganizmaların üretilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Pandey vd., 1999).

1.4.15. Lipazların Kozmetik ve Parfüm Endüstrisinde Kullanımı

Lipazlar, sürfaktanlar ve aroma üretimindeki aktivitelerinden dolayı kozmetik ve parfüm endüstrisinde kullanılmaktadır. Sürfaktanlar ve aromalar kozmetik ve parfümlerin başlıca bileşenleridir. Monoaçilgliseroller ve diaçilgliseroller, gliserolün lipazlar tarafından katalize edilen esterifikasyon reaksiyonları sonucu elde edilen ve kozmetikte kullanılan sürfaktanlardır. Karışık asit poliesterleri ve açilgliserol ester yağ asitleri, lipaz aracılığıyla üretilen kozmetiklerin ana bileşenleridir (Pandey vd., 1999).

1.5. Lipaz Kaynakları

Lipaz enzimleri hemen hemen tüm canlılar yani bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir.

Hayvansal kaynaklı lipazlardan pankreatik lipaz üzerinde en çok araştırma yapılan ve en iyi bilinen lipolitik enzimdir (Brackerhoff ve Jensen, 1974). Bitkisel kaynaklı lipazlardan bazı fasulye türleri ve hububatlar bu enzimin kaynaklarıdır (Taweel ve Sungur, 1995). Fasulye türlerinden elde edilen lipazlar uzun zincir spesifitesi ve pozisyonel spesifite göstermektedir (Jacob, 1994).

Lipaz üreten mikroorganizmalar oldukça geniş bir dağılım gösterir (Godtfredsen, 1990). Mikrobiyal lipazlar bakteri, küf ve mayalardan elde edilmektedir. Lipazların elde edildiği kaynak, optimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık aralığını etkilemektedir. Çizelge 2.1'de farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen lipazların optimum pH ve sıcaklık aralıkları görülmektedir (Taweel ve Sungur, 1995; Stead, 1986).

Ekstraselüler lipazların uygun koşullar altında birçok mikroorganizma grubu tarafından üretildiği ve *Corynebacterium acnes*, *Leptospira pomona* gibi patojenik bakteri lipazlarının bu bakterilerin virulansı ile ilişkili olduğu, bakteriyal lipazların evsel atıklardaki yağların parçalanması veya nehir sedimentlerinin ekolojik görüntüsü gibi çevresel problemlerle ilişkili olduğu, yağ içeren günlük ürünlerin ve diğer yağlı gıdaların

Tablo 1. Farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilen lipazların optimum pH ve sıcaklık aralıkları

Kaynağı	Optimum Sıcaklık	Optimum pH
<i>Aspergillus niger</i>	30-40 °C	5.0-7.0
<i>Mucor japonicus</i>	30-45 °C	5.5-8.5
<i>Rhizopus delemar</i>	30-45 °C	5.0-7.0
<i>Rhizopus japonicus</i>	30-45 °C	5.0-7.5
<i>Penicillium cyclopium</i>	30-50 °C	4.5-7.5
<i>Penicillium roqueforti</i>	25-35 °C	6.0-8.0
<i>Humicola lanuginosa</i>	40-60 °C	5.5-8.5
<i>Candida cylindraceae</i>	30-50 °C	5.0-8.0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	25-35 °C	5.0-8.0
<i>Geotrichum candidum</i>	40-60 °C	5.0-8.0
<i>Pseudomonas fragi</i>	30-55 °C	7.0-9.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 °C	7.0-9.5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30-50 °C	7.0-9.0

özellikle psikrotrofik bakterilerin lipazları ile bozunduğu ve esas olarak funguslardan elde edilen lipazların ve onların farklı substrat spesifitesinden dolayı gıda ve diğer endüstrilerde birçok kullanım alanı bulmasından dolayı çeşitli araştırmacıların tercih nedeni olmuştur (Stead, 1986).

Lipolitik özelliğe sahip ve sütte bozunmaya neden olan psikrofil bakteriyel flora içerisinde Gram negatif basil olan *Pseudomonas* genusu içinde dominant olarak bulunan *P. fluorescens* ve bunun yanında *P. putida*, *P. fragi*, *P. aeruginosa*'nın bulunduğu saptanmıştır (Stead, 1986). Ayrıca *Alcaligenes*, *Areomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* ve koliform gibi psikrofil Gram negatif bakteriler ile beraber *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* ve *Arthrobacter* gibi Gram pozitif psikrofil türlerin de çiğ sütte bulunduğu Cousin (1982) tarafından rapor edilmiştir (Stead, 1986). *Streptomyces* sp. *Streptomyces fradiae* lipazları oldukça yüksek aktivite göstermektedir (Sztajer vd., 1988).

Pseudomonas fragi'den elde edilen lipaz, 2-monoglisericid üretimi için triglisericidlerin 1,3 pozisyonundaki yağ asitlerini tercihen hidrolizler. Böyle pozisyonel spesifiteye sahip bazı fungal lipazlar da *Aspergillus niger* ve *Rhizopus delemar*'da saptanmıştır (Stead, 1986). *Rhizopus* lipazları, stereo seçici değildir fakat ya 1 ya da 3 pozisyonundaki yağ

asitlerini hidrolizler. *Rhizopus arrhizus*'dan elde edilen lipaz optimal pH, yüksek katalitik oran, trigliseridlerin primer esterleri için özgülük gibi özellikleri ile pankreatik lipaza benzer özellikler göstermektedir (Brockerhoff ve Jensen 1974). *Penicillium roqueforti* ve *P. camemberti* olgunlaştırılmış peynirlerde en yüksek lipolitik aktiviteye sahiptir. *P. roqueforti* lipazı Mn^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının varlığında aktivite gösterirken, *P. camemberti* lipazı Ca^{2+} iyonlarının ortamda bulunması ile maksimum aktivite göstermektedir (Fox, 1991).

Tablo 2. Endüstriyel olarak önemli lipaz üreticileri ve üretim şirketleri (Godtfredsen, 1990)

Lipaz Üreticisi	Firma
<i>Achromobacter</i> sp.	Meito Sangyo
<i>Alcaligenes</i> sp.	Meito
<i>Arthobacter</i> sp.	Sumitomi
<i>Aspergillus niger</i>	Amano, Novo, Röhm
<i>Candida cylindraceae</i>	Amano, Enzyme Dev. Co., Metio
<i>Chromobacterium viscosum</i>	US Biochemicals, Toyo Lozo
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano, Novo
<i>Mucor miehei</i>	Amano, Gist, Röhm, Novo
<i>Phycomyces nitens</i>	Takedo
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
<i>Rhizopus</i> sp.	Serva, Nagase
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Precibio (France), Boehringer-Mannheim, Rapidase, Gits-Brocades
<i>Rhizopus delemar</i>	Chemical Dynamics, Tanabe
<i>Rhizopus japonicus</i>	Amano, Nagase, Osaka Saiken Lab
<i>Rhizopus niveus</i>	Amano

Fungal lipazlar üzerinde 1950'lerden beri çalışılmaktadır ve Lawrence, Brockerhoff ve Jensen kapsamlı görüşler sunmuşlardır. Bu lipazlar, düşük maliyetli soy verme özelliklerinin olması, ısıya ve pH'ya karşı dayanıklı olmaları, substrat özgülüğü ve

organik çözücülerde aktif olmalarından dolayı kullanılmaktadırlar. Ticari lipazların başlıca üreticileri *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae* türleridir. Lipazlar bu küflere ilave olarak, *Penicillium cyclopium* (Okumura vd., 1981), *P. citrinum* (Kriger vd., 1997; Pimentel vd., 1994), *Aspergillus japonicus*, *Mucor japonicus* (Godtfredsen, 1990; Decagny vd., 1998), *M. meihei* (Decagny vd., 1988; Safari vd., 1993) tarafından da üretilmektedir.

Lipazların endüstriyel çapta üretimi seçilmiş mikroorganizmaların kültürleri ile yapılmaktadır. Tablo 2’de günümüzde endüstriyel olarak uygulanabilir lipaz üreticileri ve üretim şirketleri belirtilmiştir (Godtfredsen, 1990).

Endüstriyel olarak önemli lipaz üreten mayalar *Candida cylindraceae*, *C. curvata*, *Yarrowia lipolytica*, *C. mycoderma*, *Debaromyces mycoderma*, *Rhodotorula pilimanae*, *R. rubra*, *Geotrichum candidum* ve *Cryptococcus albidus*’tur (Jacob, 1994; Jacobsen vd., 1989; Muderhwa vd., 1986; Huang vd., 1988; Fox, 1991).

1.6. Protein Saflaştırma Teknikleri

Proteinler; çözünürlük, büyüklük, yük ve özgül bağlanma afiniteleri gibi karakteristik özelliklerine göre saflaştırılabilirler. Protein saflaştırma çalışmaları sonucunda elde edilen saf/kısmen saf proteinlerin biyokimyasal işlevleri incelenebilir ve proteinlerin aminoasit dizileri doğrulanabilir. Saf proteinler veya ligandları ile etkileşimde olan proteinler ile yapılan X-ışını kırınım analizleri ile proteinlerin üçüncül yapıları hakkında bilgi edinilebilir.

Protein saflaştırma çalışmalarında asıl amaç, istenilen proteinin, diğer proteinlerden ve protein olmayan hücre bileşenlerinden ayrılmasıdır. Protein saflaştırmasında istenen en iyi sonuç; istenilen protein miktarında ve aktivitesinde azalma olmazken, diğer proteinlerin miktarının azalmasıdır (Berg vd., 2002; Dennison, 2002).

1.6.1. Çöktürme Yöntemleri

Protein kimyası çalışmalarının erken evrelerinde, enzimlerin birbirinden ayrılması için kullanılan başlıca yol, proteinlerin içinde buldukları çözücüde yapılan değişiklikler yoluyla çöktürülmesiydi. Günümüzde çeşitli çöktürme yöntemleri uygulanmaktadır. Bu

yöntemlerin en çok kullanılanlar arasında; polietilen glikol çöktürmesi, çeşitli çözücüler kullanılarak çöktürme işlemleri ve tuz çöktürmesi sayılabilir.

Yüksek tuz konsantrasyonunda gerçekleştirilen çöktürme işlemi, temelde protein yüzeyinde bulunan hidrofobik aminoasit rezidülerine dayanır. Proteinlerin hidrofobik yan zincirlere sahip amino asitleri yüzeyde konumlanmakta ve sulu çözeltiler içindeki su molekülleri, bu yan zincirler etrafında toplanarak kümeler oluşturmaktadır. Çözünen tuz iyonları, proteinlerin çevresinde kümelenmiş serbest su molekülleriyle etkileşime girerek proteinlerdeki yan zincirlerin birbirleriyle etkileşmesine olanak yarattığından proteinler yüksek tuz konsantrasyonunda çökerler. Bu nedenle, yüzeyinde daha fazla hidrofobik nokta taşıyan proteinler daha erken çökerken, daha az apolar yan zincir içeren proteinler daha yavaş çökeceklerdir.

Çöktürme işlemlerinde; sülfat ve fosfat gibi anyonların, potasyum, sodyum ya da amonyum gibi katyonlarla olan tuzlar tercih edilmektedir. Bu tuzlar, proteinle doğrudan etkileşime girmek yerine, kümelenmiş su moleküllerine bağlanarak, proteinlerin kolay bir şekilde çökmesini sağlayacak niteliktedir. Diğer tuzlara göre nispeten daha saf olması, ucuz olarak elde edilmesi ve daha iyi bir çözünürlüğe sahip olmasından ötürü, amonyum sülfat en çok tercih edilen tuzdur. Amonyum sülfat tuzunun pH, çözünürlük, ısı, yoğunluk gibi etkenlerle uyumlu olması ve proteinlerin yapılarının bozulmasına engel olarak proteinleri kararlı kılması, bu tuzun tercih edilmesindeki diğer nedenler arasında sayılabilir. Çöktürme işlemi için ayrıca organik çözücüler de kullanılmaktadır. Bu yöntemde hidrofobik bölgeler etrafındaki su, organik çözücü molekülleri ile yer değiştirir. Suda çözünebilen proteinlerin çözünme oranı azalır ve proteinler arası etkileşimin gerçekleşmesi sonucunda proteinler bir araya gelerek çökerler (Scopes, 1994; Dennison, 2002).

1.6.2. Diyaliz

Çöktürme işlemi gerçekleştirildikten sonra ortamda kalan tuz, sonraki saflaştırma basamaklarında biyolojik aktiviteyi etkilemekte ve iyonik değişimlere neden olmaktadır. Bu nedenle protein çözeltisi içinde yer alan tuzun çöktürme işlemi takiben ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla diyaliz işlemi gerçekleştirilir. Diyaliz işleminde, seçilmiş büyüklükte gözeneklere sahip selüloz membran gibi yarı geçirgen membranlar kullanılmaktadır. Kısmen saflaştırılmış protein özütü yan geçirgen membran

içine alınır. Protein moleküllerinin büyüklüğü, membran üzerindeki porların çapından daha büyüktür. Bu nedenle, örneğe göreceli büyük bir hacimde ve uygun iyonik güçteki tampon çözelti içine bırakılan membran, tuz ve tamponun geçişine izin verirken, protein moleküllerine geçit vermez. Böylece, büyük proteinlerin membran içinde kalması sağlanırken, diğer çözünen moleküller membrandan diyaliz tamponuna geçerler. İlgilenilen proteini içeren çözelti, diyaliz tamponu sıklıkla değiştirilerek fazla tuzdan arındırılır. Diyaliz, fazla tuzun protein materyalinden uzaklaştırılması için en sık kullanılan yöntemdir.

Bu aşamadan sonra gerçekleştirilen saflaştırma basamaklarındaki amaç; ilgilenilen proteinin diğer proteinlerden daha büyük oranda ayrılması, istenilen protein miktarında ve aktivitesinde azalma olmaksızın proteinin saflaştırılmasıdır. Bu aşamada çeşitli kromatografik yöntemler kullanılır. Kromatografik yöntemler sayesinde proteinler büyüklüklerine, iyonik yüklerine veya özgül moleküllere olan ilgilerine göre birbirlerinden ayrılabilir. Kullanılacak kromatografik yöntem, çalışılan proteinin özelliklerine göre seçilir (Berg vd., 2002; Dennison, 2002; Scopes, 1994).

1.6.3. Kromatografik Yöntemler

1.6.3.1. Moleküler Elek Kromatografisi

Bu kromatografi yöntemine literatürde “Jel filtrasyon”, “Jel permeasyon”, “Jel eksklüzyon” isimleri de verilmektedir. İyi bir ayırım potansiyeline sahip olan moleküler elek kromatografisi, proteinleri büyüklüklerine göre ayırır. Protein örneği, çözünmeyen ancak yapısında yüksek derecede su içeren dekstran ve agaroz gibi karbohidrat ya da poliakrilamid boncuklardan oluşan ve porları olan bir matriksle ayrılmaktadır. En çok bilinen ticari matriks örnekleri; Sefadeks (çapraz bağlı dekstran), Biojel (çapraz bağlı poliakrilamid boncukları) Sefakril, Süperoz ve Süperdeks'dir. Bu matrikslerde, küçük proteinler boncukların içinden geçerek gruplara ayrılırken, büyük moleküller yalnızca boncukların arasındaki porlarda, tampon içinde konumlanırlar. Bir karışım halinde uygulanan proteinlerden büyük olanları, boncuklar arasından hızla akarak kolondan ayrılırken, daha küçük moleküler büyüklüğe sahip olanlar, bu boncuklu yapıda oyalanarak kolondan daha geç çıkabilmektedirler. Moleküler elek kromatografisinde, çeşitli yeni jel

materyallerinin geliştirilmesiyle daha geniş bir moleküler ağırlık aralığında bulunan proteinleri daha hızlı ayırmak üzere olanak yaratılmaktadır (Scopes, 1994; Berg vd., 2002).

1.6.3.2. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisinde proteinler, verilen pH değerindeki net yüklerine göre ayrılırlar. Matriks, proteinlerle elektrostatik çekimlerine göre ilişki kurar. İyon değişim kromatografi matriksleri, anyon değişim (pozitif yüklü matriks) ve katyon değişim (negatif yüklü matriks) matriksleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. En çok bilinen anyon değişim kromatografileri arasında; Dietil aminoetil (DEAE-) ve Trietilaminoetil, Kuaternar amino etil (TEAE-, QAE-) sayılabilir. Katyon değişim kromatografileri kimyasal olarak iki gruba ayrılırlar. Bunlar zayıf “Carboxymethyl substituent” (CM-), güçlü sülfonat gruplarıdır (S- ve SP-). Eğer protein pH 7.0’de net bir pozitif yüke sahipse, saflaştırma negatif yüklü bir kolonla gerçekleştirilir. Sodyum iyonları, matrikse bağlanmak üzere proteinler üzerindeki pozitif yüklü gruplarla yarıştıklarından, yoğun pozitif yüke sahip proteinler, yıkama tamponunda yer alan NaCl ya da başka bir tuzun konsantrasyonunun artırılmasıyla kolondan ayrılırlar. Düşük yoğunlukta pozitif yüklü gruplar içeren proteinler matriksten erken, diğerleri ise daha geç ayrılmaktadır. Pozitif yüklü proteinler (katyonik proteinler), karboksimetil selüloz (CM-) gibi katyon değiştirici matriksler ile ayrılabilirken; negatif yüklü olanlar (anyonik proteinler), DEAE gibi anyon değiştirici matriksler ile ayrılabilir (Scopes, 1994; Berg vd., 2002).

1.6.3.3. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi protein saflaştırmada uygulanan diğer bir güçlü kromatografi yöntemidir. Bu teknik, özgül kimyasal gruplara yüksek oranda afinite gösteren proteinlerin saflaştırılmasını sağlar. Afinite kromatografisinde, istenen proteinle özgül olarak ilişki kurabilen ve immobilize haldeki doğal ligantlar kullanılır. Ligant, kolon içinde paketlenen uygun parçaya immobilize edilir ve proteini içeren örnek kolondan geçirilir. İstenen proteinle özgül etkileşim kurulurken, diğer proteinler kolondan doğrudan geçerler. Matrikse bağlanan proteinler matriksten yüksek konsantrasyonlarda tuz ya da afinitesi daha güçlü bir başka ligant içeren çözeltilerin geçirilmesi ile geri kazanılabilmektedir. Afinite

kromatografisinin başarısı, protein ile yem olarak kullanılan molekülün birbirlerine olan ilgisinin gücüne bağlıdır (Berg vd, 2002).

Mikrobiyal lipazların birçoğu hücre dışına salgılanır. Fermentasyon sürecini hücrelerin santrifüj ya da filtrasyon eliyle sıvı kültür ortamından uzaklaştırılması izler. Hücre içermeyen kültür, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ya da organik çözücülerle yapılan özütleme ile konsantre edilir. Literatürde mevcut saflaştırma süreçlerinin yaklaşık % 80'inde çöktürme işlemleri kullanılmış olup, bu çalışmaların % 60 kadarı amonyum sülfat, % 35'i ise etanol, aseton ya da genellikle hidroklorik asit olmak üzere asitlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Çöktürme basamağını, iyon değişimi, jel filtrasyon ve affinite kromatografisi gibi bir veya daha fazla kromatografik yöntem izler (Saxena ve ark., 2003).

Mikrobiyal ve memeli kökenli lipazların saflaştırılması, enzimlerin üç boyutlu yapısının ve primer aminoasit dizisinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Saflaştırılmış lipazların X-ışını kırınım analizleri, yapı-işlev ilişkilerinin irdelenmesine imkan vermekte, ayrıca lipazların hidroliz, sentez ve transesterifikasyon mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunmaktadır (Taipa ve ark., 1992).

İstenilen saflık derecesi için tek kromatografik basamak genellikle yeterli olmadığından ardışık kromatografik basamakların kullanılması söz konusudur. En yaygın kullanılan kromatografik yöntem iyon değişim kromatografisidir. Çalışmaların yaklaşık % 67'sinde tercih edilmekte, bu grup çalışmaların % 29'unda birden fazla iyon değişim kromatografisi kullanılmaktadır. En çok kullanılan anyon değişim kromatografisi dietil aminoetil (DEAE-) (çalışmaların % 58'inde), katyon değişim kromatografisi ise karboksi metil selülozdür (CM-). Son zamanlarda Q-sefaroze ve trietil aminoetil gruplarına dayanan güçlü iyon değiştiricilerin kullanımı da artmıştır. Çok kullanılan saflaştırma yöntemlerinden ikincisi olan jel filtrasyon, saflaştırma çalışmalarının birçoğunda kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda bir kezden daha fazla kullanılır. Affinite kromatografisi, saflaştırma çalışmalarının % 27'sinde kullanılmaktadır. Kromatografik teknikler arasında % 18 oranında tercih edilen hidrofobik etkileşim kromatografisi, oktil ya da ferdi işlevsel gruplarından oluşan hidrofobik tutucular ile birlikte kullanılır. Memeli kökenli ve fungal lipazların glikoprotein doğasından dolayı, saflaştırma çalışmalarında Concanavalin A ve Heparin kullanılmaktadır. Adsorbsiyon kromatografisi, saflaştırma çalışmalarının bazılarında tercih edilmektedir ve adsorban olarak en çok hidroksiapatit kullanılmaktadır (Saxena vd., 2003).

