

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2016-YL-009

***Aspergillus niger* HBF39' DAN LİPAZ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Nilay Ezgi ÇAKAR

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Kubilay METİN

AYDIN-2016

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nilay Ezgi Çakar tarafından hazırlanan “*Aspergillus niger* HBF 39’dan lipaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu” başlıklı tez, 14/ 01/ 2016 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR	CBÜ	
Üye	: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ	
Üye	: Doç. Dr. Kubilay METİN	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../2016

Nilay Ezgi ÇAKAR

ÖZET

***Aspergillus niger* HBF 39'dan LİPAZ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Nilay Ezgi ÇAKAR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kubilay METİN

2016, 94 sayfa

Aspergillus niger HBF 39 suşundan ekstrasellüler olarak üretilen lipaz DEAE Sefaroz CL- 6B, Butyl Sefaroz 4 Fast Flow ve Q Sefaroz Fast Flow işlemleri uygulanarak %35 verimle 11 kat saflaştırılarak elde edilmiştir. SDS- PAGE de tek bant elde edilmiştir. Molekül ağırlığı 67.5 kDa olarak hesaplanmıştır. Maksimum enzim aktivitesi pH 6.0 ve 30°C ölçülmüştür. Enzimin geniş sıcaklık ve pH aralığında stabil olduğu saptanmıştır. Enzimin substratı olan pNPL (pNP- laurat) için Km değeri 49 µM ve Vmax değeri 139 U/ mL olarak hesaplanmıştır. Lipaz aktivitesi, Ba⁺², Li⁺, Na⁺ ve K⁺ katyonları tarafından aktive olurken Fe⁺³, Pb⁺², Hg⁺² katyonları tarafından inhibe olmuştur. NBS, DTT, DNTB, PMSF, CMC ve β-merkaptetanol tarafından inhibe olması bu enzimin aktif merkezinde triptofan, sistein, serin ve karboksil grubu olan amino asitlerin kataliz işleminden sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Lipaz enziminin geniş bir substrat spesifikliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Lipaz, *Aspergillus niger*, saflaştırma, karakterizasyon

ABSTRACT

PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Aspergillus niger* HBF 39

Nilay Ezgi ÇAKAR

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Kubilay METİN

2016, 94 pages

Extracellular lipase produced by *Aspergillus niger* HBF 39 was purified 11 fold with a recovery of %35 referred to lipase activity in the crude extract using, DEAE Sepharose CL- 6B, Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow of the purified enzyme gave a single stained band at a molecular mass of approximately 67.5 kDa. The temperature and pH for maximum activity of the enzyme were 30⁰C and 6.0 respectively. Km and Vmax values for pNPL of the lipase enzyme were calculated to be 49 µM and 139 U/ mL, respectively. The lipase activity was stimulated by Ba²⁺, Li⁺, Na⁺ and K⁺ cations but inhibited by Fe²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺ cations. The enzyme activity was inhibited in the presence of NBS, DTT, DNTB, PMSF, CMC ve β-mercaptoethanol. These results shows that tryptophan, serine, cysteine, and carboxyl grup residues play an important role in the catalytic process. The lipase exhibited broad substrate specificity.

Keywords: Lipase, *Aspergillus Niger*, Purification, Characterization

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamda da beni her zaman destekleyen ve çalışmalarım da her zaman beni aydınlatan, tüm bilgi birikimini benimle paylaşan, emeğini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Sayın Doç. Dr. Kubilay METİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen tüm bilgi birikimlerini benimle paylaşan Sayın Dr.Zehra Burcu BAKIR'a ve Sayın Dr. Öznur Koç'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım da bilgi birikimini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım da maddi manevi desteğini esirgemeyen Özkan ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım da bütün bilgi birikimini benimle paylaşan ön çalışmalarım da yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen canım arkadaşım Sedef SOYAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım da manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşım Zeynep ÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her alanında yanımda olan maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim anne yarım canım ablam Nurşin ATEŞ'e ve sevgili babam Rifat ÇAKAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde FEF 15010 nolu proje ile araştırmamızı destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırması Projeleri Komisyon Başkanlığına teşekkür ederim.

Nilay Ezgi ÇAKAR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELERDİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Enzim Kinetiği.....	2
1.2.1. Enzimlerin Katalizlediği Reaksiyonların Kinetiği.....	2
1.2.2. Km ve Vmax'ın Önemi.....	3
1.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	3
1.4. Mikrobiyal Enzimler.....	4
1.5. Lipaz Enzimi.....	5
1.5.1. Lipazların Özellikleri.....	5
1.5.1.1. Optimum pH.....	5
1.5.1.2. Optimum Sıcaklık.....	6
1.5.1.3. Aktivatörler ve İnhibitörler.....	6
1.6. Mikrobiyal Lipazlar.....	7
1.7. Hayvansal Lipazlar.....	8
1.8. Bitkisel Lipazlar.....	8
1.9. Uygulama Alanları.....	9
1.9.1. Tekstil Endüstrisi.....	9