Afinite yöntemlerine genellikle saflaştırma çalışmalarının ilk aşamalarında başvurulur. Ancak afinite kromatografi materyalleri pahalı olduğundan, çöktürme basamaklarını takiben sıklıkla, daha ekonomik olan iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri tercih edilmektedir. Jel filtrasyon kromatografisinin yüklü proteinler için ayırma kapasitesinin düşük olmasına karşın, saflaştırma çalışmalarının ilk basamaklarında kullanıldığı örneklerin yanı sıra, son basamak olarak tercih edildiği saflaştırma şemaları da bulunmaktadır (Saxena vd., 2003).

Mikrobiyal lipazları saflaştırmak için seçilen kromatografik yöntemler aynı ham lipazın saflaştırma sürecinde bile farklılık gösterebilir. Bir saflaştırma yönteminin seçimi, çoğunlukla toplam saflaştırma şemasının özel bir bölümünde bu yöntemle duyulan gereksinime bağlıdır. Lipaz saflaştırılmasında, alışlagelmiş prosedürler bazen sorun yaratır, uzun sürer ve enzim düşük bir verimle elde edilir. Son zamanlarda lipaz saflaştırmasında yeni teknolojilere başvurulmaktadır (Saxena vd., 2003). Membran prosesler, immünoafilaştırma, hidrofobik etkileşim kromatografisi, lipaz saflaştırma çalışmalarında uygulamaya yeni giren yöntemlerdir (Saxena vd., 2003; Gupta vd., 2004).

1.7. Mikrofunguslar

Toprak mikroorganizmalar bakımından çok zengindir. Toprağın canlı kısmını oluşturan mikroorganizmalar içerisinde bakteriler en fazla olanıdır. Daha sonra ise aktinomisetler, funguslar, protozoonlar ve toprak mikrofaunası gelir (Brady, 1990). Toprakta mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen faaliyetlerde mikrofunguslar özel öneme sahiptir. Mikrofunguslar gerçek hücre çekirdekleri olan, eşeyli ve eşeysiz üreyebilen ve klorofil içermeyen canlılardır.

Mikrobiyal kaynaklar arasında mikrofunguslar önemli bir yere sahiptir. Mikrofunguslar, primer metabolitlerinden olan enzimleri ile endüstriyel açıdan önemli bir kaynak olabilmektedir (Brady, 1990).

Mikrofunguslardan mikrobiyal aktiviteleri sonucu çeşitli enzimler, organik asitler, antibiyotikler, alkoller, vitaminler ve proteinler (Tek Hücre Proteini) gibi biyolojik ve tıbbi öneme sahip moleküller elde edilmektedir (Bıyık, 1993). Endüstriyel boyutta üretim amacı ile enzimlerin kullanılmaya başlanması son yıllarda artış göstermektedir. Ticari enzimlerin hemen hemen tamamı biyolojik materyallerden izole edilmektedir (Telefoncu, 1997).

1.7.1. Mantarların Sınıflandırılması

Mantarların sınıflandırması konusunda tartışmalar devam etmekte ve yapılan sınıflandırmalar değişmektedir. Günümüzde daha ziyade Alexopoulos ve Mims'in (1996) yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmada altı sınıf tanımlanmıştır: Oomycetes, Chytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Fungi Imperfecti. Bu çalışmanın konusunu oluşturması bakımından Mucorales ordosu üyelerinden olan *Mucor* cinsinin dahil olduğu Zygomycetes sınıfı üzerinde durulacaktır.

1.7.1.1. Zygomycetes Sınıfı

Bu sınıfta bulunan mantarların çoğunluğu saprofit olarak yaşarlar. Topraktaki organik maddelerin parçalanmasında faydalı, fakat birçok depolanmış besin maddelerinin bozulmasında rol almaları ile de zararlı olurlar. Bu sınıftan parazit olan mantarlar bazı yüksek bitkiler, böcekler, protozoa ve mantarlar üzerinde kimisi zayıf, kimisi fakültatif, kimisi de obligat parazit olarak yaşarlar. Sınıfın adı, bunların eşeyli çoğalmalarında iki gametangiumun tamamen birleşmesi neticesi meydana gelen sporlarının zygospor oluşundan ileri gelir. Bu sınıfta eşeysiz çoğalma neticesiyle sporangiospor ve konidia oluşur. Bunların her ikisi de hareketsiz sporlardır. Bu sebeple Zygomycetes üyeleri karaya uyum sağlamış mantarlardır. Hayat devrelerini tamamlamak için suya ihtiyaçları yoktur (Öner, 1998).

Zygomycetes sınıfı büyüme durumları, yetiştirme ortamları ve eşeysiz çoğalmalarına göre 3 takıma ayrılmıştır: Mucorales, Entomophthorales ve Zoopogales.

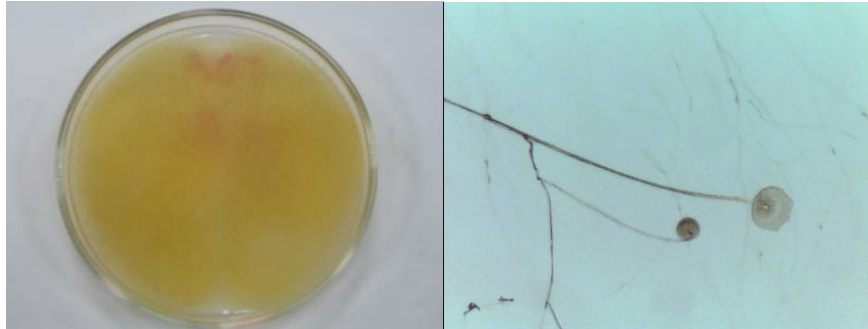
1.7.1.2. Mucorales Ordosu

Bu takım içinde incelenen mantarların büyük kısmı saprofitik, pek azı da parazit olarak yaşar. Bazı *Mucor* ve *Rhizopus* türleri insan sinir sisteminde parazit olarak bulunabilir ve hastalık etkeni olabilmektedirler. Mucorales türleri, toprakta bol miktarda bulunur ve toprakta bulunan bitki ve hayvan artıklarının parçalanıp tekrar bitkilerin alabileceği forma dönüştürülmesinde ayrıştırıcı mikroorganizmalar olarak rol oynarlar. Bu grupta yer alan bazı mantarlar, basit karbohidratları kolayca parçaladıklarından bünyesinde karbonhidrat içeren besin maddelerinin bozulmasında rol oynayarak zararlı olurlar. Bunun yanı sıra

endüstride kullanılan ve insanlık için faydalı olan bazı mantarlar da mevcuttur. Mesela *Rhizopus stolonifer* laktik asit ve fumarik asit, *Rhizopus oryzae* alkol ve laktik asit, diğer bazı Mucorales üyeleri sitrik asit, oksalik asit, suksinik asit ve bazı enzimlerin sentezinde kullanılırlar (Öner, 1998).

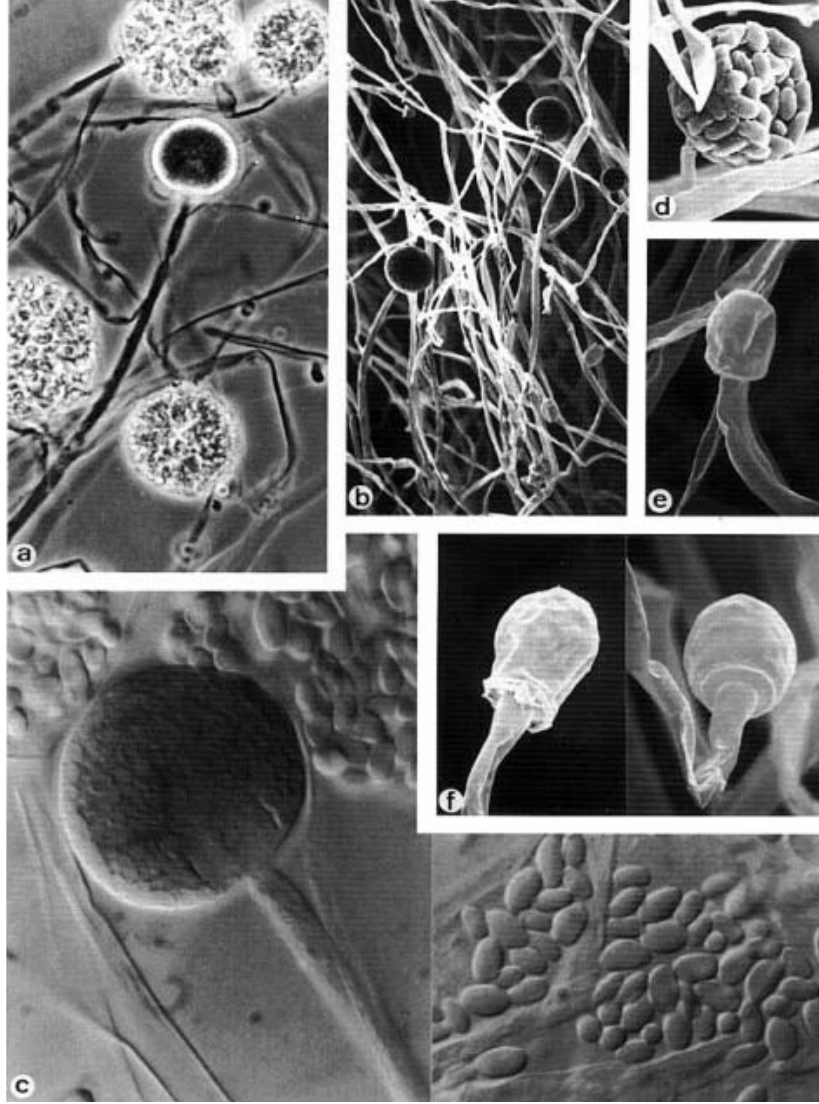
1.7.1.3. *Mucor* Cinsi

Mucor Mich. ex. Fr. 1832 cinsinin morfolojik özellikleri Toprak Mikrofungusları (Hasenekoğlu, 1991) adlı eserde şöyle ifade edilmektedir: Koloniler genellikle çok hızlı gelişir. 20 °C'de 3-5 günde kabını tamamen doldurmakta, genellikle birkaç santimetre yüksekliğinde, beyaz-sarı ve daha sonra genellikle sporangiumların gelişmesi sonucu koyu gri renkte olmakta, sporangioforlar yoğun bir keçe oluşturmakta, dik, bazal rizoidler yok, az veya çok simpodiyal olarak, bazen de rasemoz olarak dallanmakta, uçlarında çok sporlu sporangiumlar gelişmekte, apofiz yok, büyük bir kolumella var, sporangium çeperi hemen



Şekil 2. *Mucor hiemalis* f. *corticola* (Hagem) Schipper'in petri kabındaki ve mikroskopik görüntüsü (X40)

erimekte, veya devam ederek olgunlaşınca parçalanmakta, genellikle kalsiyum oksalattan oluşan iğnelerle kaplı, sporangiosporlar şeffaf, grimsi veya kahverengimsi, düz çeperli veya hafif pürüzlü, globoz-elipsoidal, bazı türlerde şeffaf klamidiosporlar gelişmekte, batık hifler maya benzeri ve genellikle oidium olarak adlandırılan hücreler oluşmakta, zigosporlar havai misellerde çiftleştirilebilir tipler arasında gelişmekte, koyu kahverengi, karakteristik ve az veya çok satellat siğilli, suspansorlar eşit, türler genellikle heterotallik, nadiren homotalliktir (Domsch vd., 1980)



Şekil 3. *Mucor hiemalis* türünün mikroskopik görüntüsü. a, b: Sporangioforlar, c, d: sporangiumlar ve sporangiosporlar, e, f: kolumella (a, x640, b, x460, c, x1600, d, x1900, e, x1600, f, x2500)(de Hoog vd., 2000)

1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Lipazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde bulunurlar. Memeli kaynaklı lipazlar üzerinde birçok çalışma yapılarak karakterize edilmişlerdir. Günümüzde pahalı memeli enzimlerine karşı iyi bir alternatif olan mikrobiyal lipolitik enzimlere olan ilgi artmaktadır. Bu enzimler, birçok katabolik metabolizmada iş gördüklerinden dolayı, geniş bir substrat özgüllüğü gösterirler. Lipazlar kofaktöre ihtiyaç duymamaları, geniş bir optimum pH aralığına sahip olmaları, organik çözücülerde genellikle kararlı olmaları, sadece lipidlerin hidrolizi değil, aynı zamanda endüstriyel olarak değerli ürünlerin sentezi

için de kullanılmaları araştırmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır. Fungal lipazlar üzerinde ÷lkemizde yapılan çalışma sayısı çok azdır (Topal vd., 2000; Fadiloęlu ve Erkmen, 2002). Bu çalışmanın, alandaki bu boşluğu kısmen de olsa dolduracağı dūř÷n÷lmektedir.

Çalışmada, Rize’de çay yetiştirilen topraklardan izole edilip tanımlanan mikrofungusların lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi, en iyi aktivite g÷steren mikrofungus lipazının saflaştırılması, enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, ısıl kararlılığı, pH kararlılığı ve bazı metal iyonlarının enzim ÷zerine etkisinin belirlenmesi çalışmaları yapılarak, enzimin end÷striye kazandırılmasında temel adımların atılması hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
UV-Vis Spektrofotometre	UV-2601	Shimadzu
Soğutmalı santrifüj	Rotina 35R	Hettich
Protein elektroforezi	P81	Owl Scientific
pH metre	HI 9025C	Hanna
Jel görüntüleme Sistemi	Digi-Doc It	UVP
İnkübatör	BD 115	Binder
Thermoblok	-	Stuart Scientific
Peristaltik Pompa	SJ-1211	Atto
Fraksiyon Kolektörü	2112	LKB
Çalkalayıcı	3005	GFL
Çalkalayıcılı su banyosu	ST-402	Nüve

2.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmalar

Kimyasal	Temin Edilen Firma	Katalog No
β -merkaptetanol	Merck	1.12006
2-propanol	Merck	1.00995
4-nitrofenol	Sigma	1048
Agar	Fluka	05039
Akrilamid	Sigma	A3553
Alfa naftil asetat	Sigma	N8505
Amonyum sülfat	Sigma	11225
APS	Merck	1.01200
Arabic Gum	Sigma	G9752
Asetik Asit	Riedel de Haen	27225

Tablo 4'ün devamı

Aseton	Teknik	
CuSO ₄	Sigma	C1297
Benzamidine	Sigma	B6506
Bromofenol mavisi	Merck	1.08122
CaCl ₂	Merck	1.02389
EDTA	Sigma	E9884
Etanol	Riedel de Haen	32221
Fast Red-Tr	Sigma	F8764
FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck	F7002
Folin belirteci	Fluka	47641
Gliserol	Merck	1.04092
Glisin	Sigma	G8898
Glukoz	Merck	1.08342
HCl	Fluka	84434
K ₂ HPO ₄	Merck	1.05101
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	Merck	1.12040
Maya ekstratı	Merck	1.03753
Metanol	Riedel de Haen	24229
MgSO ₄	Sigma	M7506
MnSO ₄ .H ₂ O	Sigma	M7634
N,N'-metilen bisakrilamid	Sigma	M7279
NaCl	Merck	1.06404
Na ₂ CO ₃	Merck	1.06398
N ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	ADR	1039-32-4
NaH ₂ PO ₄	Merck	1.06398
NaN ₃	Sigma	S8032
NaOH	Merck	1.06494
Pepton	Fluka	68971
PDA	Merck	1.10130
PMSF	Sigma	P7626
<i>p</i> -NPP	Sigma	N2752
SDS	Merck	1.12012
Sodyum potasyum tartarat	Sigma	S2377
Tribütirin	Fluka	91012
Tris	Bio-Rad	161-0719
Triton X-100	Merck	1.08605
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	Z4750

2.1.3. Funguslar

Çalışmada kullanılan mikrofunguslar Rize Üniversitesi Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan sağlandı (Karaoğlu ve Ülker 2006). Koleksiyondan alınan 15 cins, 28 türe ait 213 suş kullanıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Çalışmada kullanılan mikrofunguslar

Cins veya Tür Adı	Suş Sayısı
<i>Acremonium furcatum</i>	8
<i>Alternaria</i> sp.	1
<i>Aspergillus flavus</i>	8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	24
<i>Aspergillus niger</i>	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	3
<i>Fusarium</i> sp.	19
<i>Gliocladium roseum</i>	5
<i>Gliocladium virens</i>	1
<i>Gongronella butleri</i>	5
<i>Mortierella antarctica</i>	7
<i>Mucor hiemalis</i> f.corticola	10
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1
<i>Paecilomyces marquandii</i>	1
<i>Penicillium chermesinum</i>	1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1
<i>Penicillium citrinum</i>	2
<i>Penicillium corylophilum</i>	2
<i>Penicillium cyaneum</i>	1
<i>Penicillium decumbens</i>	5
<i>Penicillium frequentans</i>	1
<i>Penicillium nigricans</i>	3
<i>Penicillium phialosporum</i>	3
<i>Penicillium rubrum</i>	2
<i>Penicillium</i> sp.	24
<i>Penicillium spinulosum</i>	1
<i>Penicillium steckii</i>	1
<i>Penicillium trzebinskianum</i>	2
<i>Penicillium waksmani</i>	4
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	1
<i>Scopulariopsis brumptii</i>	1
<i>Mycelia sterilia</i>	40
<i>Trichoderma</i> sp.	3
<i>Trichoderma harzianum</i>	15
<i>Trichoderma koningii</i>	5
<i>Zygorhincus exponens</i> var. <i>smithii</i>	1
Toplam	213

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve tamponlar Tablo 10'da verilmiştir.

2.2. Metod

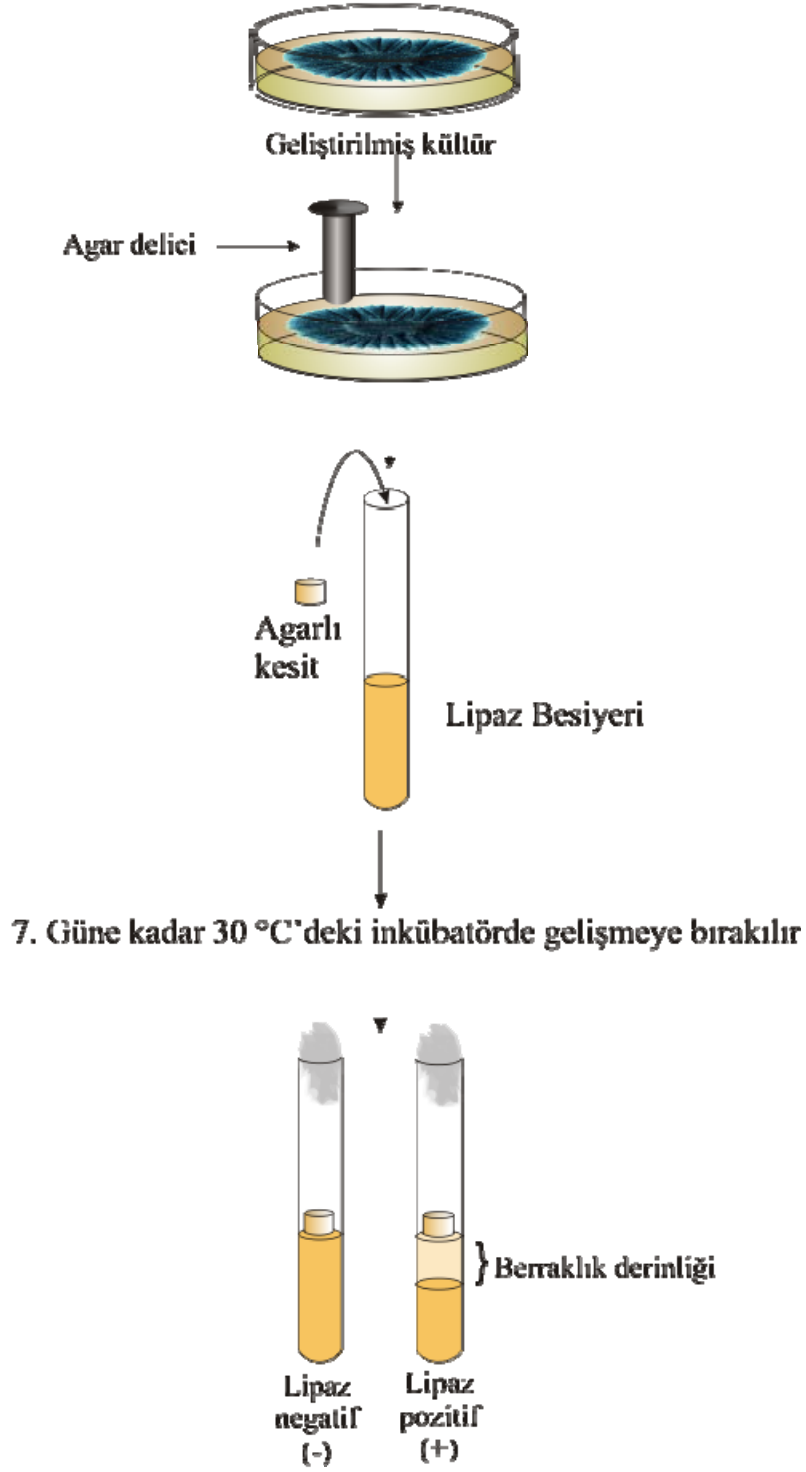
2.2.1. Mikrofungusların Canlandırılması

Kültür koleksiyonunda saklanan mikrofungusların canlandırılması amacıyla PDA besiyeri kullanıldı. 39 g PDA 1000 mL saf suda çözüldü. PDA besiyeri 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra yaklaşık 45–50 °C'ye kadar soğutuldu ve steril edilmiş petrilere 15'er ml olarak dağıtıldı. İğne öze ile besiyerinin iki noktasına ekim yapılarak 30 °C'de 7 gün inkübasyona bırakıldı.