1.9.2. Deterjan Endüstrisi	10
1.9.3. Yiyecek Endüstrisi	10
1.9.4. Kağıt Endüstrisi	11
1.9.5. Yağ ve Yağ Kimyası Endüstrisi	11
1.9.6. Organik Madde Sentezi	11
1.9.7. Medikal Uygulamalar	11
1.9.8. Kozmetik Endüstrisi	13
1.9.9. Biyodizel Üretimi	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	14
2.1. Lipaz Üretimi	14
2.2. Lipazın Saflaştırılması.....	14
2.3. Lipaz Enzimi Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın etkisi	16
2.4. Lipaz Enzimi Üzerine Metal İyonları, EDTA ve inhibitörlerin Etkisi	18
2.5. Lipaz Enzimi Üzerine Substrat Spesifitesinin Etkisi.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Materyaller	21
3.1.1. Kimyasallar	21
3.1.2. Mikroorganizma	21
3.2. Yöntemler	21
3.2.1. Fungustan Genomik DNA İzolasyonu	21
3.2.2. İzole Edilen Fungusların Moleküler Tanılanması	22
3.3. Aflatoksin Testi	23
3.4. Lipaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini	23
3.5. Molar Absorbans Katsayılarının Belirlenmesi	25
3.6. Protein Tayini	26
3.7. Sporulasyon Ortamının Hazırlanışı	27

3.8. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39'un Lipaz Üretimi Ortamı	28
3.9. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39' un Lipaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi.....	28
3.9.1. Lipaz Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi.....	28
3.9.2. Lipaz üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	29
3.9.3. Lipaz üretimi Üzerine pH'nın Etkisi	29
3.10. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39' un Büyüme Kinetiği	29
3.11. Lipazın Saflaştırılması.....	30
3.11.1. Diyaliz	30
3.11.2. İyon Değişim Kromatografisi (DEAE Sefaroz CL-6B).....	31
3.11.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (Butyl Sefaroz 4 Fast Flow).....	32
3.11.4. İyon Değişim Kromatografisi (Q Sefaroz Fast Flow).....	33
3.12. Elektroforez ve Zimogram	33
3.12.1. Lipazın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	33
3.12.2. Zimografi.....	36
3.12.3. Lipazın Moleküler Ağırlığının Hesaplanması	36
3.13. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39 Lipazının Karakterizasyonu	37
3.13.1. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	37
3.13.2. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	37
3.13.3. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	38
3.13.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	38
3.13.5. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	38
3.13.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi.....	38
3.13.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi	39
3.13.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1. Fungusun Moleküler Tanısı	40

4.2. Aflatoksin	41
4.3. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39'un Lipaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi.....	41
4.3.1. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi	41
4.3.2. Lipaz üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	42
4.3.3. Lipaz Üretimi Üzerine pH'ın Etkisi	43
4.3.4. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39' un Büyüme Kinetiği	45
4.4. Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Molekül Ağırlığının Tayini	47
4.5. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39 Lipazının Karakterizasyonu	56
4.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	56
4.5.2. Saf Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	60
4.5.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	63
4.5.4. Saf Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi	67
4.5.5. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	70
4.5.6. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	71
4.5.7. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi	74
4.5.8. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi.....	78
4.5.9. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	79
4.5.10. p-Nitrofenol'ün Molar Absorbans Katsayısı	81
5. SONUÇ	83
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	93

SİMGELER DİZİNİ

[S]	Substrat Konsantrasyonu
°C	Santigrad derece
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µM	Mikro Molar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Sığır Serum Albumini
CMC	Sikloheksil- N- (2-morfolionetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat
Da	Dalton
DMSO	Dimetil sülfoksil
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
FFA	Serbest Yağ Asidi
g	Yerçekimi Kuvveti
HBF	Halil Bıyık Fungus
IU	Uluslararası enzim Ünitesi
kDa	Kilo Dalton
Km	Michaelis- Menten sabitesi
L	Litre
M	Molar
NBS	N-bromo suksinamid
nm	Nanometre
ORT	Ortalama
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi

PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sp.	Tür
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametiletildiamin
vd	Ve diđerleri
Vmax	Maksimum enzim aktivitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim substratı kompleksi ve ürün oluşumu	3
Şekil 1.2. Triaçilgliserollerden lipaz hidrolizi ile gliserol ve yağ asidi eldesi.....	7
Şekil 1.3. Lipazın gerçekleştirdiği reaksiyonlar	12
Şekil 1.4. Biyodizel üretimi.....	13
Şekil 3.1. Protein standart grafiği.....	27
Şekil 4.1. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39 ITS gen bölgelerinin dizileri ile en yüksek homoloji gösteren GENBANK'daki dizilerle elde edilen neighbor joining ağacı.....	40
Şekil 4.2. Enzimin üretimi üzerine inoklüm miktarının etkisi	42
Şekil 4.3. Lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi	43
Şekil 4.4. Lipaz üretimi üzerine pH 'nın etkisi	44
Şekil 4.5. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39 'un gelişime bağlı hacimsel aktivite ve biyokütle değişimi	46
Şekil 4.6. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39'un gelişime bağlı pH ve biyokütle değişimi.	46
Şekil 4.7. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39 lipazının iyon değişim (DEAE sefaroze CL-6B) kromatografisi.....	51
Şekil 4.8. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39 lipazının hidrofobik etkileşim (Butyl 4 Fast Flow) kromatografisi.	52
Şekil 4.9. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39 lipazının iyon değişim (Q Sefaroz Fast Flow) kromatografisi	53
Şekil 4.10. (A) PAGE zımogram. (B) saflaştırma adımlarının SDS-PAGE görüntüleri.....	55
Şekil 4.11. SDS-PAGE protein standart eğrisi.....	56
Şekil 4.12. Ham enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	57
Şekil 4.13. Saf enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	58
Şekil 4.14. Saf enzim stabilitesi üzerine üzerine sıcaklığın etkisi.....	61