2.2.2. Mikrofungusların Tribütirin Agarda Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Mikrofungusların lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi için Lima vd.'nin (1991) kullandığı derin kültürle "opasite kapasitesi" yöntemi kullanıldı. Bunun için %1 agar, %5 pepton, %0.03 maya ekstraktı saf su içinde çözdürülerek hazırlanmış besiyeri kullanıldı. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilip 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra % 1 oranında tribütirin eklendi. Daha sonra steril tüplere 7 ml dağıtılıp dik durumda katılaştırıldı. PDA'lı petrilere basit ekim yöntemiyle ekilen ve 30 °C'de 7 gün inkübe edilen mikrofungus kültürlerinden steril mantar delici ile 1 cm çapında parçalar kesilip tüplere dik olarak konuldu (Şekil 4).

Tüpler 30 °C'de 7 gün boyunca inkübe edildi ve besiyerinde meydana gelen berraklık gözlemlendi. Tüplerde meydana gelen berraklık lipaz pozitif (+) olarak değerlendirilirken, besiyerinde herhangi bir değişikliğin olmaması lipaz negatif (-) olarak değerlendirildi. Ekim yapılan tüplerde 5. ve 7. günlerde yapılan ölçümlerin sonunda en iyi aktivite gösteren türler belirlendi (Tablo 11).



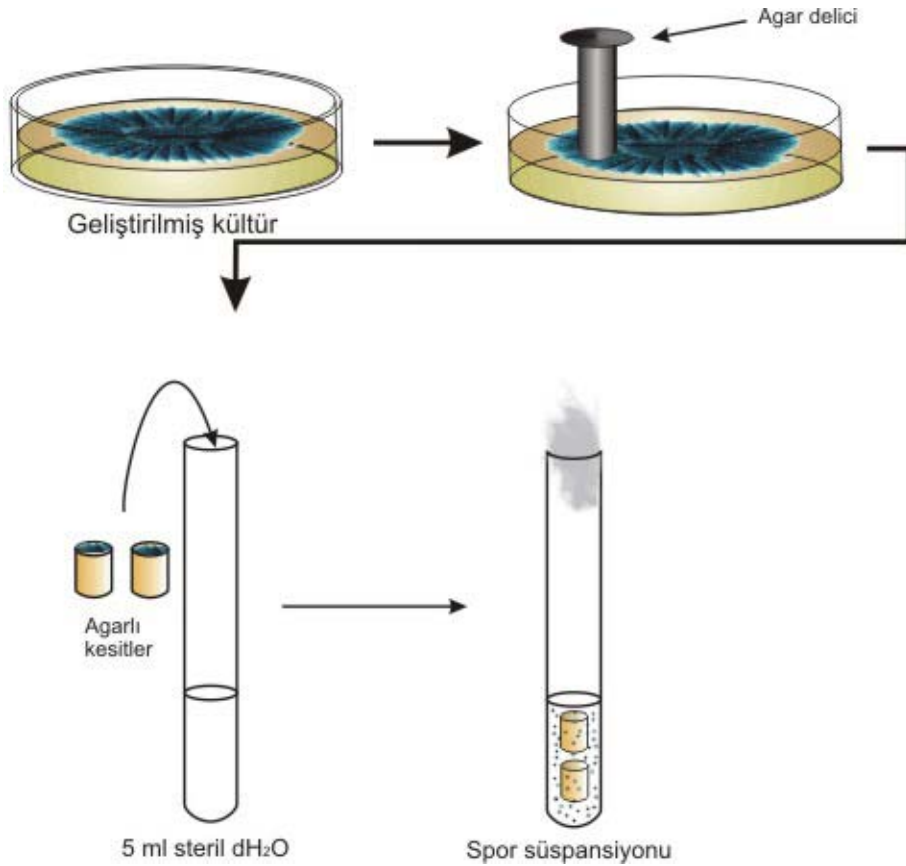
Şekil 4. Tribütirin içeren tüplerde lipolitik aktivitenin incelenmesi

2.2.3. Sıvı Besi Yerinde Lipaz Üretimi

Katı besiyerinde büyütülen kültürlerden agar delici ile 1 cm çaplı iki agarlı blok 10 mL steril saf su bulunan tüp içerisine konularak karıştırıldı (Şekil 5). Hazırlanan spor

süspansiyonundan 100 mL besiyerine 1 mL ($\sim 1 \times 10^6$ spor) olacak şekilde alınarak sıvı besiyerine ekim yapıldı. Sıvı besi yerinin bileşimi şu şekildedir: %0.12 NaH_2PO_4 , % 0.2 KH_2PO_4 , %0.033 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, %0.003 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %0.003 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %0.0012 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, %0.005 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %2 Glukoz, %2.1 Pepton.

Kültürler 30 °C'de 7 güne kadar 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.



Şekil 5. Spor süspansiyonunun hazırlanışı

2.2.4. Enzim Özütünün Hazırlanışı

Kültürler sıvı besiyerinde inkübasyondan sonra süzülerek miseller ayrıldı. Süzüntü 15 dakika 11000 rpm devirde santrifüj edildi, çökelti atılarak süpernatant kısmı alındı ve bu kısım enzim özütü olarak kullanıldı (Hiol vd., 2000).

2.2.5. Lipaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Lipaz aktivitesinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Aktivite testinde kullanılan *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) gerekli miktarda tartılarak 3 mM olacak şekilde 2-propanolde çözülerek hazırlandı. Substrat çözeltisi, 3 mM *p*-NPP içeren çözelti 1 ve çözelti 2'den oluşmaktadır. Çözelti 2, 100 mM pH 7.0 Fosfat tamponu, % 0.4 Triton X-100 ve % 0.1 Arabic Gum'dan oluşmaktadır. Substrat çözeltisi, çözelti 1 ve çözelti 2'nin sırasıyla 1:9 oranında karışımından meydana gelmektedir.

Reaksiyon 50 µL enzim çözeltisi ve 950 µL substrat çözeltisi içermektedir. Enzim-substrat karışımı hazırlandıktan hemen sonra 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda reaksiyonun sonlandırılması için 10 dakika kaynatıldı ve 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısmı alınarak 410 nm'de absorbansı ölçüldü.

Reaksiyon koşullarında, *p*-nitrofenil palmitattan 1 dakikada 1 µmol *p*-nitrofenol (*p*-NP) oluşturan enzim miktarı 1 U (ünite) enzim olarak tanımlandı (Thongekkaew, 2007).

M. hiemalis f. corticola lipazının *p*-nitrofenil palmitatı hidrolizleyerek oluşturduğu 4-nitrofenol miktarını belirlemek için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Standart grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda 4-nitrofenol kullanıldı. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilerek doğrunun eğimi hesaplandı (Şekil 8).

2.2.6. Protein Tayini

Protein tayini, Lowry yöntemiyle yapıldı (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki sığır serum albumin çözeltisi kalibrasyon grafiği için hazırlandı.

Tablo 6. Protein tayininde kullanılan çözeltiler

Lowry A	0,1 N NaOH içinde %2 Na ₂ CO ₃
Lowry B	%1 bakır sülfat ve %2 sodyum potasyum tartarat (1:1)
Lowry C	50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B
Lowry D	1 hacim folin belirteci : 2 hacim saf su

Protein tayini için aşağıdaki işlemler yapıldı:

BSA standartları, kör, enzim özü ve saflaştırılan enzim elüatı 5'er mL Lowry C belirteci ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 0.5 mL Lowry D belirteci hızla tüplere eklendi ve vortekslendi. Tüpler 30 dakika karanlıkta bekletildi. 660 nm'de absorbanslar ölçüldü. BSA standartları ile kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon grafiği yardımıyla enzim özütü ve saf enzim elüatının protein konsantrasyonu belirlendi.

Protein konsantrasyonu belirlenen enzim özütü ve saf enzim elüatının spesifik aktivitesi hesaplanarak, enzimin kaç kat saflaşmış olduğu belirlendi.

2.2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Enzim özütünde ve saf enzim elüatında lipaz varlığı, SDS'siz ve soğuk ortamda gerçekleştirilen doğal jel elektrofrez yapılarak, substrat boyamayla ortaya konuldu. Doğal elektrofrez işlemi için kullanılan % 12'lik ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli Tablo 7'deki gibi hazırlandı.

Tablo 7. Doğal poliakrilamid jel elektrofrezinin bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	---	0.25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl)	1.3 mL	---
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	2.0 mL	0.33 mL
Saf Su	1.6 mL	1.4 mL
% 10 APS	0.05 mL	0.05 mL
TEMED	0.002 mL	0.001 mL

Elektrofrez cam plakaları saf su ve etil alkol ile iyice temizlendikten sonra, plakalar arasına aralık oluşturmak için plastik aparatı yerleştirildi ve cam plakalar bir kısıkaça tutturuldu. Tablo 4'te belirtildiği gibi hazırlanan ayırma jeli, plakalar arasına üst yüzeye 2–3 cm kalana kadar bir mikropipet yardımıyla, jel içerisinde hiçbir hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dolduruldu. Jel yüzeyinin düzgün olması ve kurumaması için, jel yüzeyine saf su konuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, üst yüzeydeki saf su

döküldü ve üst yüzey yükleme jeli ile tamamen doldurularak, tarak hemen yükleme jeline yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan jel, donduktan sonra tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Tank, doğal elektroforez yürütme tamponuyla dolduruldu ve buz dolu bir kap içerisine yerleştirildi. Doğal elektroforez yükleme boyası ile karıştırılan ve 15-20 µg protein içeren örnekler, Hamilton şırıngasıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde oluşan mavi renkli boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 15 dakika 16 mA’de, boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar yaklaşık 60 dakika 25 mA’de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkartıldı ve boyama işlemine geçildi.

2.2.7.1. Substrat Boyaması

Doğal elektroforez sonucu sistemden çıkartılan jelle substrat boyaması yapıldı. Jelin boyanmasında kullanılan boyanın hazırlanışı şu şekildedir: 20 mg Fast Red tuzu, 20 ml 100 mM pH 7.5 Tris-HCl tamponunda çözüldü. Alfa naftil asetat 2 ml aseton ile çözümlenerek 100 mM pH 7.5 Tris-HCl tamponu ile 20 ml’ye tamamlandı. Bu iki çözelti birleştirilerek aynı anda jel üzerine döküldü ve 30 dakika boyanması sağlandı. Bantları görünür hale getirilen jeller, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

2.2.8. SDS Jel Elektroforezi

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), ayırma jeli % 12’lik ve yükleme jeli % 5’lik olacak şekilde Maniatis vd.’e (1989) göre yapıldı.

Tablo 8. SDS ve doğal poliakrilamid jel elektroforezinin bileşenleri

Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris-HCl)	36.3 g Tris bazı 150 mL saf suda çözüldü, 1 M HCl ile pH 8.8’e ayarlandı ve hacmi saf su ile 200 mL’ye tamamlandı.
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	24.2 g Tris bazı 150 mL saf suda çözüldü, 1 M HCl ile pH 6.8’e ayarlandı ve hacmi saf su ile 200 mL’ye tamamlandı.
% 10 SDS	10 g SDS 50 mL saf suda çözüldü ve hacmi saf suyla 100 mL’ye tamamlandı.
% 10 APS	10 g APS 50 mL saf suda çözüldü, hacmi saf suyla 100 mL’ye tamamlandı ve 200 µL’lik hacimlerde efendorf tüplerine bölünerek -20 °C’de saklandı.

Tablo 8'in devamı

TEMED	Orijinal şişesinden kullanıldı.
% 30 Akrilamid / Bisakrilamid: % 29.2 Akrilamid + % 0.8 N,N'-metilen bisakrilamid	29.2 g akrilamid ve 0.8 g N,N'-metilen bisakrilamid 50 mL saf suda çözüldü ve hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
SDS Jel Yükleme Tamponu	50 M Tris-HCl (pH 6.8) % 2 SDS % 0.1 Bromofenol mavisi % 20 Gliserol % 6 β -merkaptoetanol (200 μ L'lik hacimlerde ependorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı)
SDS Jel Yürütme Tamponu	500 mL'de 25 mM Tris bazı (1.5 g) 500 mL'de 250 mM Glisin (7.5 g) % 0.1 SDS 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH 8.3'e ayarlandı ve hacmi saf suyla 500 mL'ye tamamlandı.

Tablo 9. SDS ayırma ve yükleme jellerinin bileşenleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 5)
Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl)	---	0.25 mL
Ayırma Jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl)	1.3 mL	---
% 10 SDS	0.05 mL	0.02 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	2.0 mL	0.33 mL
Saf Su	1.6 mL	1.4 mL
% 10 APS	0.02 mL	0.02 mL
TEMED	0.002 mL	0.002 mL

Temizlenen cam plakalar arasına dökülen ayırma jeli donduktan sonra yükleme jeli döküldü. Hazırlanan jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve tank, Tablo 8'de belirtildiği şekilde hazırlanan SDS yürütme tamponuyla dolduruldu. Standart proteinler ve örnekler, içerisinde protein miktarı 15–20 μ g olacak şekilde SDS yürütme boyası ile karıştırıldı. Örnekler, 95 °C'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra, Hamilton şırıngasıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde yürüyen mavi renkli karışım, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 15 dakika 20 mA'de, boya, ayırma jelinin sonuna gelene kadar yaklaşık 60 dakika 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra, jel sistemden dikkatlice çıkartıldı ve Tablo 8'de belirtildiği gibi hazırlanan boyama çözeltisiyle hafifçe çalkalanarak yaklaşık 2 saat boyandı. Jel, protein bantlarının görünür hale getirilmesi için,

boya uzaklaştırma çözeltisiyle yaklaşık 2–3 saat muamele edildi. Bantları görünür hale getirilen jel, jel görüntüleme cihazında kaydedildi.

2.2.9. Lipaz Saflaştırılması

2.2.9.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat çöktürmesi iki aşama olarak gerçekleştirildi. İlk basamak olarak %40 doygunlukta amonyum sülfat kullanıldı. Çözelti 10000 rpm'de 45 dakika santrifüj edildi. Çökelti atıldı ve ikinci aşama olarak %75 doygunlukta amonyum sülfat eklendi. Amonyum sülfat eklenip 4 °C'de 5 saat beklendikten sonra 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi, çökelti 0.2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM Benzamidine ve %0.02 Sodyum azid içeren 20 mM pH 7.0 Fosfat tamponunda (Tampon A) çözüldü.

2.2.9.2. Diyaliz

Diyaliz yöntemi, pasif difüzyona dayanmaktadır. Protein çözeltisi küçük molekülleri geçiren fakat büyük molekülleri alıkoyan yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbasına konarak torba tampon içine bırakılmaktadır. Diyaliz işlemi yapılarak tuz ile çöktürülen proteinlerin tuz fazlası giderilebilmektedir (Bugg, 1997).

Diyaliz, yöntemi için, % 0.1 EDTA solüsyonunda 4 °C de muhafaza edilen diyaliz tüpünden [Selüloz membran, Sigma D9652, MWCO (Molecular Weight Cut Off) 12.000 Dalton] diyaliz edilecek olan sıvıyı alabilecek uzunlukta kesildi. Diyaliz tüpünün içi ve dışı distile su ile iyice yıkandı. Tüpün bir ucu üst üste düğüm atılarak sıkıca bağlandı. Bu amaçla diyaliz klipsleri ve ip kullanıldı.

Diyaliz edilecek örnek diyaliz tüpünün içine konuldu. Doldurma işlemi bir beher içinde yapıldı ve diyaliz tüpünün en üst kısmında diyaliz tüpünün az da olsa şişme ihtimali düşünülerek boşluk bırakılarak sıkıca bağlandı. Hazırlanan diyaliz tüpü tampon çözelti içine bırakıldı ve magnet çubuklar yardımıyla tamponun karıştırılması sağlandı. Bu sistem 4 °C de 3-12 saat dengeye ulaşmaya bırakıldı. Diyaliz süresince tampon birkaç kez tazelenerek diyaliz süresi kısaldı.

2.2.9.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyonu yöntemi, farklı büyüklükteki makromolekülleri, molekül büyüklüklerine göre ayırma prensibine dayalı bir kolon kromatografisi yöntemidir. Kolon, küresel yapılı ve belirli boyutlarda gözeneklere sahip ticari olarak satılan dolgu materyali tipi ile doldurulmaktadır. Dolgu materyallerinin fraksiyon aralıkları, içerdikleri partiküllerin por çaplarına bağlı olarak değişmektedir (Scopes, 1982; Switzer ve Garrity, 1999; TÜBİTAK, 2004).

Bu uygulamada, jel filtrasyon kolon dolgu maddesi olarak kullanılan Sephadex G-75 (Pharmacia, İsveç) uygun miktarda alınarak saf su ile karıştırılarak bir gece şişmesi sağlandı. Kolon dolgu maddesinin vakum altında gazı alındıktan sonra 40 X 2.5 cm'lik kolona dolduruldu. Saflaştırma işlemlerinde kullanılması için kolon 20 mM pH 7.0 Fosfat tamponu ile dengelendi (Hiol, 1999). Tampon A'da çözünmüş enzim özütü kolona yüklendi ve fraksiyonlar yaklaşık 3 ml olacak şekilde toplandı. Toplanan fraksiyonların aktiviteleri ve protein miktarları belirlendi. Bu fraksiyonlardaki aktiviteyi göstermek için doğal PAGE yapıldı.

2.2.9.4. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi için Q-Sepharose Fast Flow matriksi kullanıldı. Matriks 30 X 1 cm'lik kolona dolduruldu. Kolonun dengelenmesi için 20 mM pH 7.0 Fosfat tamponu kullanıldı. Fraksiyonlar 3 ml olacak şekilde toplandı. Yıkama pH 7.0 fosfat tamponu içinde hazırlanan 0–1 M arası NaCl çözeltileri ile yapıldı.

2.2.9.5. Analitik Jel Filtrasyon Kromatografisi

Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi için analitik jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Saf lipaz (1 ml) Sephadex G75 (2,5 X 30 cm) kolonuna yüklendi. Alkol dehidrojenaz (150 kDa), sığır albumini (66 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa) ve sitokrom C (12.5 kDa) protein standartları olarak kullanıldı (Hiol, 1999).

2.2.10. Lipazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

Lipazın kinetik özelliklerini araştırmak için, belirlenen en iyi substratı kullanılarak optimum pH ve sıcaklık değerleri, ısı ve pH kararlılığı, protein miktarı ve metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi, V_{maks} , K_m değerleri tayin edildi.

2.2.10.1. Lipaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Lipaz aktivitesi, pH'nın bir fonksiyonu olarak, 50 mM asetat tamponunda pH 4.0-5.0; 50 mM fosfat tamponunda pH 6.0-7.0 ve 50 mM Tris-HCl tamponunda pH 8.0-9.0 değerleri arasında, 50 mM Glisin-NaOH tamponunda pH 10.0-11.0 değerleri arasında substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat kullanılarak belirlendi. Tampon çözeltilerin hazırlanışları Tablo 10'da verilmiştir. Bu substrat varlığında belirlenen optimum pH, substrat özgünlüğünün, ısı özelliklerinin ve diğer parametrelerin belirlenmesi için kullanıldı.

Tablo 10. Kullanılan tamponlar ve hazırlanışları

Tampon Adı	İçerik / Hazırlanış
Asetat Tamponu (50 mM pH 4.0-5.0)	3.40 g sodyum asetat 450 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
Fosfat Tamponu (50 mM pH 6.0-7.0)	3.10 g K_2HPO_4 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
Tris-HCl Tamponu (50 mM pH 8.0-9.0)	3.02 g Tris bazı 450 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

2.2.10.2. Lipaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Lipazın optimum sıcaklığının belirlenmesi için, lipaz aktivitesi 5 °C'lik artışlarla 25-50 °C aralığında incelendi. Tampon ve substrat çözeltisinden oluşan karışım, 25-50 °C aralığında su banyosunda 20 dakika inkübe edildi. Lipaz aktivitesi, aktivite tamponuna substrat çözeltisi ve saf enzim elüatı ilave edildikten sonra mümkün olduğunca hızlı bir şekilde ölçüldü ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek optimum sıcaklık belirlendi.