Şekil 4.15. Ham enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	65
Şekil 4.16. Saf enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	65
Şekil 4.17. Enzim stabilitesi üzerine pH'ın etkisi	68
Şekil 4.18. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	71
Şekil 4.19. <i>A. niger</i> HBF 39 saf lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten Grafığı)	73
Şekil 4.20. <i>A. niger</i> HBF 39 saf lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver- Burk Grafığı).....	73
Şekil 4.21. <i>A. niger</i> HBF 39 saf lipaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi	76
Şekil 4.22. <i>A. niger</i> HBF 39 enziminin lipaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatüranların etkisi.....	79
Şekil 4.23. Enzimin substrat spesifitesi	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Lipaz üreten bazı mikroorganizmaların optimum gelişim için sıcaklık ve pH değeri.....	7
Çizelge 1.2. Lipaz enziminin çeşitli uygulama alanları.	10
Çizelge 3.1. ITS bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı	22
Çizelge 3.2. Ham lipaz enzim aktivite tayini için deney bileşenleri	24
Çizelge 3.3. Optimum koşullar altında standart kantitatif lipaz tayini.....	24
Çizelge 3.4. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39 lipaz üretim ortamının içeriği	28
Çizelge 3.5. Diyaliz torbasının ön işlemden geçirilmesi.....	31
Çizelge 3.6. Yüzde 10'luk ayırma jelinin içeriği	35
Çizelge 3.7. Yüzde 4'lük yoğunlaştırma jelinin hazırlanışı	35
Çizelge 4.1. <i>Aspergillus niger</i> HBF 39'un büyüme kinetiği.....	45
Çizelge 4.2. <i>Aspergillus niger</i> lipazının saflaştırma adımları	54
Çizelge 4.3. Ham enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	59
Çizelge 4.4. Saf enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	59
Çizelge 4.5. Saf enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	62
Çizelge 4.6. Ham enzim aktivitesi üzerine pH'nin etkisi.....	66
Çizelge 4.7. Saf enzim aktivitesi üzerine pH'nin etkisi	66
Çizelge 4.8. Saf enzim stabilitesi üzerine pH'nin etkisi.....	69
Çizelge 4.9. Saf enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	70
Çizelge 4.10. Saf enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	72
Çizelge 4.11. <i>A. niger</i> HBF 39 enziminin lipaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi.....	77
Çizelge 4.12. <i>A. niger</i> HBF 39 enziminin lipaz aktivitesi üzerine inhibitör ve denatürantların etkisi.....	79
Çizelge 4.13. Enzimin substrat spesifitesi.....	81
Çizelge 4.14. pNP'ün farklı pH'lardaki molar absorpsiyon katsayıları	82

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler biyolojik makro moleküllerdir. Genel olarak yüksek katalitik aktivite, seçicilik ve özgüllük gibi özelliklere sahip proteinler olarak bilinmektedirler. Hayati önem taşıyan metabolik olaylarda yüzlerce özgül reaksiyonu yüksek katalitik aktivite ile gerçekleştirirler. Enzimleri kimyasal katalizörlerden ayıran en önemli özellik özgül olmalarıdır.

Biyokimya tarihinde geçmişten bu yana en fazla araştırma enzimler üzerine yapılmıştır. İlk yapılan çalışma midenin salgısıyla etin sindirilmesi üzerine yapılmıştır. Sonrasında tükrük enzimleri ile yapılan çalışmada nişastanın şekere dönüşümü üzerine yapılmıştır. İlerleyen yıllarda Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentasyonunu araştırmış; fermenterler tarafından bu reaksiyonun katalizlediğini gözlemlemiştir. Daha sonra bu reaksiyonun hücre dışında da devam ettiği keşfedilmiş ve Frederic W. Kühne bu molekülleri enzim olarak adlandırmıştır.

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru enzimler üzerine oldukça fazla sayıda çalışma yapılmıştır ve bu enzimlerin birçoğu saflaştırılarak aydınlatılmaya çalışmıştır (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimlerin ilk ve en önemli görevleri reaksiyonları katalizlemektir. Enzimlerin düzgün ve gerektiği kadar çalışmaları oldukça önemlidir. Çünkü enzimlerin fazla çalışması da eksikliği de birçok hastalığa neden olmaktadır.

Protein mühendisliğinin gelişmesiyle araştırmacılar hem uygun şekilde sentezlenebilen hem de laboratuvar koşullarında geliştirilebilen yeni özelliklere sahip enzimler tasarlamışlardır. Bazı enzimler yiyecek, ilaç ve kimyasal üretiminde endüstriyel alanda başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar. Enzimler aynı zamanda çevre mühendisliğinde de kullanılabilirler (An vd., 2015).