2.2.10.3. Lipaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonunu belirlemek üzere, lipaz aktivitesi, *p*-nitrofenil palmitat substratı varlığında, enzimin 0.5-44 µg/mL konsantrasyon aralığında ölçüldü ve elde edilen verilere göre lipaz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi araştırıldı.

2.2.10.4. Lipaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum pH'sı belirlenen lipazın aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek üzere, 100 mM stok *p*-NPP substratı hazırlandı. Nihai konsantrasyonu 0.5-20 mM aralığında değişen substrat çözeltisi, aktivite tayininde kullanılan diğer çözeltiler ve uygun konsantrasyonda lipaz içerecek şekilde optimum pH'da reaksiyon karışımı hazırlandı ve 410 nm'de ölçümler yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten grafiği çizilerek optimum substrat konsantrasyonu belirlendi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}), her bir konsantrasyonun hıza bölümünün substrat konsantrasyonuna karşı çizilen Hanes-Woolf grafiğinden faydalanılarak belirlendi (Hanes, 1932).

2.2.10.5. Hill Eğrisi

p-NPP substratı varlığında, değişen substrat konsantrasyonlarında (0.5-20 mM) elde edilen hız (V) ve V_{maks} değeri kullanılarak $V/(V_{maks}-V)$ oranının logaritması alındı. Çizilen Hill grafiğinden, *p*-NPP substratı için substrat bağlanma bölgelerinin sayısı ve kooperativite olup olmadığı tespit edildi.

2.2.10.6. Lipaz'ın pH Kararlılığı

Enzimin pH kararlılığını incelemek için, elde edilen saf enzim elüatı, 50 mM konsantrasyonundaki, pH 5.0 asetat tamponu, pH 6.0-7.0 fosfat tamponu ve pH 8.0-9.0 Tris-HCl tamponu, pH 10.0-11.0 Glisin-NaOH tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 4 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bu enzim-tampon karışımlarından, uygun miktarda nihai enzim konsantrasyonu içerecek şekilde alınarak, optimum pH'da ve

optimum substrat konsantrasyonunda aktivitesi ölçüldü. Ayrıca enzim, inkübasyona tabi tutulmadan, aynı tamponlar içerisindeki karışımı hazırlanır hazırlanmaz aktivitesi ölçüldü ve enzimin yüzde kalan aktivitesi belirlendi.

2.2.10.7. Lipaz'ın Isıl Kararlılığı

Lipazın ısıl kararlılığının belirlenmesi için, saf enzim elüatından içerisinde uygun miktarda enzim içerecek şekilde ependorf tüplerine alınarak, 10 °C'lik artışlarla, 30–80 °C aralığında su banyosunda, 30 dakikada bir ölçüm alınmak suretiyle toplam 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında saf enzim elüatı oda sıcaklığına kadar soğutulmuş, optimum pH'da ve optimum substrat konsantrasyonunda aktivite ölçüldü. % kalan aktivite, inkübasyona tabi tutulmayan saf enzim elüatının aynı şartlardaki aktivitesiyle karşılaştırılarak hesaplandı.

2.2.10.8. Lipaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Lipaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek üzere, reaksiyon ortamına, nihai konsantrasyonu 1 mM ve 10 mM olacak şekilde, bazı 1A, 2A, 3A ve geçiş metallerinin klorür tuzlarından hazırlanan çözeltilerinden eklendi ve lipaz aktivitesi ölçüldü.

3. BULGULAR

3.1. Mikrofungusların Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Rize Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan alınan 213 suşun tribütirin agarında lipolitik aktivitelerine bakıldı. İnkübasyon sıcaklığı 30 °C'de 5 ile 7 günlük inkübasyon süresi sonunda, tüplerde oluşan berraklık derinliği ölçüldü (Tablo 9).

Tablo 11. Suşların tribütirin agarlı tüplerdeki lipolitik aktiviteleri (*: mm berraklık derinliği)

İzolat Adı	No	5.Gün	7.Gün	İzolat Adı	No	5.Gün	7.Gün
<i>Acremonium furcatum</i>	31E	14	18	<i>Fusarium</i> sp.	16B	0	33
<i>Acremonium furcatum</i>	34H	14	20	<i>Fusarium</i> sp.	16D	10	20
<i>Acremonium furcatum</i>	35H	15	20	<i>Fusarium</i> sp.	16F	15	25
<i>Acremonium furcatum</i>	36M	17	27	<i>Fusarium</i> sp.	16G	14	22
<i>Acremonium furcatum</i>	39D	18	22	<i>Fusarium</i> sp.	16H	13	20
<i>Acremonium furcatum</i>	39G	17	21	<i>Fusarium</i> sp.	16I	12	20
<i>Acremonium furcatum</i>	40E	12	17	<i>Fusarium</i> sp.	16K	12	19
<i>Acremonium furcatum</i>	31E	13	17	<i>Fusarium</i> sp.	36B	15	19
<i>Alternaria</i> sp.	40B	14	16	<i>Fusarium</i> sp.	36F	22	28
<i>Aspergillus flavus</i>	7D	14	15	<i>Fusarium</i> sp.	36H	15	20
<i>Aspergillus flavus</i>	10A1	18	21	<i>Fusarium</i> sp.	36J	23	24
<i>Aspergillus flavus</i>	26B	16	22	<i>Gliocladium roseum</i>	33C	16	20
<i>Aspergillus flavus</i>	27D	13	16	<i>Gliocladium roseum</i>	38I	13	17
<i>Aspergillus flavus</i>	27G	16	24	<i>Gliocladium roseum</i>	40F	15	18
<i>Aspergillus flavus</i>	33F	18	22	<i>Gliocladium roseum</i>	14K	15	21
<i>Aspergillus flavus</i>	36E	21	25	<i>Gliocladium roseum</i>	20D	11	15
<i>Aspergillus flavus</i>	39E	14	17	<i>Gliocladium virens</i>	32E	23	24
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1A	1	3	<i>Gongronella butleri</i>	35E	20	30
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3A	4	7	<i>Gongronella butleri</i>	13C	13	19
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3B	1	3	<i>Gongronella butleri</i>	16C	15	23
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3C	0	0	<i>Gongronella butleri</i>	16A	15	18
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8B	18	20	<i>Gongronella butleri</i>	20C	13	17
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8D	0	0	<i>Mortierella antarctica</i>	25E	15	17
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10D	15	19	<i>Mortierella antarctica</i>	28A	13	19
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14E	12	26	<i>Mortierella antarctica</i>	28D	13	22
<i>Aspergillus fumigatus</i>	25A	15	18	<i>Mortierella antarctica</i>	28E	15	21
<i>Aspergillus fumigatus</i>	25F	13	17	<i>Mortierella antarctica</i>	35J	16	20
<i>Aspergillus fumigatus</i>	27A	12	17	<i>Mortierella antarctica</i>	35L	20	23
<i>Aspergillus fumigatus</i>	27H	11	15	<i>Mortierella antarctica</i>	36I	17	23
<i>Aspergillus fumigatus</i>	27J	13	16	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	31A	18	26

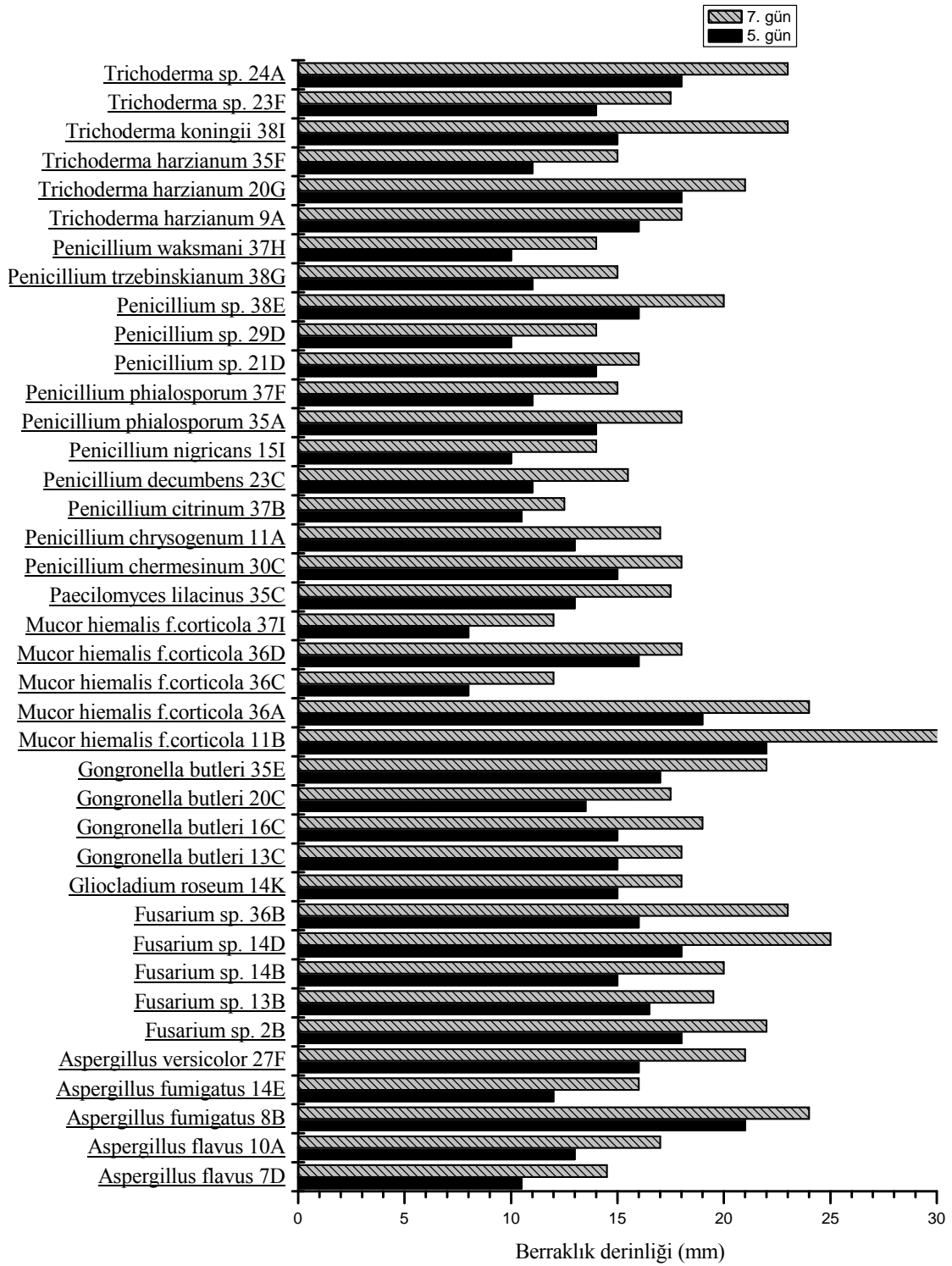
Tablo 11'in devamı

<i>Aspergillus fumigatus</i>	28G	13	17	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	17A	14	21
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32C	23	23	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	17G	11	20
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32İ	12	16	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	11B	23	30
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32J	10	19	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	33A	25	28
<i>Aspergillus fumigatus</i>	33B	11	16	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	33J	20	27
<i>Aspergillus fumigatus</i>	33E	13	24	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	36A	16	22
<i>Aspergillus fumigatus</i>	34C	15	19	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	36C	15	18
<i>Aspergillus fumigatus</i>	35K	18	22	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	36D	17	21
<i>Aspergillus fumigatus</i>	37G	11	16	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	37İ	19	23
<i>Aspergillus fumigatus</i>	39H	15	18	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	25C	12	15
<i>Aspergillus fumigatus</i>	39H	15	17	<i>Paecilomyces marquandii</i>	40C	23	25
<i>Aspergillus niger</i>	14C	13	20	<i>Penicillium chermesinum</i>	30C	12	15
<i>Aspergillus versicolor</i>	1C	1	3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	11A	16	22
<i>Aspergillus versicolor</i>	8C	1	3	<i>Penicillium citrinum</i>	34F	16	18
<i>Aspergillus versicolor</i>	27F	15	20	<i>Penicillium citrinum</i>	37B	16	22
<i>Fusarium</i> sp.	2B	19	24	<i>Penicillium corylophilum</i>	34G	18	28
<i>Fusarium</i> sp.	7A	12	17	<i>Penicillium corylophilum</i>	38F	11	16
<i>Fusarium</i> sp.	13B	17	21	<i>Penicillium cyaneum</i>	34B	16	19
<i>Fusarium</i> sp.	13E	15	35	<i>Penicillium decumbens</i>	23C	12	19
<i>Fusarium</i> sp.	14B	18	22	<i>Penicillium decumbens</i>	33G	21	27
<i>Fusarium</i> sp.	14D	18	30	<i>Penicillium decumbens</i>	37E	11	15
<i>Fusarium</i> sp.	14L	14	20	<i>Penicillium decumbens</i>	38B	16	16
<i>Fusarium</i> sp.	15B	9	20	<i>Penicillium decumbens</i>	38D	18	20
<i>Penicillium frequentans</i>	17F	11	20	<i>Mycelia sterilia</i>	12B	15	18
<i>Penicillium nigricans</i>	8A	0	0	<i>Mycelia sterilia</i>	12C	11	15
<i>Penicillium nigricans</i>	10C	0	0	<i>Mycelia sterilia</i>	12E	16	20
<i>Penicillium nigricans</i>	15İ	13	24	<i>Mycelia sterilia</i>	14A	15	23
<i>Penicillium phialosporum</i>	29A	12	15	<i>Mycelia sterilia</i>	14İ	10	20
<i>Penicillium phialosporum</i>	35A	14	18	<i>Mycelia sterilia</i>	15D	17	30
<i>Penicillium phialosporum</i>	37F	13	18	<i>Mycelia sterilia</i>	15F	11	19
<i>Penicillium rubrum</i>	27B	11	15	<i>Mycelia sterilia</i>	15K	15	22
<i>Penicillium rubrum</i>	38C	10	12	<i>Mycelia sterilia</i>	16M	12	16
<i>Penicillium</i> sp.	6D	1	3	<i>Mycelia sterilia</i>	17İ	10	19
<i>Penicillium</i> sp.	7G	3	5	<i>Mycelia sterilia</i>	17L	11	12
<i>Penicillium</i> sp.	10E	0	0	<i>Mycelia sterilia</i>	15H	16	25
<i>Penicillium</i> sp.	10F	15	18	<i>Mycelia sterilia</i>	15L	13	15
<i>Penicillium</i> sp.	11F	17	20	<i>Mycelia sterilia</i>	22A	11	20
<i>Penicillium</i> sp.	12D	16	24	<i>Mycelia sterilia</i>	25B	15	17
<i>Penicillium</i> sp.	12F	9	15	<i>Mycelia sterilia</i>	26A	15	20
<i>Penicillium</i> sp.	13A	0	15	<i>Mycelia sterilia</i>	25B	15	18
<i>Penicillium</i> sp.	14J	11	16	<i>Mycelia sterilia</i>	31B	17	18
<i>Penicillium</i> sp.	15C	11	14	<i>Mycelia sterilia</i>	31C	11	16
<i>Penicillium</i> sp.	15G	14	26	<i>Mycelia sterilia</i>	32A	13	17
<i>Penicillium</i> sp.	16L	14	20	<i>Mycelia sterilia</i>	32B	12	18
<i>Penicillium</i> sp.	17K	11	19	<i>Mycelia sterilia</i>	32D	9	11

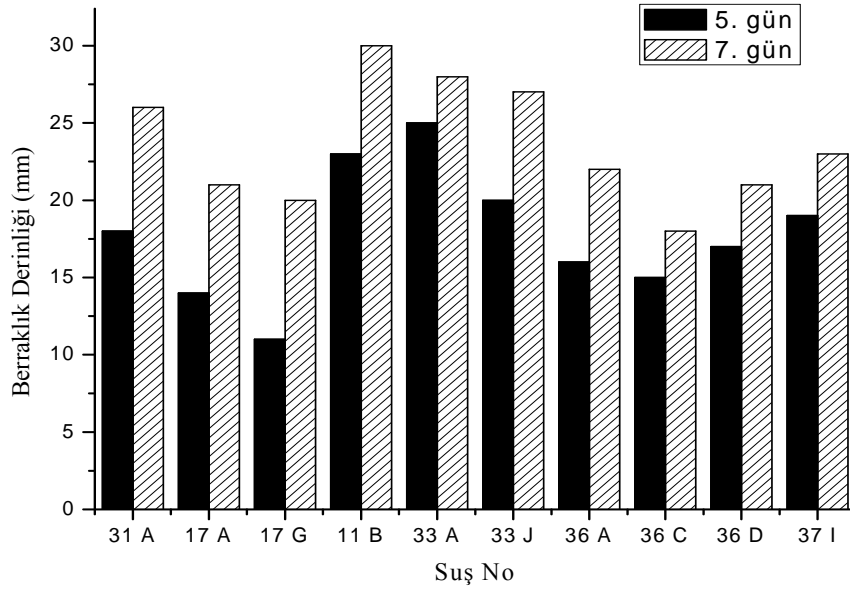
Tablo 11'in devamı

<i>Penicillium</i> sp.	17D	14	16	<i>Mycelia sterilia</i>	32F	16	20
<i>Penicillium</i> sp.	20H	10	14	<i>Mycelia sterilia</i>	32G	15	19
<i>Penicillium</i> sp.	21D	10	15	<i>Mycelia sterilia</i>	33D	14	19
<i>Penicillium</i> sp.	26D	18	22	<i>Mycelia sterilia</i>	35D	10	14
<i>Penicillium</i> sp.	27K1	13	18	<i>Mycelia sterilia</i>	35G	10	18
<i>Penicillium</i> sp.	27K2	0	0	<i>Mycelia sterilia</i>	36G	15	19
<i>Penicillium</i> sp.	29B	11	15	<i>Mycelia sterilia</i>	38	15	20
<i>Penicillium</i> sp.	29C	13	15	<i>Trichoderma harzianum</i>	4A	5	8
<i>Penicillium</i> sp.	29D	15	18	<i>Trichoderma harzianum</i>	4B	4	8
<i>Penicillium</i> sp.	37A	10	14	<i>Trichoderma harzianum</i>	6B	4	8
<i>Penicillium</i> sp.	38 E	11	16	<i>Trichoderma harzianum</i>	7C	10	13
<i>Penicillium spinulosum</i>	37D	11	14	<i>Trichoderma harzianum</i>	9A	21	28
<i>Penicillium steckii</i>	13D	11	14	<i>Trichoderma harzianum</i>	11C	15	21
<i>Penicillium trzebinskianum</i>	36L	15	20	<i>Trichoderma harzianum</i>	11D	20	25
<i>Penicillium trzebinskianum</i>	38G	20	24	<i>Trichoderma harzianum</i>	12A	17	25
<i>Penicillium waksmani</i>	27C	11	15	<i>Trichoderma harzianum</i>	13X	15	19
<i>Penicillium waksmani</i>	27X	14	16	<i>Trichoderma harzianum</i>	14G	16	20
<i>Penicillium waksmani</i>	37C	13	16	<i>Trichoderma harzianum</i>	17E	10	16
<i>Penicillium waksmani</i>	37H	20	26	<i>Trichoderma harzianum</i>	20G	18	25
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	35C	21	27	<i>Trichoderma harzianum</i>	31D	24	35
<i>Scopulariopsis brumptii</i>	10A2	20	24	<i>Trichoderma harzianum</i>	35B	12	17
<i>Mycelia sterilia</i>	2 A	16	21	<i>Trichoderma harzianum</i>	35F	26	26
<i>Mycelia sterilia</i>	2 C	15	20	<i>Trichoderma koningii</i>	6A	4	10
<i>Mycelia sterilia</i>	5 B	11	15	<i>Trichoderma koningii</i>	14H	14	21
<i>Mycelia sterilia</i>	6 C	10	15	<i>Trichoderma koningii</i>	15E	15	21
<i>Mycelia sterilia</i>	6X	17	18	<i>Trichoderma koningii</i>	28İ2	11	15
<i>Mycelia sterilia</i>	7B2	16	20	<i>Trichoderma koningii</i>	33İ	18	20
<i>Mycelia sterilia</i>	7E	15	16	<i>Trichoderma</i> sp.	25X	14	16
<i>Mycelia sterilia</i>	7H	8	10	<i>Trichoderma</i> sp.	23F	12	16
<i>Mycelia sterilia</i>	9B	11	20	<i>Trichoderma</i> sp.	24A	19	22
<i>Mycelia sterilia</i>	10B	15	19	<i>Zygorhincus exponens</i> var. <i>smithii</i>	28A1	14	17
<i>Mycelia sterilia</i>	11H	15	18				

Kültürlerin lipolitik aktivitelerine göre oluşan berraklık derinliği ölçülerek ortalaması alındı ve ortalamanın üzerindeki değerlere sahip suşlar pozitif olarak değerlendirildi. Buna göre 213 suşun 115'inin (% 54) lipolitik aktivite gösterdiği belirlendi. Pozitif suşlar arasından seçilen 39 tür tekrar tribütirin agara ekilerek berraklık derinliği ölçüldü (Şekil 6). En yüksek aktivite gösteren suşun *Mucor hiemalis* f. *corticola* 11B (30 mm berraklık derinliği) olduğu belirlendi (Şekil 7). Cins düzeyinde bakıldığında en iyi aktivite gösteren cinslerin *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, ve *Aspergillus* olduğu tespit edildi.