Endüstrinin hemen hemen her alanında enzimler kullanılmaktadır. Genel olarak kullanılan enzimler mikrobiyal kökenli olmaktadır. Bu enzimlerin yaklaşık olarak %75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Mikrobiyal kökenli enzimlerin kullanılma sebebi ise mikroorganizma kaynaklı enzimin hayvansal ve bitkisel

kaynaklı enzime göre kalitatif aktivitelerinin yüksek olmasıdır. Aynı zamanda mikrobiyal kaynaklı enzimler diğerlerine göre daha dayanıklı, ucuza mal edilebilen ve tek seferde çok fazla üretim sağlanabilen enzimlerdir (Kıran vd., 2006).

Son yıllarda sanayi de çok sayıda uygulama alanı bulan enzimler günümüzde daha fazla kullanım alanının ortaya çıkmasıyla daha fazla önem kazanmışlardır. Dünya çapında son 20 yıl içerisinde enzim satışlarında yüzde elli artış meydana gelmiştir. Dünya çapında enzim üretimi 12 büyük firma 400 de küçük firma tarafından sağlanmaktadır (Sharma vd., 2001a).

Mikroorganizmaların optimum üreme sıcaklıkları karşılaştırıldıklarında sırasıyla psikrofilik (20 °C altında), mezofilik (20- 55 °C) ve termofilik (55 °C üzerinde) olarak gruplandırılır. Termofilik grup daha da genişletilerek 60-80 °C arasında üreyenlere ekstratermofil, 80 °C üzerinde olanlara ise hipertermofil adı verilmiştir. Termofilik ve hipertermofilik enzimler 40 °C' nin altında aktivite göstermezler (Gomes ve Steiner., 2004). Bu proteinlerin amino asit yapıları incelendiği zaman ise glisin yerine alanin, lizin yerine arjinin amino asitlerinin mezofil organizmalara göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda hassas bir amino asit olan sistein ise bu proteinlerin yapısında az miktarda bulunmaktadır.

1.2. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği enzimlerin gerçekleştirdiği tepkimenin hızını araştırmaktadır. Enzim kinetiği sadece reaksiyonların hızıyla ilgilenmez; aynı zamanda çalışma mekanizmalarını da incelemektedir.

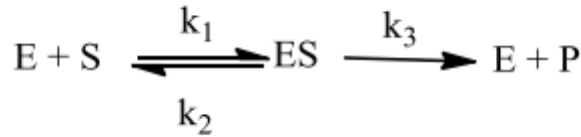
1.2.1. Enzimlerin Katalizlediği Reaksiyonların Kinetiği

Birinci derece reaksiyonlarda düşük substrat konsantrasyonlarında görülür. Substrat konsantrasyonunun artırılması sonucunda reaksiyon hızı da artış göstermektedir. Substrat konsantrasyonu daha fazla artırılmaya devam ederse reaksiyon hızı sabitlenir ve belli bir seviyede devam eder. Bu durumda enzim substratına doymuş hale gelmiştir. Bu noktada reaksiyon sıfırıncı derecededir; enzimler moleküllerinin tamamıyla bağlanmıştır.

Leoner Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonlarının ilk basamağında enzimlerin doygunluk özelliğinden yola çıkarak model bulmuşlardır. Ayrıca bu model birçok enzimin kinetik özelliğini açıklamada başarılı olmuştur.

1.2.2. K_m ve V_{max} 'ın Önemi

Enzimlerin tamamının kendine özgü K_m değeri bulunmaktadır. Bu değer 10^{-1} ile 10^{-6} M arasında yer alır. K_m değeri enzimin konsantrasyonuna bağlı değildir. Sıcaklık, pH ve iyon yüküne bağlıdır. K_m değeri bize enzimin maksimum hızın yarısına ulaşması için gerekli olan substrat konsantrasyonunu göstermektedir.



Şekil 1.1. Enzim substrat kompleksi ve ürün oluşumu.

1.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimler substratlarının veya katalizledikleri reaksiyonun tipine göre adlandırılmaktadırlar. Genellikle enzimler etki ettikleri substratın sonuna -az eki alarak adlandırılırlar. Örneğin; lipitlere etki eden enzim lipaz enzimidir.

Enzimlerin katalizlediği reaksiyona göre 6 sınıfa ayrıldığı bilinmektedir. Bunlar sırasıyla;

1. **Oksidoredüktazlar:** Elektronların aktarımı (hidrit iyonları veya H atomları) gerçekleştirirler.
2. **Transfereazlar:** Grup aktarım tepkimelerini gerçekleştirirler.
3. **Hidrolazlar:** Hidroliz tepkimelerini gerçekleştirirler yani işlevsel grupların suya salınımını sağlamakla görevlidirler.
4. **Liyazlar:** Grupların çift bağlara katılması veya grupların uzaklaşmasıyla çiftbağ oluşumunu gerçekleştirirler.

5. İzomerazlar: Molekül içi grupların aktarımı ile izomerik yapıların oluşumunu sağlarlar.