Şekil 6. Seçilen suşların tributirin agarlı tüplerdeki lipolitik aktiviteleri



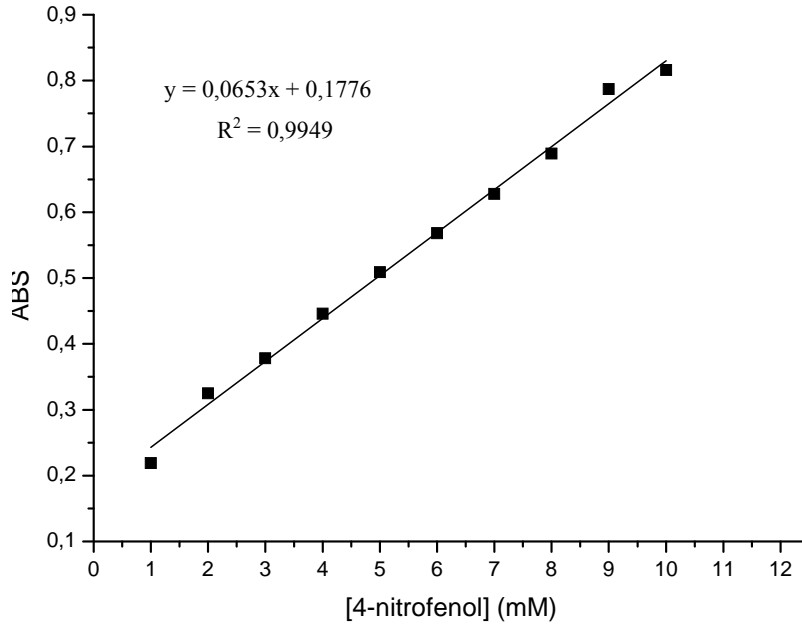
Şekil 7. Farklı *Mucor hiemalis f. corticola* suşlarının lipolitik aktiviteleri

3.2. *Mucor hiemalis f. corticola* IDM11B suşunun Lipaz Üretimi

Katı besiyerinde büyütülen kültürlerden agar delici ile 1 cm çaplı iki agarlı blok 10 mL steril saf su bulunan tüp içerisine konularak karıştırıldı (Şekil 5). Hazırlanan spor süspansiyonundan 100 mL besiyerine 1 mL ($\sim 1 \times 10^6$ spor) olacak şekilde alınarak sıvı besiyerine ekim yapıldı. Kültürler 30 °C’de 7 güne kadar 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Kültürler, sıvı besiyerinde inkübasyondan sonra süzülerek miseller ayrıldı. Süzüntü 15 dakika 11000 rpm devirde santrifüj edildi, çökelti atılarak süpernatant kısmı alındı ve bu kısım enzim özütü olarak kullanıldı (Hiol ve ark. 2000).

3.3. *p*-NPP Standardı

M. hiemalis f. corticola lipazının *p*-nitrofenil palmitatı hidrolizleyerek oluşturduğu 4-nitrofenol miktarını belirlemek için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Standart grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda 4-nitrofenol kullanıldı. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilerek doğrunun eğimi hesaplandı (Şekil 8). Aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanılan bu lineer doğrunun denklemi $y=0,0653x+0,1776$, regresyon katsayısı $R^2=0,9949$ ’dur.



Şekil 8. Standart olarak kullanılan 4-nitrofenol grafiği

3.4. Lipaz Saflaştırılması

3.4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

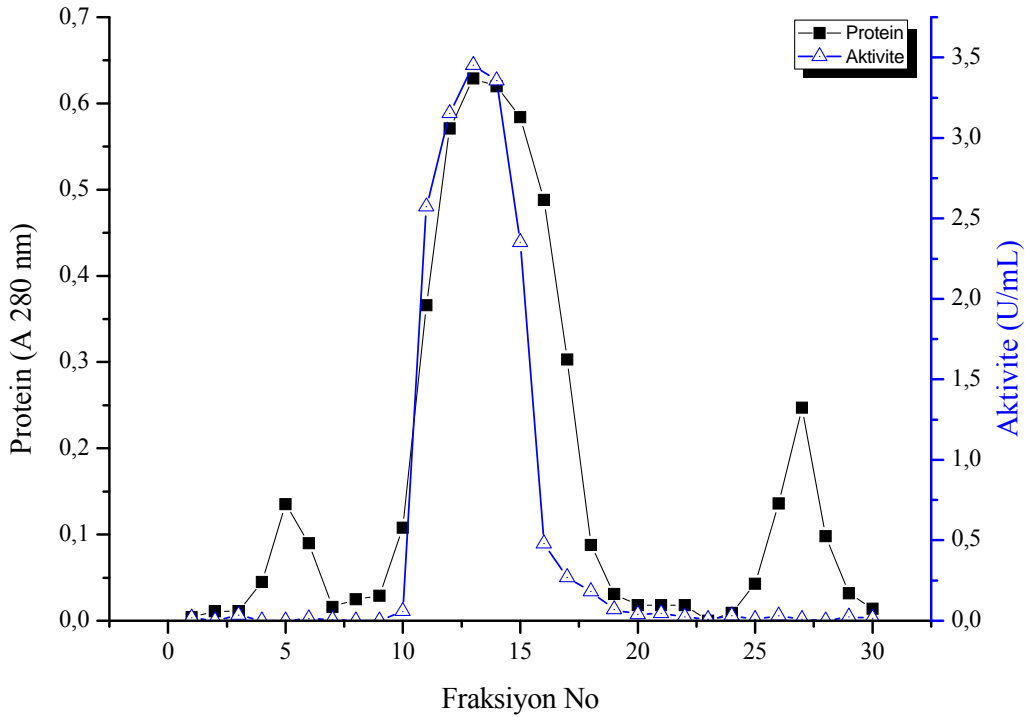
Amonyum sülfat çöktürmesi iki aşama olarak gerçekleştirildi. İlk basamak olarak %40 doygunlukta amonyum sülfat kullanıldı. Çözelti 10000 rpm'de 45 dakika santrifüj edildi. Çökelti atıldı ve ikinci aşama olarak %75 doygunlukta amonyum sülfat eklendi. Amonyum sülfat eklenip 4 °C'de 5 saat beklendikten sonra 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi, çökelti 0.2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM Benzamidine ve %0.02 Sodyum azid içeren 20 mM pH 7.0 Fosfat tamponunda (Tampon A) çözüldü.

3.4.2. Diyaliz

Çöktürülen protein karışımında bulunan amonyum sülfatın giderilmesi için diyaliz yapıldı. Diyaliz işlemi gece boyu Tampon A'ya karşı yapıldı. Bu şekilde protein karışımında bulunan amonyum sülfatın tamamen uzaklaştırılması sağlandı.

3.4.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Tampon A'da çözülmüş enzim özütü 2.5 x 40 cm'lik kolona yüklendi ve fraksiyonlar yaklaşık 3 ml olacak şekilde toplandı. Toplanan fraksiyonların aktiviteleri ve protein miktarları belirlendi (Şekil 9). Bu fraksiyonlardaki aktiviteyi göstermek için doğal PAGE yapıldı. Toplanan fraksiyonlardan 9 ile 18 no'lu fraksiyonlarda protein varlığı belirlendi. 10 ile 15 no'lu fraksiyonlarda aktivitenin varlığı doğal PAGE'nde gözlemlendi (Şekil 12).

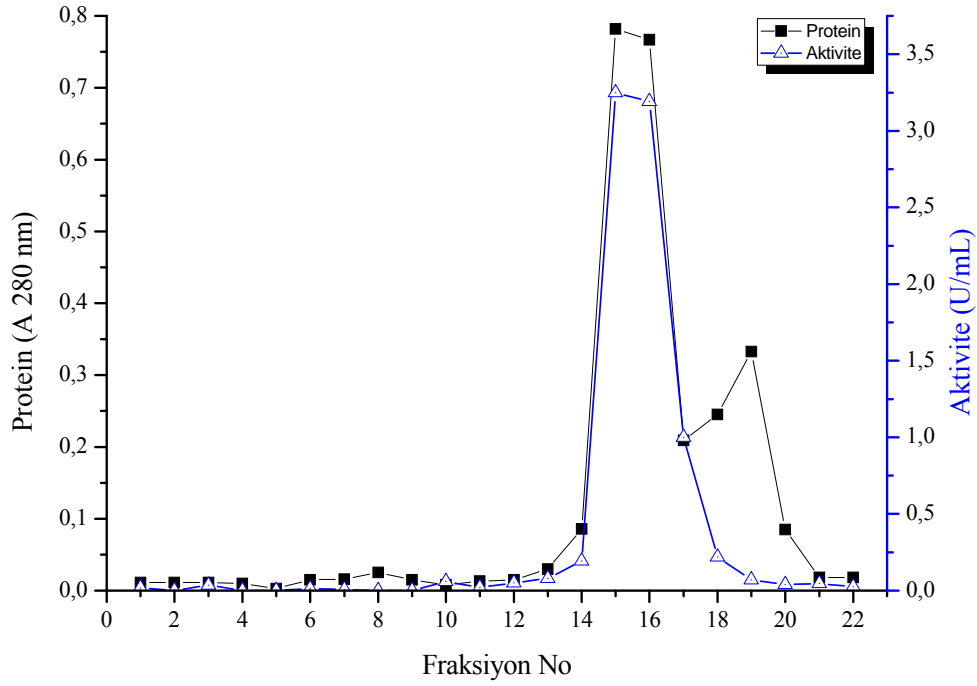


Şekil 9. Sephadex G-75 kolon kromatografisi fraksiyonlarında lipaz aktivitesi ve protein miktarları

3.4.4. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi için Q-Sepharose Fast Flow matriksi kullanıldı. Bir önceki kolondan alınan fraksiyonlar bu kolona yüklendi ve 3 ml olacak şekilde fraksiyonlar toplandı. Yıkama pH 7.0 fosfat tamponu içinde hazırlanan 0–1 M arası NaCl çözeltileri ile yapıldı. Yıkamada gradient oluşturmak için gradient oluşturucu kullanıldı. Matrikse tutunmayan veya zayıf olarak bağlanan proteinler düşük konsantrasyonda NaCl çözeltisi ile yıkılırken, kuvvetli olarak bağlanan proteinler daha yoğun NaCl çözeltisi ile yıkandı. İyon değişim kromatografisinden toplanan fraksiyonlarda protein ve aktivite

ölçülerek grafiğe aktarıldı (Şekil 10). Fraksiyonlardan alınan örnekler SDS-PAGE’nde yürütüldü ve protein bantları belirlendi (Şekil 11 Şekil 12)

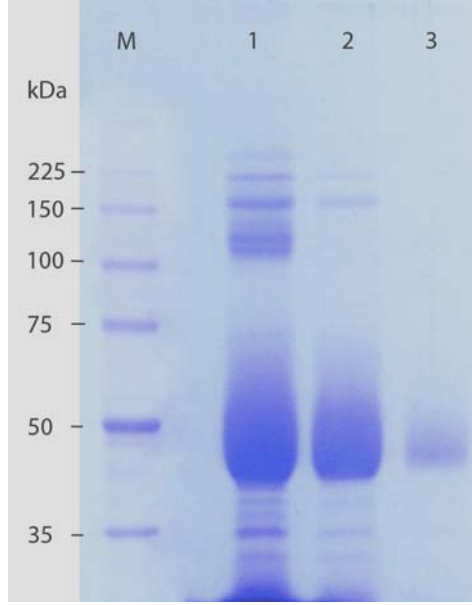


Şekil 10. Q-Sepharose Fast Flow kolon kromatografi fraksiyonlarında lipaz aktivitesi ve protein miktarları

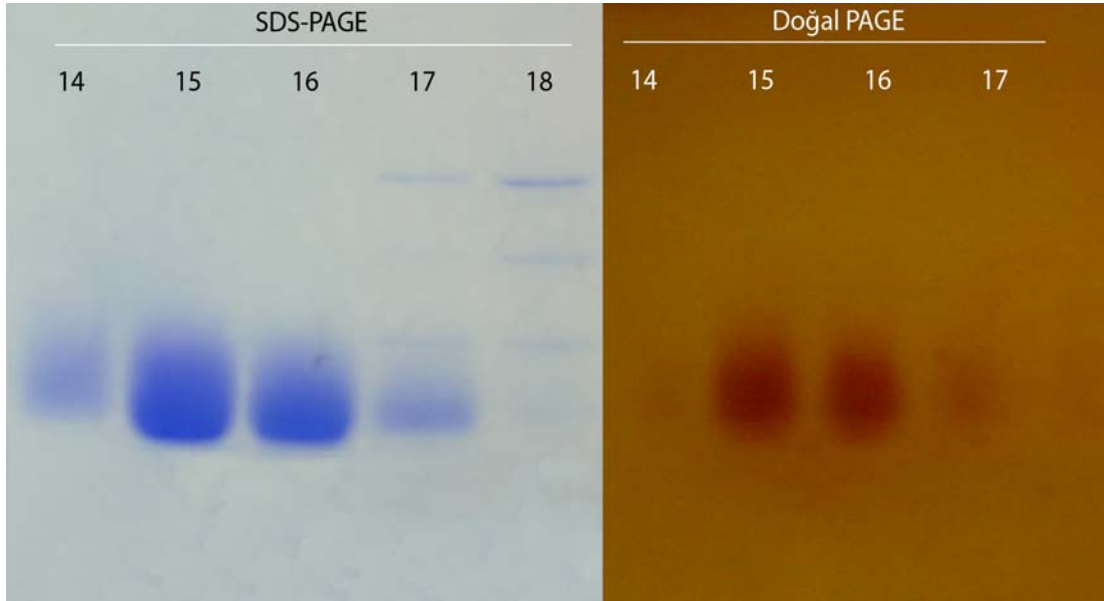
M. hiemalis f. *corticola* lipazı, amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile saf olarak elde edildi. Saflaştırma basamaklarına ait bulgular Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. *M. hiemalis* f. *corticola* lipazına ait saflaştırma tablosu

	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham ekstrakt	12860	7379,7	1,74	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi	9240	1621,6	5,70	3,27	71,9
Sephadex G-75	6376	891,8	7,15	4,10	49,6
Q-Sepharose Fast Flow	3560	41,85	22	12,63	27,7



Şekil 11. *M. hiemalis f. corticola* suşunun protein profilleri (M: marker, 1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi, 2: jel filtrasyon kromatografisi, 3: iyon değişim kromatografisi)

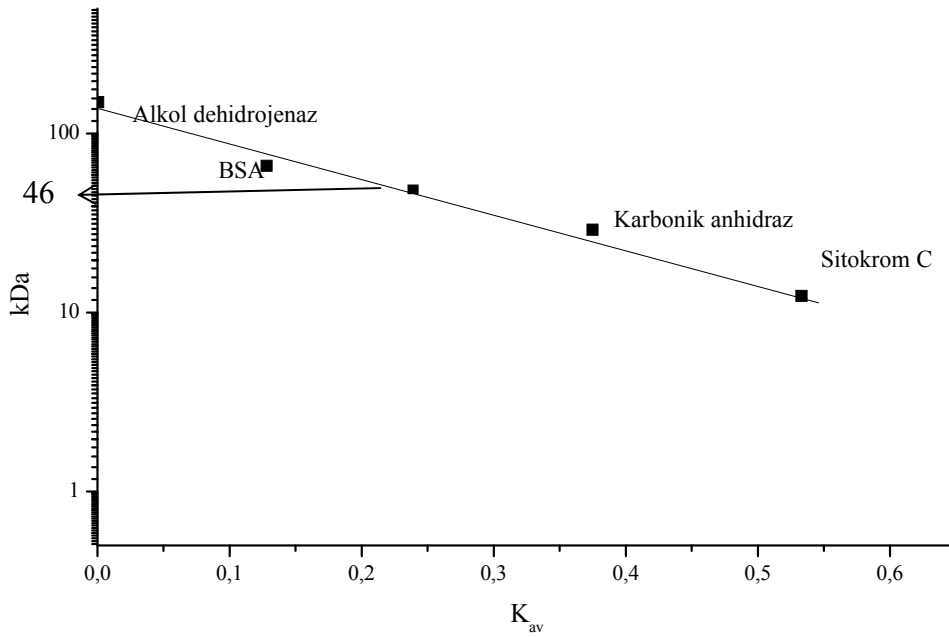


Şekil 12. İyon değişim kromatografisi neticesi alınan farklı fraksiyonlarda SDS-PAGE ve doğal PAGE görüntüleri

3.4.5. Analitik Jel Filtrasyon

Safılaştırılan enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi için analitik jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Saf lipaz (1 ml) Sephadex G-75 (2,5 x 40 cm) kolonuna yüklendi. Alkol dehidrojenaz (150 kDa), sığır albumini (66 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa) ve

sitokrom C (12.5 kDa) protein standartları olarak kullanıldı (Hiol, 1999). Her bir proteinin K_{av} değeri belirlenerek yarı logaritmik ölçekli standart grafik çizildi (Şekil 13). Saf lipazın K_{av} değeri 0,267 olarak hesaplandı. SDS-PAGE’te yaklaşık 48 kDa olarak belirlenen *M. hiemalis f. corticola* lipazının moleküler ağırlığının analitik jel filtrasyon sonucu 46 kDa olduğu belirlenmiştir. Ayrıca elüatın tek bir tepe noktasının olması proteinin tek bir alt birimden oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 13. Analitik jel filtrasyon standart grafiği

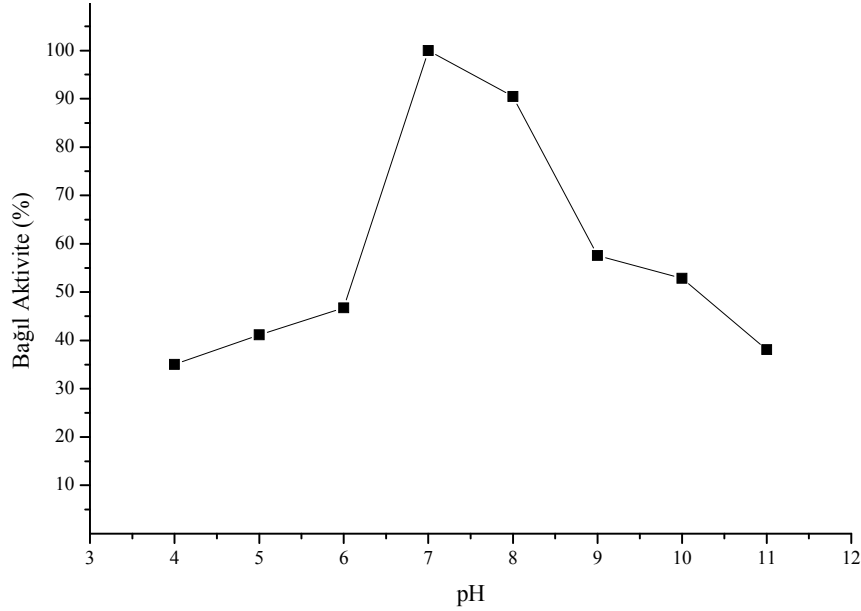
3.5. Lipazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Lipaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Lipaz aktivitesi, pH'nın bir fonksiyonu olarak, 50 mM asetat tamponunda pH 4.0–5.0; 50 mM fosfat tamponunda pH 6.0-7.0 ve 50 mM Tris-HCl tamponunda pH 8.0-9.0 değerleri arasında, 50 mM Glisin-NaOH tamponunda pH 10.0-11.0 değerleri arasında substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat kullanılarak belirlendi. Bu substrat varlığında belirlenen optimum pH, substrat özgülüğünün, ısıl özelliklerinin ve diğer parametrelerin belirlenmesi için kullanıldı.

Mucor hiemalis f. corticola'dan kromatografik teknikler ile saflaştırılan lipazın en iyi etkinlik gösterdiği pH değerini belirlemek üzere, pH 4.0–11.0 değerleri arasında hazırlanan

tamponlar kullanılarak, her bir pH noktasında enzim aktivitesi *p*-nitrofenil palmitat substratı varlığında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Çizilen pH-Aktivite grafiğinden enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri 7.0 olarak belirlendi (Şekil 14).