6. Ligazlar: ATP veya benzeri bileşiklerin katkılarıyla gerçekleşen kondensasyon tepkimelerinin yardımıyla C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşumunu sağlamaktadırlar.

1.4. Mikrobiyal Enzimler

Endüstride kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre yüksek aktivite göstermeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, hayvansal ve bitkisel kökenli enzimlere göre daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987).

Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmış durumdadır (Demain ve Solomon, 1981).

Dünyada enzimlerin %80'i mikrobiyal kökenlidir. Enzim elde edilen mikroorganizmalar genellikle mantarlar ve bakterilerdir. Mikrobiyal enzimlerin ticarete aktif olarak kullanılmalarının en önemli sebeplerinin başında genetik manüplasyon yapılabilmesi gelmektedir. Bu sayede sentezlenen enzim miktarı binlerce kat artırılabilir.

Ticari alanda büyük öneme sahip olan enzimlerin çoğu hidrolazlar sınıfında yer alıp mikrobiyal kökenlidirler. Bu enzimler genel olarak ekstrasellüler enzimlerdir. Birçoğu yüksek molekül ağırlığına sahip olan substratları ürüne dönüştürürler. Bugün yaklaşık 4000 enzim tanımlanmış olup, bunlardan sadece 200 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin çoğunluğu (yaklaşık %75'i) hidrolitik etkiye sahiptir. Hidrolazlar, çok geniş substrat spesifitesi gösteren bir enzim sınıfıdır. Hidrolazlar peptidleri, amidleri, halojenürleri, esterleri ve trigliseritleri hidrolizlerler. Hidrolazların iki büyük sınıfı olan lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilester hidrolazlar) endüstriyel potansiyeli yüksek olan önemli biyokatalizörlerdir. Bununla birlikte lipolitik enzimler (lipazlar ve esterazlar), hem hidroliz hem de sentez reaksiyonlarını katalizlerler (Sharma vd., 2001a).

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

1.5. Lipaz Enzimi

Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar, EC. 3.1.1.3) hidrolazlar sınıfında yer alırlar ve trigliseritlerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolizini sağlayan enzimlerdir. Suda çözünmeyen trigliseritlerin, di ve mono-açilgliseridlere, serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar hidroliz tepkimelerini gerçekleştirmesinin yanısıra bazı esterlerin transesterifikasyonu gibi esterlerin sentezini katalizleyen asimetrik seçicilik özellikleri sergilerler. Lipaz enzimlerinin özgül kimyasal transformasyonlarda örneğin biyotransformasyonlardaki rolleri onların endüstriyel alanlarda popüler olmalarını sağlamaktadır. Lipazlar bu özellikleri sayesinde yiyecek, deterjan, kimya ve ilaç endüstrisinde oldukça gözde enzimlerden biridir. Lipazlar hem sulu hem de organik çözücülerde birçok reaksiyonu gerçekleştiren en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Lipazların önemli biyokatalizörlerin başında gelmesinin sebebi, geniş bir substrat aralığının olması, aşırı sıcaklıklara, pH ve organik çözücülere ve enantiyoselektiviteye karşı kararlılık gösterebilme yetenekleri sayesinde.

1.5.1. Lipazların Özellikleri

1.5.1.1. Optimum pH

Bir enzimi ile substratı veya inhibitörü arasındaki moleküler etkileşim temelde birçok yüzey temasları ile gerçekleşmektedir. Doğadaki proteinlerde, 10-15 Å aralığındaki iç moleküler kuvvetlerin tümü elektrostatiktir. Proteinin elektrostatik etkisi ortam pH'sına bağlı olarak değişir. Enzimler fonksiyonları için, aktif pH aralığında uygun protonlanma durumuna sahip, katalitik amino asitlere ihtiyaç duyarlar. Çözücünün dielektrik sabitesi, iyonik gücü ve diğer yüklü amino asitlerin yakınlığı gibi çeşitli faktörler, bu katalitik amino asitlerin yük durumunu etkiler. pH'daki değişim katalitik amino asitlerin protonlanmış ve protonlanmamış formlarının denge konsantrasyonlarında bir değişime neden olur. Bu değişimin en belirgin sonucu, katalitik amino asitlerin ortalama yükünde bir değişim meydana getirmesidir. Bu nedenle pH, enzim aktivitesi için anahtar bir öneme sahiptir (Bakır Ateşlier Z.B., 2009).

pH değeri yükseldikçe genelde enzim aktivitesinde azalma gözlemlenmektedir. Enzimlerin en yüksek aktivite gösterdiği pH, optimum pH olarak adlandırılır. pH değeri yükseldikçe proteinlerin yapısı bozulur ve geri dönülmez hal almaktadır. Her enzim kendine özgü pH aralığına sahiptir. Bu aralık dışındaki pH'larda enzim aktivite gösterememektedir. Enzim aktivitesinin gözlemlendiği pH aralıkları hangi aminoasidin rol oynadığı konusunda bilgi vermektedir (Nelson ve Cox, 2005). Mikroorganizmaların ürettiği enzimlerin aktivite gösterdiği pH aralıkları, canlının gelişim gösterdiği ortam pH'sı ile doğrudan ilişkilidir (Çizelge 1.1).