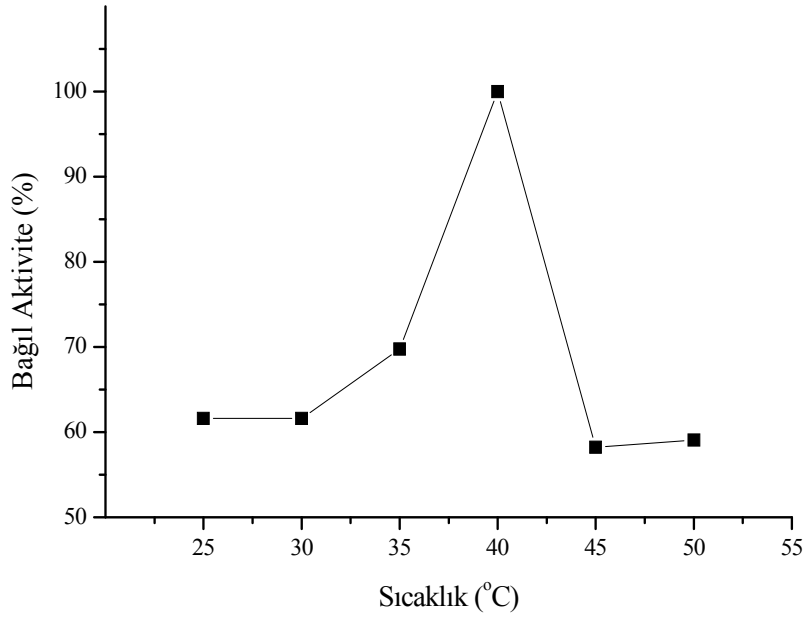


Şekil 14. *Mucor hiemalis f. corticola* lipazı üzerine pH'nın etkisi

3.5.2. Lipaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Lipazın optimum sıcaklığının belirlenmesi için, lipaz aktivitesi 5 °C'lik artışlarla 25–50 °C aralığında incelendi. Tampon ve substrat çözeltisinden oluşan karışım, 25–50 °C aralığında su banyosunda 20 dakika inkübe edildi.

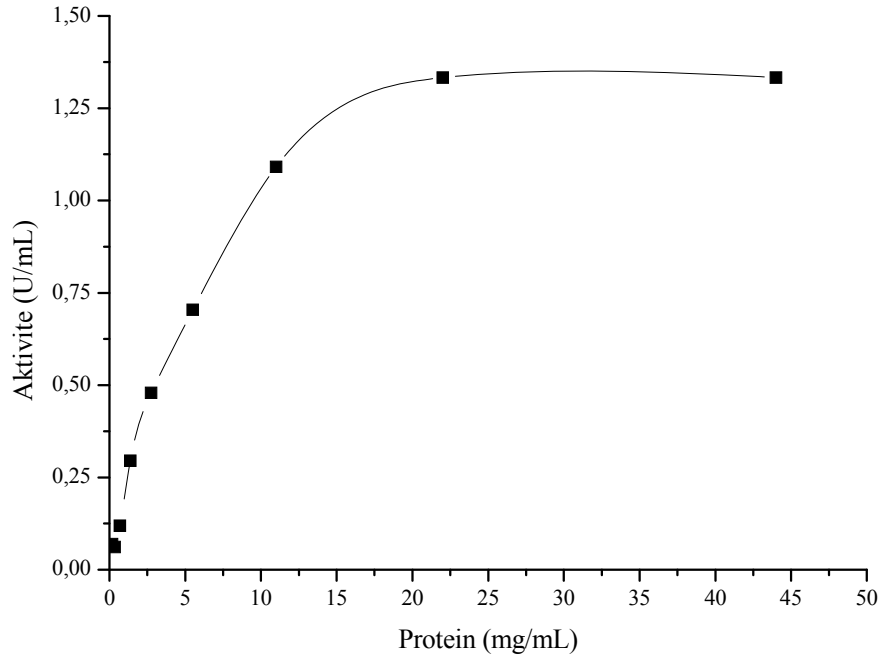
Lipaz aktivitesi, aktivite tamponuna substrat çözeltisi ve saf enzim elüatı ilave edildikten sonra mümkün olduğunca hızlı bir şekilde ölçülerek bağıl aktivite-sıcaklık grafiği çizildi (Şekil 15). Grafikte görüldüğü gibi *Mucor hiemalis f. corticola* lipazının optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi.



Şekil 15. *Mucor hiemalis* f. *corticola* lipazı üzerine sıcaklığın etkisi

3.5.3. Lipaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

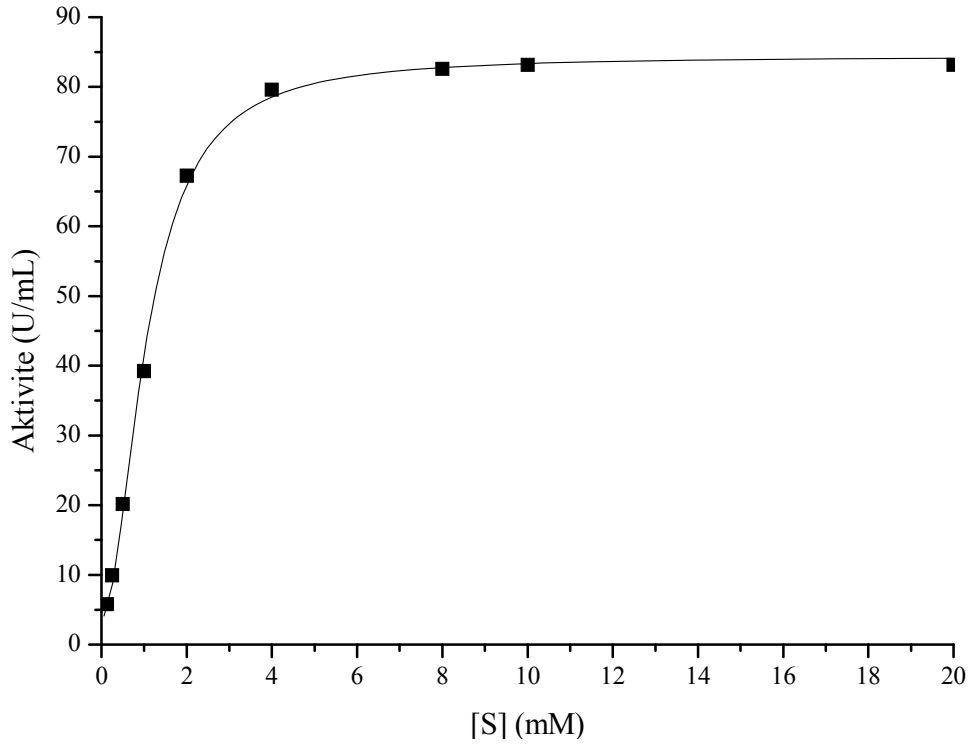
p-nitrofenil palmitat substratı varlığında, enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonu belirlendi ve lipaz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi irdelendi. *M. hiemalis* f. *corticola* lipazının aktivitesi sabit *p*-NPP konsantrasyonunda, proteinin 0.5–44 mg/mL aralığındaki konsantrasyon değişimine bağlı olarak incelendi (Şekil 16). Elde edilen hiperbolik eğriden çalışılan substrat konsantrasyonunda maksimum lipaz aktivitesi için optimum enzim konsantrasyonu 22 mg/mL olarak belirlendi.



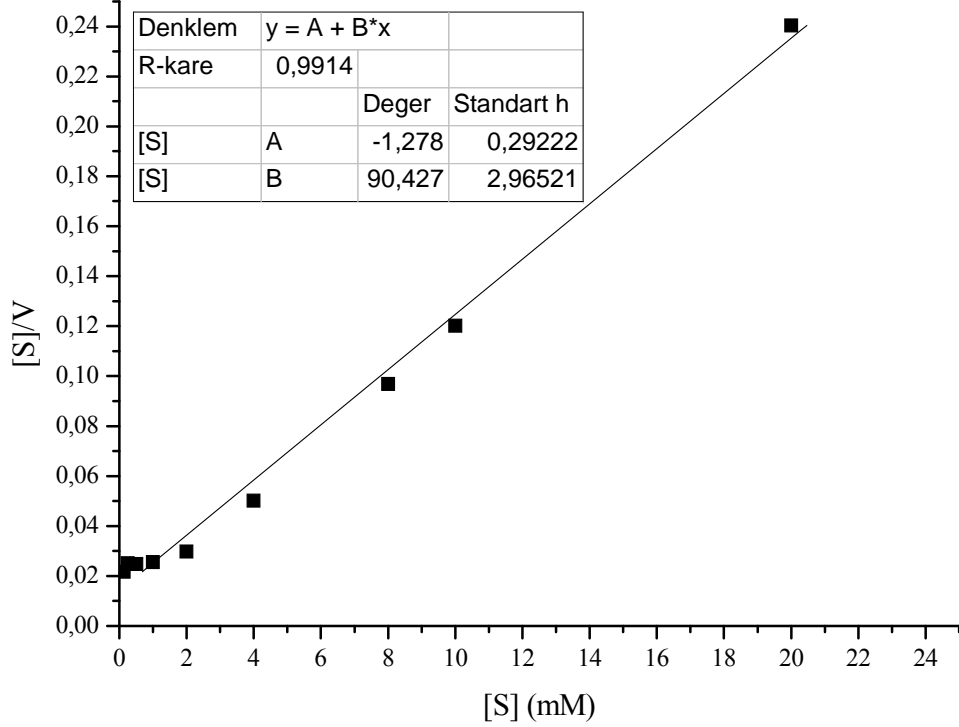
Şekil 16. Protein konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi

3.5.4. Lipaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

M. hiemalis f. corticola'dan saflaştırılan lipaza ait bazı kinetik verilerinin belirlenmesi amacı ile, uygun enzim konsantrasyonunda ve nihai konsantrasyonu 0.5-20 mM aralığında değişen substrat varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, enzim aktivitesi 410 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için, substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten eğrisi çizildi (Şekil 17). Çizilen bu grafikten, saflaştırılan bu enzimin aktivitesinin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu ve etkin bir enzim aktivitesinin gözlenebilmesi için *p*-NPP konsantrasyonunun 10 mM olması gerektiği tespit edildi. Kinetik veriler olan Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) çizilen Hanes-Woolf grafiğinden sırasıyla, 1.327 mM ve 91.11 $\mu\text{mol/dk}$ olarak belirlendi (Şekil 18).



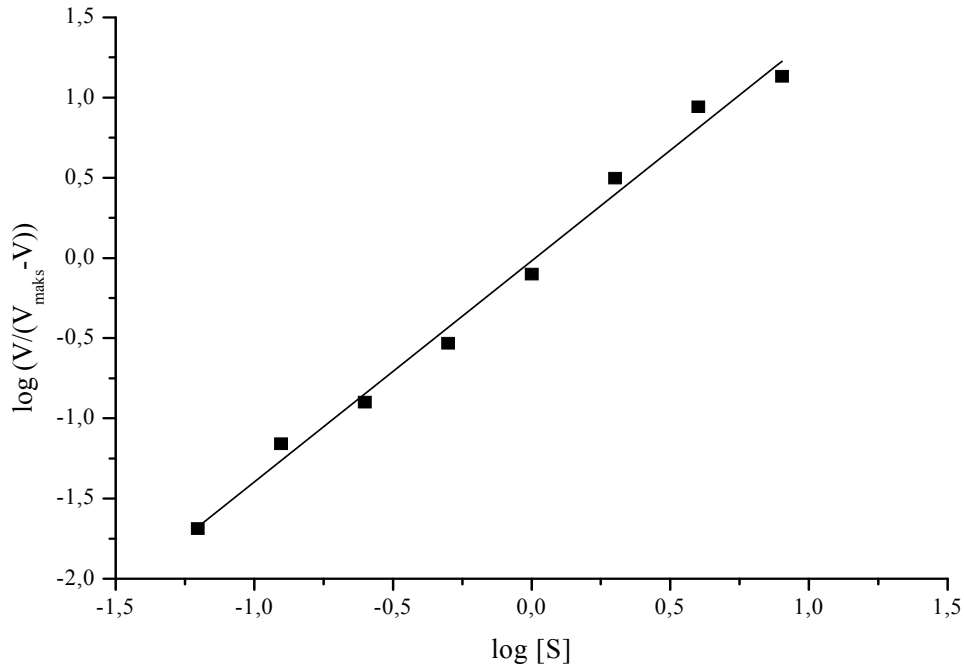
Şekil 17. *p*-NPP varlığında lipazın substrat doygunluk eğrisi



Şekil 18. *p*-NPP varlığında lipaz aktivitesi için Hanes-Woolf grafiği

3.5.5. Hill Eğrisi

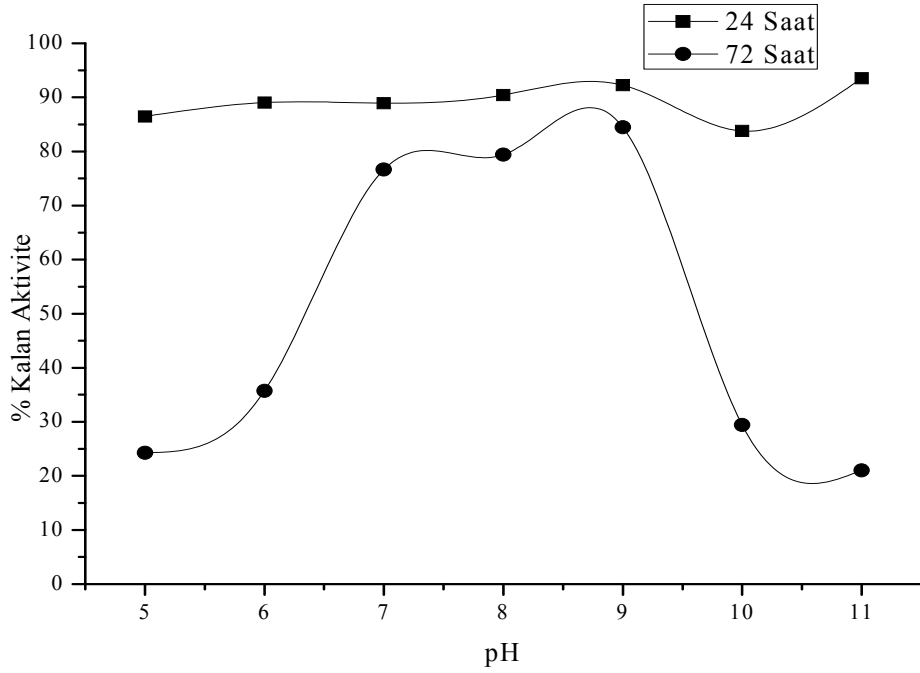
Hill eşitliğinden yararlanılarak çizilen ve *p*-NPP substratına ait olan Hill eğrisi Şekil 19’da verilmiştir. Bu substrat için, lipaz üzerindeki substrat bağlanma bölgesinin sayısı ve bir kooperativitenin olup olmadığı belirlendi. Hill grafiğinde *p*-NPP’a ait doğrunun eğiminden, Hill sabiti (*h*) 0,99 olarak hesaplandı. Bu da enzimin, tek bir substrat bağlanma bölgesinin olduğunu ve bir kooperativite olmadığını göstermektedir.



Şekil 19. *p*-NPP varlığında elde edilen Hill eğrisi

3.5.6. Lipaz’ın pH Kararlılığı

M. hiemalis f. *corticola*’dan kromatografik teknikler ile saflaştırılan lipazın pH kararlılığını incelemek için enzim, pH 5.0–11.0 aralığındaki farklı tamponlar içerisinde, 4 °C’de 24 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ölçülen aktivite, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen aktiviteye oranlanarak yüzde kalan aktivite belirlendi. Şekil 19’daki grafiklerde görüldüğü gibi, enzim belirtilen pH değerlerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında, aktivitesini % 80’in üzerinde korumuştur. 72 saatlik inkübasyon sonunda nötr ve hafif alkali pH’larda aktivite % 80’in üzerinde korunmuş iken daha asidik ve alkali pH değerlerinde önemli düşüşlerin olduğu belirlenmiştir (Şekil 20).



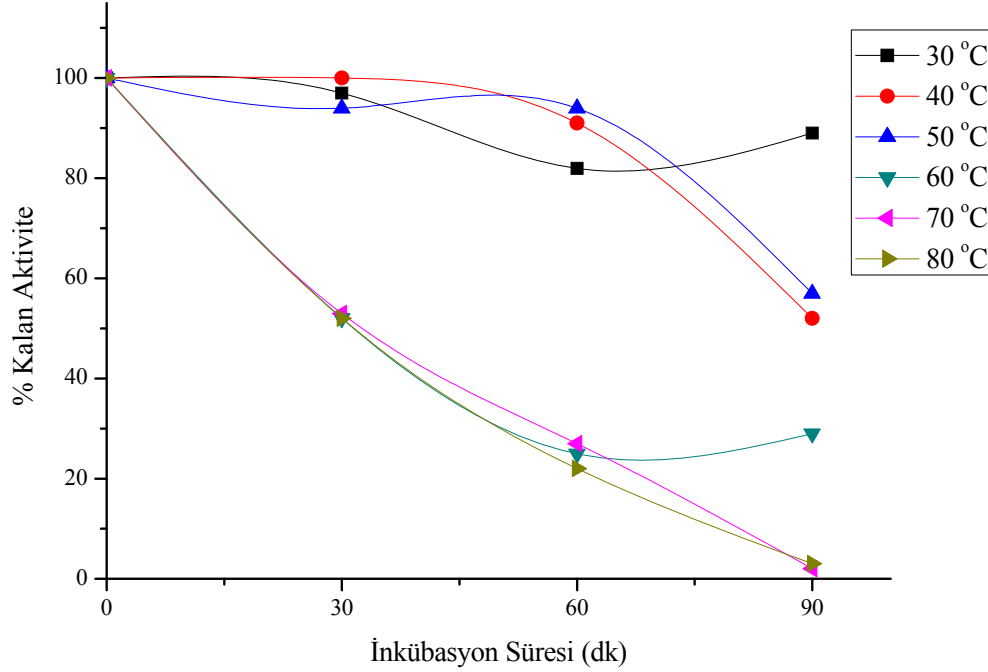
Şekil 20. *M. hiemalis f. corticola* lipazının pH kararlılığı

3.5.7. Lipaz'ın Isıl Kararlılığı

Lipazın ısıl kararlılığının belirlenmesi için, saf enzim elüatından içerisinde uygun miktarda enzim içerecek şekilde ependorf tüplerine alınarak, 10 °C'lik artışlarla, 30–80 °C aralığında su banyosunda, 30 dakikada bir ölçüm alınmak suretiyle toplam 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında saf enzim elüatı oda sıcaklığına kadar soğutulurken, optimum pH'da ve optimum substrat konsantrasyonunda aktivite ölçüldü. Yüzde kalan aktivite, inkübasyona tabi tutulmayan saf enzim elüatının aynı şartlardaki aktivitesiyle karşılaştırılarak hesaplandı.

Enzimin ısıl kararlılığının belirlenmesi amacıyla, enzim 30–80 °C aralığında, 10 °C'lik artışlarla 30 dakika zaman aralıklarında aktivite ölçmek suretiyle 20 dakika inkübe edildi. Elde edilen sonuçlarda, enzimin aktivitesini 30 °C'de 90 dakika inkübasyon sonunda % 90'ın üzerinde koruduğu görülmüştür. 40 ve 50 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini % 80 civarında korurken, artan inkübasyon süresinde aktivitesini giderek kaybettiği gözlemlenmiştir. 60–80 °C aralığında, 30 dakika sonunda enzim aktivitesinin % 50'sini, 1 saat sonunda %70'ini kaybetmiştir. 70 ve 80 °C'de ise, 1 saatlik inkübasyon

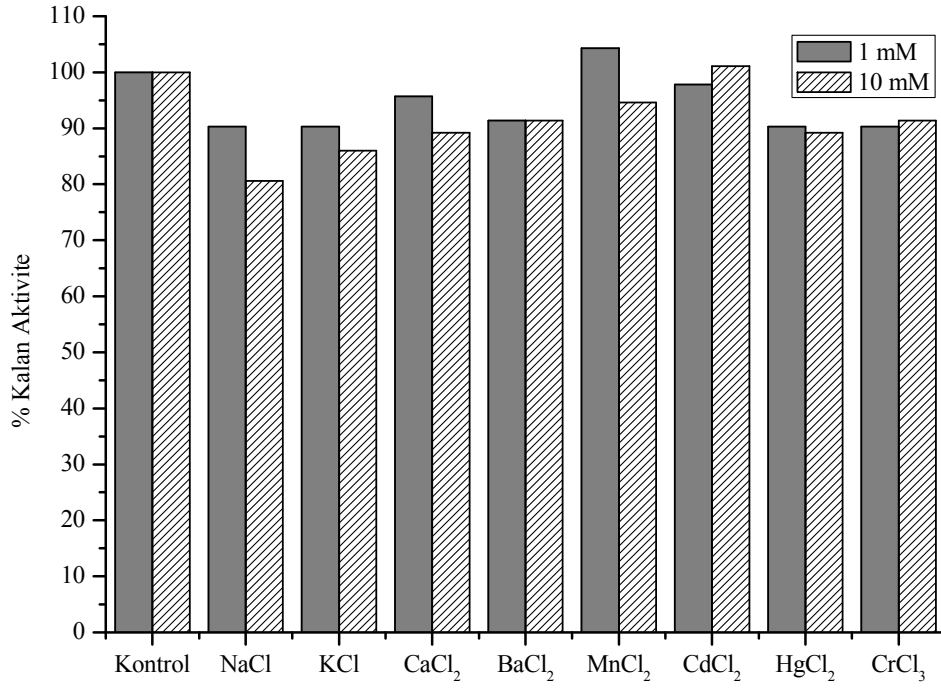
sonunda enzim aktivitesi % 10'un altına düşmüş ve inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. *M. hiemalis f. corticola* lipazının ısıl kararlılığının zamanla değişimi

3.5.8. Lipaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Lipaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek üzere, reaksiyon ortamına, nihai konsantrasyonu 1 mM ve 10 mM olacak şekilde, bazı 1A, 2A ve geçiş metallerinin klorür tuzlarından hazırlanan çözeltilerinden eklendi. 1 mM'lık nihai konsantrasyondaki metal iyonları varlığında lipaz aktivitesindeki değişimler kaydedildi. Kontrol olarak metal iyonu ihtiva etmeyen reaksiyon karışımı kullanıldı ve böyle bir karışımdaki lipaz aktivitesi % 100 kabul edildi (Şekil 22).



Şekil 22. *M. hiemalis f. corticola* lipazı üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Lipaz aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından, Mn^{2+} 'nin 1 mM'lık çözeltisinin enzim aktivitesini yaklaşık % 4 arttırdığı, diğer metal iyonlarının 1 mM'lık çözeltilerinin aktivitede önemli bir değişiklik yapmadığı, Cd^{2+} hariç diğer metal iyonlarının 10 mM'lık çözeltilerinin aktiviteyi % 10 civarında inhibe ettiği, Cd^{2+} 'nin herhangi bir etki göstermediği gözlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, 2003–2004 yılları arasında Rize ili, İyidere ve İkizdere ilçelerinin farklı yüksekliklerde bulunan çaylık alanlarındaki toprak örneklerinden izole edilip tanımlanarak Rize Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı, kültür koleksiyonunda saklanan mikrofungusların (Karaoğlu ve Ülker, 2006) lipolitik özellikleri araştırılmıştır.

Koleksiyonda -20 °C’de %20 gliserolde stoklanan 213 suş (Tablo 6), PDA besiyerine pasaj yapılarak 30 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Canlandırıldıktan sonra tribütirin agarda lipolitik aktivitelerine bakılmıştır.

Koleksiyondan alınan 15 cins, 28 türe ait 213 suş lipolitik aktivite bakımından taranmıştır. Bu suşların 115’inin (% 54) lipolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 5). Bu suşlar arasında en iyi aktiviteye sahip olan tür belirlenmiş, bunların arasından en iyi aktiviteye sahip *M. hiemalis* f. *corticola* IDM11B suşu lipaz saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçilmiştir (Şekil 6 ve 7).

Çalışmada lipolitik aktivite bakımından taranan 213 suşun hemen hemen tamamı lipaz üretmesine rağmen ortalamanın üstünde olan suşlar (%54) pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 11). Mikrofungusların çoğunlukla saprofit olarak hayatlarını sürdürmeleri dolayısıyla ekstraselüler enzim üretme yeteneklerinin yüksek olması şaşırtıcı değildir. Araştırılan suşlar arasında *Mucor*, *Trichoderma* ve *Fusarium* cinslerinin ortalama aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiş, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait suşların da yüksek aktiviteler gösterdikleri belirlenmiştir.

Çalışmada lipolitik aktivite gösteren suşların seçilmesi amacıyla, öncelikle suşların kalitatif enzim aktivitelerinin belirlenmesiyle başlanmıştır. Bu amaçla tribütirin agar besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri karbon kaynağı olarak dört karbonlu sentetik bir trigliserit olan tribütirin içermektedir (Gao vd., 2000). Tribütirinin lipaz aktivitesine özgül bir substrat olmadığı, fakat lipazlar tarafından da hidroliz edildiği bildirilmiştir (Jaeger, 1987). Birçok araştırmacı, çalışılan mikroorganizmaların lipolitik aktivitelerini belirlemek amacıyla tribütirin agar yöntemini kullanmıştır (Lee ve Rhee, 1993). Lipazlar, filamentli funguslar, mayalar ve bakteriler tarafından yoğun miktarda üretilmektedir. Lipolitik mikroorganizmaların sayısını artırmak için ekstraselüler lipaz aktivitesine sahip yüzlerce

fungus, maya ve bakteri türleri çeşitli araştırmacılar tarafından taranmış ve hala da taranmaktadır (Roberts vd., 1987; Sztajer vd., 1988; Rapp ve Backhaus, 1992).

Roberts vd., (1987) lipolitik funguslar üzerine yaptıkları bir çalışmada ayçiçeği tohumundan izole ettikleri fungusların 91 türünü içeren 223 liyofilize izolatu yeniden canlandırmışlar ve bu izolatları substrat olarak ayçiçeği yağının kullanıldığı, lipaz ortamında büyütmüşlerdir. Kültürlerin lipaz üretimini ve aktivitesini tribütirin agar difüzyon ve ayçiçeği yağı gaz kromatografisi yöntemlerini kullanarak ölçmüşlerdir. Bunun sonucunda sıvı ortamda 132 izolatu ekstraselüler lipaz aktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Sztajer vd., (1988) tarafından yapılan bir çalışmada fungus, aktinomiset ve bakteriler tarafından ekstraselüler lipaz üretimi için süt ve süt ürünleri ile bitkisel yağları içeren 60 farklı örnekten lipolitik aktiviteye sahip 160 suş izole etmişlerdir. Tribütirin agar yöntemi kullanılarak izole edilen bu suşlar içinde, bakteri, aktinomiset ve fungusları içeren 19 suş en yüksek lipaz aktivitesi göstermiştir. Bu suşların lipolitik aktivitesi zeytinyağı ve tribütirin kullanılarak titrasyon yöntemi ile doğrulanmıştır.

Rapp ve Backhaus (1992), filamentöz küf, maya ve bakterileri içeren 700 suşu, triolein/tween 80 agarda büyümesi sırasında trioleini hidrolizleyebilmelerine göre aktivitelerini belirlemişlerdir. %0.75 oranında triolein içeren agara, trioleinin en iyi emülsifikatörü olan tween 80, % 0.25 konsantrasyonda ilave edilmiştir. Triolein / tween 80 agar üzerinde, büyüme sırasında oluşan en belirgin ve en büyük açılma zonlarına sahip mikroorganizmaları seçmişlerdir. Daha sonra seçilen bu mikroorganizmalar %1 zeytinyağı içeren çalkalamalı kültürde büyütürken titrimetrik olarak lipaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Çalkalamalı kültürde büyütülen 34 küf, 15 maya ve 21 bakteri en yüksek aktiviteyi göstermişlerdir. Küfler arasında en iyi aktiviteyi *Rhizopus* türleri göstermiştir. *Rhizopus circinans* 96 saatlik inkübasyon sonunda 44 U/mL ile en iyi aktivite gösteren tür olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda, birçok mikrofungus türünde yapılan tarama sonuçlarına göre, en iyi aktivite gösteren tür *Mucor hiemalis* f. *corticola* IDM11B olarak belirlenmiştir (Şekil 7). Bu tür, lipaz üretimi, enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçilmiştir. Lipolitik aktivitesi belirlenen diğer türler daha sonraki çalışmalar için kaynak oluşturmak amacıyla kaydedilmiştir.

Mucor hiemalis f. *corticola* IDM11B lipazının saflaştırılması amacıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve Q-Sepharose

Fast Flow iyon değişim kromatografisi ardışık şekilde uygulanmıştır. Saflaştırma işlemlerine amonyum sülfat çöktürmesi ile başlanmış, ilk olarak %40 uygulanmış, en iyi çöktürme oranı %75 olarak belirlenmiştir. Çöktürme neticesinde 3.27 kat saflaştırma yapılmıştır (Tablo 12). Benzer şekilde, Hiol vd., (1999) yaptıkları çalışmada iki aşama olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapmışlar ve sırasıyla %40 ve %75 olarak uygulamışlardır. Saflaştırma katsayısı ise 17 olarak belirlemişlerdir.

Amonyum sülfatın uzaklaştırılması maksadıyla diyaliz işlemi yapılmıştır. Jel filtrasyon matriksi olarak kullanılan Sephadex G-75 kolonu 3 ile 70 kDa büyüklükteki proteinler için uygun bir kolon matriksidir (Dechow, 1989). Çeşitli araştırmalarda farklı ebatlarda kolonlar kullanılmıştır. Hiol vd., (1999) jel filtrasyon için 2.6 x 70 cm'lik kolon tercih ederken, Ohnishi vd., (1994) 2 x 55 cm'lik kolon tercih etmişlerdir. Bu çalışmada ise 2.5 x 40 cm'lik kolon tercih edilmiştir. Elüatlarda yüksek lipaz aktivitesi gözlenen 9-18. fraksiyonlar (Şekil 9) toplanmıştır. Toplanan elüatta proteinlerin de yoğun olarak 10 ile 15. fraksiyonlarda geldiği görülmüştür. Hiol vd., de (1999) benzer fraksiyonlarda aktivite belirlemişlerdir. Çalışmamızda, toplanan fraksiyonlarda belirlenen aktivitenin doğrulanması için aktivite jeli yapılmış ve bu fraksiyonlarda aktivitenin varlığı gösterilmiştir. Bu aşamada saflaştırma katsayısı 4.1, verim ise % 49.6 olarak belirlenmiştir. Hiol vd., (1999) yaptıkları çalışmada jel filtrasyon neticesinde verimi % 61 olarak belirlemişlerdir.

Mikrobiyal kaynaklı lipazların saflaştırılması için farklı kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Lipazların saflaştırılmasında kullanılan önemli bir teknikte iyon değişim kromatografisidir. İyon değişim kromatografisinde proteinler, verilen pH değerindeki net yüklerine göre ayrılırlar. Matriks, proteinlerle elektrostatik çekimlerine göre ilişki kurar (Scopes, 1994). Bu kromatografik yöntem birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (Hiol vd., 1999; Brush vd., 1999).

Çalışmamızda da jel filtrasyon kromatografisinden sonra Q-Sepharose Fast Flow matriksi ile doldurulmuş iyon değişim kolonu kullanılmıştır. Toplanan elüatlardan 14 ile 17 numaralı fraksiyonlarda aktivite belirlenmiştir (Şekil 10). Fraksiyonlardaki protein dağılımına bakıldığında 14 ile 20 no'lu fraksiyonlarda proteinlerin toplandığı görülmektedir. Yapılan elektroforez sonucunda, toplanan fraksiyonlardan aktivite belirlenen fraksiyonların protein profilleri de ortaya konulmuştur (Şekil 12).

Kromatografik ayırma işlemlerinden sonra, elde edilen enzim elüatı elektroforetik olarak analiz edilmiştir. Ham enzim özütünün ve saf enzim elüatının tatbik edildiği %

12'lik doğal poliakrilamid jel elektroforezinde, α -naftil asetat-Fast Red substrat boyaması sonucunda, lipaz varlığını gösteren tek bir bant gözlenmiştir (Şekil 12). Ham enzim özütü, saf enzim elüatı ve standartların birlikte yüklendiği % 12'lik SDS poliakrilamid jel elektroforezinde, coomassie brilliant blue R-250 boyama sonucunda, ham enzim özütünde var olan çok sayıdaki protein bantlarının varlığı gözlenmiştir. Ayrıca, standart proteinlerle karşılaştırıldığında, saf enzim elüatında, yaklaşık 48 kDa'a karşılık gelen bir protein bandı belirlenmiştir.

Jel filtrasyonda proteinlerin elüsyon hacimleri ile moleküler kütlelerinin logaritmaları arasında doğrusal bir ilişki vardır. Moleküler ağırlığı bilinen proteinlerin jel filtrasyon kolonundan geçirilmesi ile moleküler ağırlığı bilinmeyen proteinlerin moleküler ağırlıkları bulunabilir. Bu tekniğin önemli bir avantajı, ilgi duyulan proteine ait iyi bir aktivite belirleme yöntemi olması durumunda saf olmayan örneklerle de çalışılabilmesidir (Voet ve Voet, 2004). Yapılan SDS-PAGE neticesinde saflaştırılan lipazın 48 kDa civarında olduğu tespit edilmişti. Bunu doğrulamak amacıyla analitik jel filtrasyon yapıldı. Analitik jel filtrasyon neticesinde saflaştırılan enzimin 46 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 13). Elde edilen veriler ışığında saflaştırılan proteinin monomer olduğu söylenebilir.

İyon değişim kromatografisi neticesi saflaştırılan enzimin saflaştırma katsayısı 12,63, verimi ise % 27,7 olarak belirlenmiştir (Tablo 12). Bugüne değin farklı araştırmacılar çok çeşitli organizmalardan lipaz saflaştırılması yapmışlardır. Hoshino vd., (1992) yaptıkları çalışmada *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* lipazını Q-Sepharose kolonundan sonra enzimi 2.37 kat ve % 38.1 verimle saflaştırmışlardır. Hiol vd. (1999), *M. hiemalis* f. *hiemalis* lipazını 434 kat ve % 27.6 verimle saflaştırmışlardır. Brush vd. (1999), *Ophistoma piliferum* ekstraselüler lipazını 260 kat ve % 33 verimle saflaştırmışlardır.

Enzim aktivitesinin ifadesinde pH önemli bir faktördür. *M. hiemalis* f. *corticola* lipazının pH'ya bağımlılığı, pH 4.0–11.0 değerleri arasında incelendiğinde, grafiğin tek pik verdiği ve optimum pH'nın 7.0 olduğu gözlenmiştir (Şekil 14). pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren bu grafiğe göre, enzimin, nötr ve hafif alkali pH'larda *p*-nitrofenil palmitatı hidroliz etme yeteneği daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Enzim pH 8.0'de de aktivitesinin % 90'ını koruduğu belirlendi. Yapılan bir çalışmada *M. hiemalis* f. *hiemalis* lipazının pH 6.0 ile 8.5 arasında aktivitesinin % 60'tan fazlasını koruduğu, optimum pH'sı ise 7.0 olduğu bildirilmiştir (Hiol vd., 1999). Enzim, bu değerlerden daha asidik ve alkali pH değerlerine doğru gidildikçe aktivitesini kaybetmekte olduğu tespit edilmiştir. *Penicillium wortmanii* lipazının da benzer şekilde pH 7.0 ve 8.0'de optimum aktivite

gösterdiği ve asidik ve alkali pH'larda aktivitenin önemli bir oranda düştüğü bildirilmiştir (Costa ve Peralta, 1999). Termotolerant bir mikrofungus olan *Rhizopus homothallicus* lipazının optimum pH'sı 7.0 olarak belirlenmiş ve pH 5.0 ve 9.0'da aktivitesinin % 80'ini kaybettiği tespit edilmiştir (Diaz vd., 2006). Termofilik bir fungus olan *Rhizopus oryzae* lipazının optimum pH'sı 7.5 olarak tespit edilmiştir (Hiol vd., 2000). Literatürdeki verilere göre, *M. hiemalis* f. *corticola* lipazının diğer mikrofungus ve bakteri lipazlarına benzer optimum pH'ya sahip olduğu söylenebilir.

M. hiemalis f. *corticola* lipazının aktivitesinin sıcaklıkla değişimi, 25-50 °C aralığında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enzimin optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 15). 25-30 °C aralığında enzim aktivitesinin % 60 civarında olduğu ve 35 °C'de ise enzimin aktivitesini % 70'in üzerinde koruduğu gözlenmiştir. Enzim aktivitesi 45 ve 50 °C sıcaklıklarda giderek azalmıştır. Farklı çalışmalarda lipazların optimum sıcaklıkları benzerlik göstermektedir. *M. hiemalis* f. *hiemalis* lipazının optimum sıcaklığı 40 °C (Hiol vd., 1999), *Ophistoma piliferum* lipazının 35 °C, (Brush vd., 1999), *Aspergillus carneus* termostabil lipazının 37 °C (Saxena vd., 2003), *Penicillium wortmanii* lipazının 45 °C (Costa ve Peralta, 1999), *Mucor* sp. lipazının 40 °C optimum sıcaklığa sahip oldukları bildirilmiştir.

M. hiemalis f. *corticola* lipaz aktivitesinin protein konsantrasyonuna bağımlılığı incelendiğinde, aktivitenin 22 mg/mL'ye kadar arttığı gözlenmiştir. Daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise, lipaz aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu belirlendi (Şekil 16).

Saflaştırılan enzimin kinetik değerlerinin ve optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi çalışması *p*-NPP substratı varlığında yapıldı. Çizilen substrat-doygunluk grafiğinden, *M. hiemalis* f. *corticola* lipazının basit Michealis-Menten kinetiğine uyduğu ve enzimin optimum substrat konsantrasyonunun 10 mM olduğu belirlendi. 100 mM substrat konsantrasyonunda, enzimin substratı ile doygunluğa ulaştığı ve bundan sonraki konsantrasyonlarda hızın değişmediği saptandı. Enzimin kinetik verileri olan Michealis-Menten (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerleri, çizilen Hanes-Woolf eğrisinden sırasıyla, 1.327 mM ve 91.11 μ mol/dk olarak belirlendi (Şekil 18). K_m değeri, substratın enzime olan ilgisinin bir göstergesidir. Bu değer ne kadar küçük olursa, enzimin substrata karşı ilgisi o kadar fazladır. Fungal lipazların saflaştırılması üzerine birçok çalışma bulunmasına rağmen araştırmalarda çoğunlukla kinetik parametreler hesaplanmamıştır. Daha çok substrat spesivitesi ile pH ve ısıl kararlılık üzerinde durulduğu belirlenmiştir (Kriger vd., 1999;

Saxena, 2003; Costa ve Peralta, 1999; Diaz vd., 2006). Hiol vd. (1999), substrat olarak *p*-nitrofenil asetat kullanarak *M. hiemalis* f. *hiemalis* lipazının K_m ve V_{maks} değerlerini sırasıyla 0.62 mM ve 861 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak belirlemişlerdir. *Trichoderma viride* lipazının K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 1.14 mM ve 56 $\mu\text{mol/dk}$ olarak bildirilmiştir (Kashmiri vd., 2006).

p-NPP substratı varlığında, Hill eşitliği kullanılarak, Hill eğrisi çizilmiştir (Şekil 19). Çizilen bu grafikten yararlanılarak, Hill sabiti (*h*) 0.99 olarak bulunmuştur. Hill sabitinin 1'e yakın olması, *M. hiemalis* f. *corticola* lipazının tek bir bağlanma bölgesinin olabileceğini ve bu enzimin bir kooperativiteye sahip olmadığını göstergesi olarak düşünülmektedir (Voet ve Voet, 2004).

M. hiemalis f. *corticola* lipazı, farklı pH değerlerinde 4 °C'de 24 saat ve 72 saat inkübasyona maruz bırakıldığında, nötr ve hafif alkali pH değerlerinde lipaz aktivitesinde genel olarak ciddi kayıpların olmadığı gözlenmiştir (Şekil 20). Dolayısıyla, *M. hiemalis* f. *corticola* lipazının, yüksek pH kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle 4 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, enzimin aktivitesini çalışılan her pH değerinde % 80'in üzerinde koruması, söz edilen sıcaklık ve süre zarfında enzimin oldukça kararlı olduğunu göstermektedir. Enzim, 4 °C'de 72 saat inkübe edildikten sonra, pH 7.0–9.0 aralığında, aktivitesini % 75'in üzerinde korunduğu belirlenmiştir. pH 5.0 ve 6.0 ile pH 10.0 ve 11.0'de ise enzimin aktivitesinin yaklaşık % 70'ini kaybettiği gözlenmiştir. Saxena vd., (2003), *Aspergillus carneus* lipazının pH 7.0-10.0 arasında stabil kaldığını ve pH 11.0'de kalan aktiviteyi % 52.4 olarak bildirmişlerdir. Literatürde yüksek pH kararlılığına sahip birçok lipaz bildirilmiştir. Bunlardan bazıları, *Humicola lanuginosa* (Lui vd., 1973), *Rhizopus japonicus* (Aisaka ve Terada, 1981), *Aspergillus terreus* (Yadav vd., 1998) lipazlarıdır. Fungal lipazların pH kararlılıkları büyük oranda benzerlikler göstermektedir. Saflaştırılan *M. hiemalis* f. *corticola* lipazının, *Penicillium wortmani* (Costa ve Peralta, 1999) lipazına benzer şekilde asidik ve alkali pH'larda stabil olmadığı görülmektedir. Hiol vd., (1999), *M. hiemalis* f. *hiemalis* lipazının, *M. hiemalis* f. *corticola* lipazına benzer şekilde pH 7.0'de optimum aktivite gösterdiği, asidik ve alkali pH'larda aktivitenin % 80'lere varan oranlarda düştüğünü bildirmişlerdir.

M. hiemalis f. *corticola* lipazının, 30–80 °C aralığında, 30 dakikada bir aktivite tayini yapılmak suretiyle, toplam 90 dakikalık inkübasyonu sonunda kalan aktiviteleri belirlenerek, ısıl kararlılığı incelenmiştir (Şekil 21). Elde edilen verilere göre, 30 °C'de, 1 saatlik inkübasyon sonunda enzim aktivitesini % 90'ın üzerinde koruduğu görülmüştür.