1.5.1.2. Optimum Sıcaklık

Sıcaklık enzimatik reaksiyonların hızını artırmaktadır. Ancak, her enzimin optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık değeri vardır. Birçok enzim 50-60 °C üzerine çıktıkça aktivitesinde düşüş meydana gelmektedir. Bu durum enzimin üç boyutlu yapısının denatüre olmasından ileri gelmektedir (Nelson ve Cox, 2005). Bazı enzimler düşük sıcaklıklarda bazıları ise çok yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterirler. Bu durum enzimi üreten canlı grubunun yaşadığı çevre sıcaklığına adaptasyonu ile değişir (Çizelge 1.1).

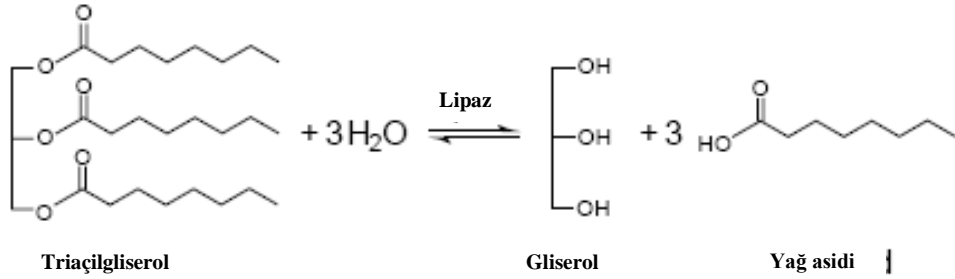
1.5.1.3. Aktivatör ve İnhibitörler

Lipaz enzimi aktivitesine iyonlar ve reaktiflerin etkilerine bakılacak olursa, ağır metal iyonları lipaz aktivitesini azaltırken alkali metallerin lipaz aktivitesini artırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir (Akoh ve Min, 1998).

Lipazlar, birçok özelliği sayesinde, günümüzde organik kimyacılar, eczacılar, biyofizikçiler, biyokimya ve biyomühendisler, biyoteknologlar, mikrobiyolog ve biyokimyacılar tarafından tercih edilen bir enzimdir. Bazı lipazlar yağ asitlerinin bulunduğu taraftan kısa zincirli yağ asitlerine bağlanma eğilimi göstermektedir. Özgül olmayan lipazlar ise yağ asitlerini trigliseridlerden rastgele ayırırken (Şekil 1.2), bazıları pozisyon spesifitesi gösterirler.

Çizelge 1.1. Lipaz üreten bazı fungusların gelişimi için optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri (Akbulut, 2014)

Kaynağı	Optimum pH	Optimum Sıcaklık
<i>Aspergillus niger</i>	5,0-7,0	30-40°C
<i>Mucor japonicus</i>	5,5-8,5	30-40°C
<i>Rhizopus delemar</i>	5,0-7,0	30-45°C
<i>Rhizopus japonicus</i>	5,0-7,5	30-45°C
<i>Penicillium cyclopium</i>	4,5-7,5	30-50°C
<i>Penicillium roqueforti</i>	6,0-8,0	25-35°C
<i>Humicola lanuginosa</i>	5,5-8,5	40-60°C
<i>Candida cylindraceae</i>	5,0-8,0	30-50°C
<i>Yarrowia lipolytica</i>	5,0-8,0	25-35°C
<i>Geotrichum candidum</i>	5,0-8,0	40-60°C
<i>Pseudomonas fragi</i>	7,0-9,0	30-55°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,0-9,5	50°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7,0-9,0	30-50°C



Şekil 1.2. Triaçilgliserollerden lipaz hidrolizi ile gliserol ve yağ asidi eldesi (Jaeger ve Reetz, 1998)

Lipaz enzimi doğada çeşitli kaynaklardan elde edilmektedir. Bunlar hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardır.

1.6. Mikrobiyal Lipazlar

Bakteriyel ve mantarlardan elde edilen lipazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. *Pseudomonas* spp. *Lactobacillus* spp. *Streptococcus faecalis* bakterileri en fazla

bilinen lipaz üreten mikroorganizmalardır. *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Aspergillus* sp. mantarları da en çok lipaz üreten mantarlardır.

Mikroorganizmalar arasında funguslar en iyi lipaz üreticisi olarak bilinmektedir ve endüstriyel alanda en çok tercih edilen mikroorganizmalar funguslardır. Özellikle yiyecek endüstrisinde oldukça fazla kullanılmaktadır. Birçok yeni lipaz üreten mikroorganizma da araştırmacılar tarafından araştırılmaktadırlar. Bazı yeni tekniklerin keşfedilmesiyle uygulamalarda yüksek spesifikiteye sahip endüstriyel alanda oldukça kullanışlı lipaz enzimleri ortaya çıkartılmıştır. Bazı temel lipaz üreticisi olan funguslar *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Candida* ve *Penicillium*'dur. *Mucor pusillus*, *Rhizopus homothallicus* ve *Aspergillus terreus* en iyi bilinen sığağa dayanıklı hücre dışı lipaz üreten funguslardır. *Mucor* sp. hücre dışı, yüksek stabiliteye sahip, alkali koşullara ve yüksek sıcaklığa dayanıklı lipaz üreticilerinden biridir.