Elde edilen verilere göre sıcaklık arttıkça lipaz aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir. 40 ve 50 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini % 80 civarında korurken, artan inkübasyon süresinde aktivitesini giderek kaybettiği gözlemlenmiştir. 60–80 °C aralığında, 30 dakika sonunda enzim aktivitesinin % 50'sini, 1 saat sonunda %70'ini kaybettiği belirlenmiştir. 70 ve 80 °C'de ise, 1 saatlik inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin % 10'un altına düştüğü ve inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. Hiol vd. (2000), termofilik bir suş olan *Rhizopus oryzae* lipazının 30 dakika içinde, 35 °C'den sonra aktivitesini hızla kaybettiğini, 50 °C'de aktivitesinin neredeyse %80'ini kaybettiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada (Hiol vd., 1999), *M. hiemalis* f. *hiemalis* lipazı 15 dakika belirli sıcaklıklarda inkübe edilerek aktivite tayini yapılmış, 40 °C'ye kadar stabil kalırken 45 °C'de aktivitesinin % 20'sini, 55 °C'de ise neredeyse tamamını kaybetmiştir. *Penicillium wortmani* (Costa ve Peralta, 1999) lipazının da benzer şekilde 40 °C'den sonra aktivitesinin azalmaya başladığı, 60 °C'de yaklaşık olarak % 90'ını kaybettiği bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında saflaştırılan *M. hiemalis* f. *corticola* lipazının diğer fungal lipazlara benzer ısıl kararlılık karakteri gösterdiği söylenebilir.

Metal iyonları, proteinlerin çoğunda üç boyutlu yapıların oluşmasında ve aktif merkezde substratların katalizlerinde doğrudan veya dolaylı olarak önemli rol oynamaktadırlar. Bazı enzimler, aktiviteleri için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına ve yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine sahip olabilirler. Bu sebeple metal iyonları proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). Bu amaçla çalışmamızda, *M. hiemalis* f. *corticola* lipaz aktivitesi üzerine bazı 1A, 2A ve geçiş metallerinin klorür tuzlarının etkileri incelendi (Şekil 22). Lipaz aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından, Mn^{2+} 'nin 1 mM'lık çözeltisinin enzim aktivitesini yaklaşık % 4 arttırdığı, diğer metal iyonlarının 1 mM'lık çözeltilerinin aktivitede önemli bir değişiklik yapmadığı, Cd^{2+} hariç diğer metal iyonlarının 10 mM'lık çözeltilerinin aktiviteyi %10 civarında inhibe ettiği, Cd^{2+} 'nin herhangi bir etki göstermediği gözlenmiştir. *M. hiemalis* f. *hiemalis* lipazı üzerine yapılan çalışmada (Hiol vd., 1999), enzim aktivitesinin Ca^{+2} iyonunun 10 ve 25 mM'lık konsantrasyonlarda aktiviteyi önemli oranda artırdığı, Na^{+} , Mg^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının az da olsa aktiviteyi artırdığı, Fe^{2+} , Cu^{2+} ve Ba^{2+} iyonlarının inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir.

Hiol vd., (2000), *Rhizopus oryzae* lipazı üzerine bazı metal iyonlarının etkilerini incelemişler, Fe^{3+} , Hg^{2+} ve Cu^{2+} 'nin inhibisyona neden olduğunu tespit etmişlerdir. Fakat Hoshino vd., (1992), Fe^{3+} 'ün herhangi bir inhibisyona neden olmadığını Ca^{2+} ve Ba^{2+} 'nin kısmen aktiviteyi artırdığını belirlemişlerdir. Lipazlar kofaktöre ihtiyaç duymayan enzimlerdir (Harwood, 1990). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında metallerin etkisinin incelenmesinde farklı sonuçların alındığı görülmektedir. Aktivasyona veya inhibisyona sebep olma gibi durumlar, metal iyonlarının proteinlerin farklı bölgelerine bağlanmaları sonucu, enzimin yapısını farklı şekilde etkileyebilmelerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001).

Sonuç olarak, bu çalışma ile Rize'de çay yetiştirilen topraklardan izole edilen mikrofungusların lipolitik aktiviteleri belirlenmiş, en iyi aktivite gösteren suş olan *M. hiemalis* f. *corticola* IDM11B suşunun ürettiği lipaz saflaştırılmış, *p*-nitrofenil palmitat substratı varlığında, optimum pH ve sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığı, metal iyon etkisi, kinetik bazı parametreler açısından incelenmiş ve çeşitli organizmalardaki lipazlara oldukça benzer biyokimyasal özellikler gösterdiği saptanmıştır.

5. ÖNERİLER

Çalışmada Rize’de çay yetiştirilen topraklardan daha önce izole edilen ve Rize Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kültür Koleksiyonu’nda muhafaza edilen mikrofunguslar kullanıldı (Karaoğlu ve Ülker, 2006). Bu çalışmada lipolitik aktiviteleri yüksek olarak tespit edilen diğer suşların da saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları yapılabilir.

Enzim üretiminde besiyeri ya da fermentasyon ortamının optimizasyonu önemli bir basamaktır. Üretim şartlarının iyileştirilmesi çalışmaları eksik kalmıştır. Daha sonraki çalışmalarda bu eksiklik giderilebilir.

Pekçok endüstriyel, analitik ve klinik süreçte, enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılırlar ve ürüne dönüştürüldükten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Bu nedenle immobilize olarak defalarca kullanılmaları ekonomik olarak daha makul olmakla birlikte enzimatik süreçler sürekli olarak da yapılabilmektedir. İmmobilizasyon ayrıca enzimlerin kararlılığını artıran bir yöntemdir. Bu çalışmada, elde edilen enzim immobilize edilerek, ileri derecede karakterize edilebilir ve kararlılığı artırılabilir. Bu sayede enzimin endüstriyel açıdan kullanımı kolaylaştırılabilir.

Lipazların katalitik aktivitelerinin incelenmesinde substrat özgülükleri önemlidir. Lipaz aktivitesi ölçümünde farklı birçok yöntem bulunmasına rağmen en çok tercih edilen titrimetrik yöntemdir. Ayrıca spektrofotometrik yöntemin de çok hassas olduğu bildirilmektedir. İmkânlar dâhilinde bu yöntemler de kullanılabilir.

Saflaştırma işlemlerinde proteolitik aktivitenin engellenmesi için 4 °C’de çalışılması önemlidir. Soğuk odası bulunmayan laboratuarlarda kromatografik buzdolaplarının kullanılması önerilmektedir.

Çalışmada enzimin optimum pH 7.0 ve 40 °C’de aktivite gösterdiği, 50 °C’ye kadar kısmen stabil olduğu, pH 7.0–9.0 arasında 72 saate kadar kararlı olduğu belirlenmiştir. Endüstriyel işlemlerde çoğunlukla termofilik enzimlerin tercih edilmesine karşın deterjanların düşük sıcaklıklarda da kullanılması enzimin ticari olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Rekombinant DNA teknolojisinin modifiye edilmiş proteinlerin üretiminde büyük rolü vardır. Enzimi kodlayan gen bölgesi tespit edilip, prokaryot bir organizmaya klonlanabilir.

Bu şekilde enzimin bol miktarda üretilmesi sağlanabilir. Bölge spesifik mutasyonlarla, çalışmada saflaştırılan enzimin optimum pH değeri 7'den daha aşağıya düşürülebilir ve optimum sıcaklık değeri ve ısıl kararlılığı yükseltilebilir.

Enzimlerin karakterizasyonunda inhibitör çalışmaları önem arz etmektedir. Lipazlarda inhibisyon çalışmaları obezitenin önlenmesi çalışmalarında kullanıldığı bilinmektedir. Bilinen inhibitörlerin ve yeni bazı bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenebilir.

Saflaştırılan lipazın N-ucu aminoasit dizisi belirlenerek, bilinen türlerle karşılaştırılabilir. Enzimin izoelektrik noktasının belirlenmesi amacıyla izoelektrik odaklama yapılabilir.

Son yıllarda proteinlerin analizinde kütle spektroskopisi yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Protein örneği belirli bazı enzimlerle (tripsin vb.) kesildiğinde özgün peptit parçaları oluşmakta ve bu parçalar protein parmak izini oluşturmaktadır. MALDI-MS ile analiz edilen örneklerden elde edilen bilgiler veritabanında bulunan bilgilerle karşılaştırılarak protein hakkında yapısal bilgi edinilebilmektedir. Saflaştırılan *M. hiemalis f. corticola* IDM11B lipazının da bu kapsamda analiz edilerek protein hakkında detaylı bilgilerin edinilmesi mümkün olabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Aisaka, K. ve Terada, O., 1981. Purification and properties of lipase from *Rhizopus japonicus*, J. Biochem., 89, 817-822.
- Akşamoğlu, A., 1997. Lipaz enziminin florisil üzerine immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Alexopoulos, C. J. ve Mims, C., 1996. Introductory Mycology, 4th Edition, Wiley, New York.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. ve Lubert, S., 2002. Biochemistry, 5th Edition, W. H. Freeman and Co., New York, 1050 s.
- Bıyık, H., 1993. Bazı Fungus Türlerinden Yüzey Kültür Fermantasyonu Yöntemi ile Mikrobiyal Yağ Üretimi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- Bock, W. C., Katz, A. G., Markham, G. D. ve Glusker, J. P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparasion of the Divalent Ions, J. Am. Chem. Soc., 121, 7360-7372
- Bosc-Bierne, I., Rathelot, J., Perrot, C. ve Sarda, L., 1984. Studies on chicken pancreatic lipase and colipase, Biochimica et Biophysica Acta, 794, 65-71.
- Brady, N. C., 1990. The Nature and Properties of Soils, 10th Edition, Macmillian Publishing Company, New York, 621 s.
- Brockerhof, H. ve Jensen, R. G., 1974. Lipolytic Enzymes, Academic Press, London, 329 s.
- Brush, T. S., Chapman, R., Kurzman, R. ve Williams, D. P., 1999. Purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*, Bioorg. Med. Chem. 7, 10, 2131-2138.
- Costa, M. A. F. ve Peralta, R. M., 1999. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*), J. Basic Microbiol., 39, 1, 11-16.
- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J. ve Figueras, M. J., 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd Edition, ASM Press, 1160 s.
- Decagny, B., Jan, S., Vuilleumard, J. C., Sarazin, C., Seguin, J. P., Gosseun, C., Barbotin, J. N. ve Ergon, F., 1988. Synthesis of wax ester through triolein alcoholysis: Choice of the lipase and study of the mechanism, Enzyme and Microbial Technology, 25, 578-582.
- Dechow, F. J., 1989. Separation and Purification Techniques in Biotechnology, Noyes Publications, Piscataway, New Jersey, 490 s.
- Dennison, C., 2003. A guide to protein isolation, 2nd Edition, USA, Kluwer Academic Publishers, 249 s.

- Di Tusa, C. A., Christensen, T., McCall, K. A., Fierke, C. A. ve Toone, E. J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding. 1. Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 5338-5344.
- Domsch, K. H., Gams, W. ve Anderson, T. H., 1980. Compendium of Soil Fungi, Vol.1, Academic Press, London, 859 s.
- Eliana, S. K., Medieta, O. ve Rodrigues, M. I., 2001. Studies on lipase-affinity adsorption using response-surface analysis, Biotechnology and Applied Biochemistry, 33, 153-159.
- Fadiloglu, S. ve Erkmen, O., 2001. Effect of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*, Turkish J. Eng. Environ. Sci., 26, 249–254.
- Fox, P. F., 1991. Food Enzymology, Elsevier Applied Science, 378 s.
- Fuciños, P., Abadin, C. M., Sanromán, A., Longo, M. A., Pastrana, L. ve Rúa, M. L., 2005. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization, Journal of Biotechnology, 117, 233-241.
- Gao, X. G., Cao, S. G. ve Zhang, K. C., 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain, Enzyme and Microbial Technology, 27, 74-82.
- Godtfredsen, S., E., 1990. Micobial Lipases, Vol. 7, Nova Nordisk A/S, Denmark, 255-273.
- Gupta, R., Gupta, N. ve Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, Appl. Microbiol. Biotechnol., 64, 763-781.
- Hanes, C. S., 1932. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley, Biochemical Journal, 26, 1406–1421.
- Harwood, J., 1990. The versatility of lipases for industrial uses, Trends Biochem., 14, 125-126.
- Hasenekoğlu, İ., 1991. Toprak Mikrofungusları, 4. Cilt, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 217-280.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L. ve Comeau, L. C., 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit, Enzyme and Microbial Technology, 26, 421-430.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Druet, D. ve Comeau, L., 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*, Enzyme and Microbial Technology, 25, 80–85.
- Hong, M. C. ve Chang, M. C., 1988. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1, Biotechnology Letters, 20, 1027-1029.
- Hoshino, T., Sasaki, T., Watanabe, Y., Nagasawa, T. ve Yamane, T., 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. *lini*, Biosci. Biotech. Biochem., 56, 660–664.

- Houde, A., Kademi, A. ve Leblanc, D., 2003. Lipases and their industrial applications, Applied Biochemistry and Biotechnology, 118, 155-170.
- Huang, S. Y., Chang, H. I. ve Goto, M., 1988. Preparation of Surfactant-coated lipase for the esterification of geraniol and acetic acid in organic solvents, Enzyme and Microbial Technology, 22, 552-557.
- Huang, Y., 2002. Lipase Production in Fungi, Doktora Tezi, Auburn University, Alabama, ABD.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. ve Shrestha, S., 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, J. Mol. Catal. B. Enzymatic, 16, 53-58.
- Jacob, Z., 1994. Yeasts Lipid Biotechnology, Advances in Applied Microbiology, 39, 185-212.
- Jaeger, K. ve Reetz, M. T., 1998. Microbial Lipases form versatile tools for biotechnology, TTPTECH, 16, 396-403.
- Karaoğlu, Ş. A. ve Ülker, S., 2006. Isolation, Identification and Seasonal Distribution of Soilborne Fungi in Tea Growing Areas of İyidere-İkizdere Vicinity (Rize-Turkey), Journal of Basic Microbiology, 46, 3, 208–218.
- Kashmiri, M. A., Adnan, A. ve Butt, B. W., 2006. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*, African Journal of Biotechnology, 5, 10, 878-882.
- Kim, H. K., Park, Y. S., Kim, H. ve Oh, T. K., 1996. Partial interfacial activation of *Proteus vulgaris* lipase overexpressed in *Escherichia coli*, Biosciences Biotechnology and Biochemistry, 60, 1365-1367.
- Kruger, N., Taipa, M. A., Barros, M. R., Melo, E. H. M., Filho, J. L. ve Cabral, J. M. S., 1997. Purification of the *Penicillium citrinum* Lipase Using AOT Reversed Micelles, J. Chem. Tech. Biotechnol., 69, 77-85.
- Lee S. Y. ve Rhee, J. S., 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK, Enzyme Microb. Technol., 15, 617-623.
- Lima, N., Teixeira, J. A. ve Mota, M., 1991. Deep agar-diffusion test for preliminary screening of lipolytic activity of fungi, Journal of Microbiological Methods, 14, 193-200.
- Liu, W. H., Beppu, T. ve Arima, K., 1973. Effect of various inhibitors on lipase action of *Humicola lanuginosa* S-38, Agric. Biol. Chem., 37, 2487-92.
- Mateos, J. C., Rodríguez, J. A., Roussos, S., Córdova, J., Abousalham, A., Carriere, F. ve Baratti, J., 2006. Lipase from thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation then liquid fermentation procedures, Enz. Microbiol. Technol., 39, 1042-1050.
- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H. ve Kondo, A., 2001. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production, Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 515-520.
- Mogensen, J. E., Sehgal, P. ve Otzen, D., 2005. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents, Biochemistry, 44, 1719-1730.

- Mohamed, M. A., Mohamed, T. M., Mohamed, S. A. ve Fahmy, A. S., 2000. Distribution of lipases in the gramineae: Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*, Bioresource Technology, 73, 227-234.
- Muderhwa, J. M., Ratomafaenina, R., Pina, M., Graille, J. ve Galzy, P., 1986. Purification and properties of the lipases from *Rhodotorula pilimanae*, Appl. Microbial Biotechnol., 28, 348-354.
- Muller, H., Austin, L. ve Posorske, J. G., 1987. Paper Presented at National AOCS Meeting, New Orleans, May, 19, 15
- Ohnishi, K., Yoshida, Y., Toita, J. ve Sekiguchi, J., 1994. Purification and Characterization of a Novel Lipolytic Enzyme from *Aspergillus oryzae*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 78, 6, 413-419.
- Okumura, S., Iwai, M. ve Tsujisaka, Y., 1981. The Effect of Reverse Action on Triglyceride Hydrolysis by Lipase, Agr. Biol. Chem., 45, 1, 185-189.
- Öner, M., 1998. Mikoloji I, 4. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 78-80.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. ve Soccol, V. T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology, Biotechnology Applied Biochemistry, 29, 119-131.
- Primentel, M. C. B., Krieger, N., Coelho, L. C. C. B., Fantana, J. O., Melo, E. H. M., Ledingham, W. M. ve Fuho, L. J., 1994. Lipase from a Brazilian Strain of *Penicillium citrinum*, Appl. Biochemistry and Biotechnology, 49, 59-74.
- Rapp, P. ve Backhaus, S., 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria, Enzyme Microb. Technol., 14, 938-943.
- Roberts, R. G., Morrison, W. H. ve Robertson, J. A., 1987. Extracellular Lipase Production by Fungi from Sunflower Seed, Mycologia, 79, 2, 265-273.
- Rúa, M. L., Díaz-Mauriño, T., Fernández, V. M., Otero, C. ve Ballesteros, A., 1993. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*, Biochimica et Biophysica Acta, 1156, 181-189.
- Safari, M., Kermasha, S., Lambourson, L. ve Sheppard, J. D., 1994. Interesterification of Butterfat by Lipase from *Rhizopus niveus* in Reverse Micellar Systems, Biosci. Biotech. Biochem., 58, 9, 1553-1557.
- Sağiroğlu, A. ve Telefoncu, A., 1993. Synthesis of stereospecific esters and resolution of racemic alcohols with immobilized lipases, Indian Journal of Chemistry, 32B, 227-233.
- Saxena, R. K., Davidson, W. S., Sheoran, A. ve Giri, B., 2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*, Process Biochemistry, 39, 239-247.
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B. ve Davidson, W. S., 2003. Purification strategies for microbial lipases, Journal of Microbiological Methods, 52, 1-18.
- Saxena, R. K., Davidson, W. S., Sheoran, A. ve Giri, B., 2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*, Process Biochemistry, 39, 239-247.

- Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S. ve Gulati, R., 1999. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry, Current Science, 77, 101-125.
- Schmid, R. D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications, Angew. Chem. Int. Ed., 37, 1608-1633.
- Scopes, K. R., 1994. Protein Purification, Principles and Practise, 3rd Edition, Springer-Verlag Inc., New York, 380 s.
- Sharma, A. K., Tiwari, R. P. ve Hoondal G. S., 2001. Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8, J. Basic Microbiol., 41, 6, 363-366.
- Sökmen, B. B., 2005. Kayısı tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Stead, D., 1986. Microbial Lipases: their characteristic, role in food spoilage and industrial uses, Journal of Dairy Research, 53, 481-505.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. ve Wieczorek, J., 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes, Enzyme Microb. Technol., 10, 492-497.
- Taipa, M. A., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. S., 1992. Purification of lipases, Journal of Biotechnology, 26, 301-311.
- Taweel, R. ve Sungur, S., 1995. Lipaz Enzimleri ile Yağların Modifikasyon Biyoteknolojisi, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara, 446 s.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları, Enzimoloji, Ed. Azmi Telefoncu, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 446 s.
- Thongekkaew, J. ve Boonchird, C., 2007. Molecular cloning and functional expression of a novel extracellular lipase from the thermotolerant yeast *Candida thermophila*, FEMS Yeast Res., 7, 232-243.
- Topal, Ş., Pembeci, C. ve Borcaklı, M., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz, Turk. J. Biol., 24, 79-93.
- Veeraragavan, K., 1990. A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity, Analytical Biochemistry, 186, 301-305.
- Voet, D. ve Voet, G. J., 2004. Biochemistry, 3rd Edition, John Wiley&Sons Inc, New Jersey, USA, 323-324,
- Wiseman, A., 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edition, John Wiley& Sons, Chicester, England, 457 s.
- Yadav, R. P., Saxena, R. K., Gupta, R. ve Davidson, S., 1998. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 28, 243-249.

ÖZGEÇMİŞ

23 Nisan 1977 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimi Ankara'da tamamladı. 2000 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 3.lük derecesi ile mezun oldu. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığı tarafından Şırnak Güçlükonak Merkez İlköğretim Okulu'na atandı. 12 Temmuz 2001 tarihinden itibaren KTÜ Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2004 yılında yüksek lisansı tamamladı. Halen Rize Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.