Candida rugosa lipazı oldukça yüksek biyoteknolojik potansiyele sahiptir. *C. rugosa* lipazının çeşitli formları, farklı bilim adamı tarafından halen araştırılmaktadır. *Yarrowia lipolytica* biyokimyasal çalışmalarda oldukça önemli enzim kaynağıdır. Düşük pH'larda yüksek enzim aktivitesi göstermektedir. *Thermomyces lanuginosus* lipazı en iyi bilinen lipazlardan biridir. Deterjan üretimi ve biyoteknolojik alanlarda oldukça sık kullanılan bir organizmadır.

1.7. Hayvansal Lipazlar

Doku lipazları, sindirim sistemi lipazları ve süt lipazları olarak üç ana grupta incelenir. Doku lipazları; lipoprotein lipazı, adipoz dokusu lipazı, karaciğer lipazı olarak üç gruba, sindirim sistemi lipazları; pankreas lipazı ve incebarsak lipazı olarak iki gruba ayrılır.

1.8. Bitkisel Lipazlar

Buğday, yulaf, mısır lipazları bu grup lipazlar içinde yer almaktadır. Lipazlar kene otu tohumu (*Ricinus communis*) ve kolza tohumu (*Brassica napus*) gibi yüksek yapılı bitkilerde de bulunmaktadır (Pandey vd.,1999). Mikrobiyal lipazlardan sonra en çok bitkisel lipazlar endüstriyel alanda kullanılmaktadırlar.

1.9. Uygulama Alanları

Lipazlar endüstriyel olarak birçok alanda kullanılmaktadır (Çizelge 1.2). Endüstriyel alanda hem hayvansal hem bitkisel hem de mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar kullanılmaktadır. En fazla mikrobiyal lipazlar kullanılmaktadır.

Mikrobiyal lipazlar arasında fungal lipazlar ekstraselüler enzim ürettikleri için ilk sırada tercih edilmektedirler. Fungal lipazlar biyoteknolojik açıdan önemli enzim grupları arasında yer almaktadırlar. Çünkü çok yönlü uygulama alanına sahip olmalarının yanında oldukça kolay üretime sahiptirler. Fungal lipazlar enzimatik uygulamalarda çok yönlüdürler ve yüksek substrat spesifitesine sahiptirler. Diğer birçok endüstriyel enzim gibi lipazlar da rekombinant DNA teknolojisinde kullanılmaya başlanmıştır. Fungal lipazlar endüstriyel alanda oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Lipazlar besin üretiminde, deri, tekstil, deterjan, kağıt üretimi, medikal alanda, kozmetik sektöründe ve bunun gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

1.9.1. Tekstil Endüstrisi

Tekstil endüstrisinde lipaz enziminin önemi oldukça büyüktür. Kumaşların en iyi şekilde boyanması için lipaz enzimi boyadan kaynaklı yağın uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca deri aşınması sonucu oluşan çatlakların yok edilmesinde kullanılır. Kot ve pamuklu kumaşların şekillendirilmesinde kullanılan ticari preparatlar lipaz enzimi içermektedir. Tekstil endüstrisinde dayanıklılık, yumuşak yapıya sahip olma, leke tutmama, esneklik, makine aşınması dahil olmak üzere bir çok önemli özellik için lipaz enzimi kullanılmaktadır. Kırışıklığa karşı dirençlilik gibi de avantajı vardır.

Çizelge 1. 2. Lipaz enziminin çeşitli uygulama alanları (Akbulut 2014)

SEKTÖR	ETKİ	ÜRÜN
Ekmeççilik	Tatlandırma ve raf ömrünün uzatılmasında	Unlu mamülleri
Meşrubat	Aroma	Meşrubatlar
Kimyasal	Enentioseçicili	Kiral yapılar ve kimyasallar
Temizleme	Sentez ve hidroliz	Kimyasallar, bazı temizleme ajanlarının uzaklaştırılması
Süt	Sütteki yağın hidrolizi, peynir olgunlaştırılması tereyağının modifikasyonu	Tatlandırıcı, penir, tereyağı
Katı ve sıvı yağlar	Trans esterifikasyon	Margarin
Gıda süsleme	Kalite artırma	Mayonez, süsleme
Et ve balık	Hidroliz	Et balık ürünleri
Dericilik	Tat geliştirilmesi ve uzaklaştırılma	Deri işleme
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Sağlıklı gıda	Trans-esterifikasyon	Sağlıklı gıda ürünleri

1.9.2. Deterjan Endüstrisi

Günümüzde hidrolitik lipazlar ticari uygulama alanlarında oldukça yüksek öneme sahiptirler. Deterjan endüstrisinde kullanılan enzimler deterjanlardaki kimyasalların kullanımını azaltarak çevreye ve canlılara zararlarının azaltılmasını sağlarlar. Düşük sıcaklıklarda da çalışabildikleri için enerji tasarrufu sağlarlar. Sanayi ve ev çamaşırını yıkamada kullanılan deterjanlarda aynı zamanda bulaşık deterjanlarında içerik olarak kullanılan enzimlerden biri lipaz enzimidir. Deterjanlarda kullanılan enzimler lekeleri daha basit formlara dönüştürerek temizleyiciler tarafından uzaklaştırılmalarını kolaylaştırır. Lipazlar yağ içeren lekelerin uzaklaştırılması amacıyla deterjan içeriklerinde kullanılmaktadır. Lipazlar, trigliseritleri mono- ve digliseritler ile gliserol ve serbest yağ asitlerine dönüştürür. Oluşan bu ürünlerin hepsi başlangıç materyali olan yağdan daha çok suda çözünürler ve böylece uzaklaştırılmaları daha kolaydır (Hasan vd., 2006).

1.9.3. Yiyecek Endüstrisi

Lipazlar; besin sanayiinde gıda üretiminde biyolojik malzemelerde kullanılır. Et, süt ve süt ürünleri, meyveler, bira, sebzeler gibi gıdalarda lezzet artırıcı olarak kullanılmaktadır.

1.9.4. Kağıt Endüstrisi

Fungal lipaz enzimi kağıt endüstrisinde kağıdın beyazlatılması işleminde kullanılır. *Pseudomonas* türleri bu sanayide kullanılan funguslar arasında yer almaktadırlar. 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., 2001b).

1.9.5. Yağ ve Yağ Endüstrisi

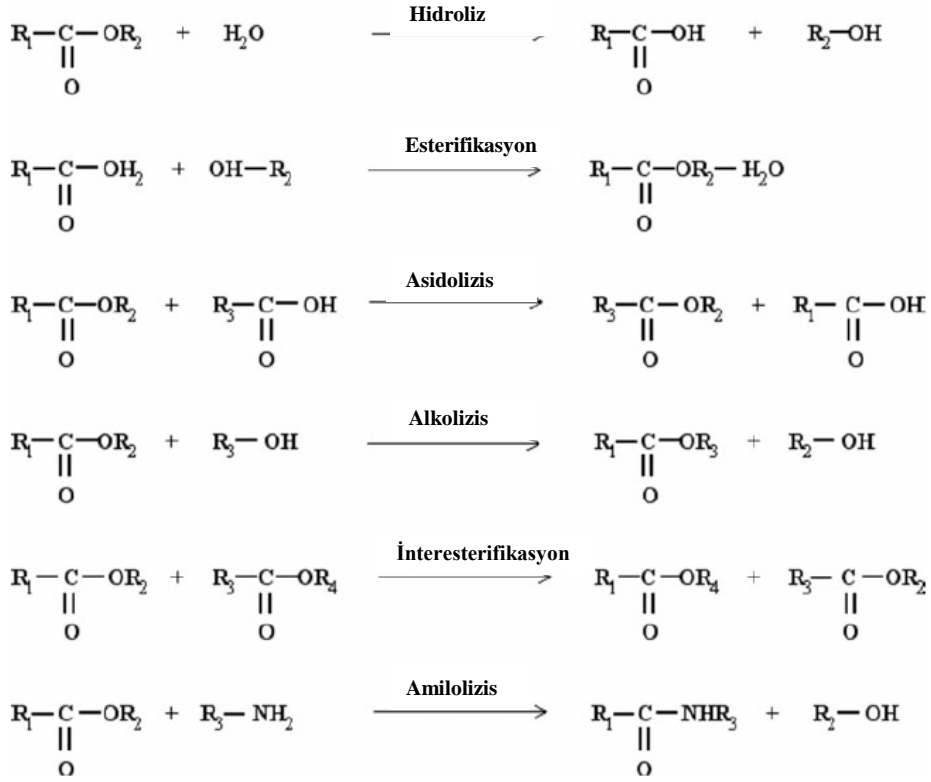
Yağ kimya endüstrisinde lipazlar hidroliz, esterifikasyon, asidolizis, alkolizis ve aminolizis işlemleri esnasında sıcaklığın korunması için kullanılmaktadır (Şekil 1.3). Lipazlar doğal olarak ester bağlarını parçalamakla görevlidir. Lipazlar doğada düşük su seviyesinde esterifikasyon reaksiyonunu katalizler.

1.9.6. Organik Madde Sentezi

Lipazlar son yıllarda organik madde sentezinde kullanılmışlardır. Genel olarak mikrobiyal lipazlar katalizör olarak seçilmektedirler. Reaksiyonda su miktarı lipazların reaksiyon yönünü belirlemektedir. Su olan reaksiyonlarda hidroliz tepkimesi meydana gelirken suyun az olduğu veya hiç olmadığı zamanlarda esterifikasyon ve transesterifikasyon tepkimesi meydana gelmektedir (Sharma vd., 2001a).

1.9.7. Medikal Uygulamalar

Yağ metabolizmasının başlıca enzimi lipaz enzimidir. Sindirime yardımcı olarak kullanılmaktadır. Birçok ilaç içeriğinde de lipaz enzimi kullanılmaktadır. Kolesterol düşürücü ilaç içeriğinde kullanılmaktadır.



Şekil 1.3. Lipazın gerçekleştirdiği reaksiyonlar (Ak vd., 2012)

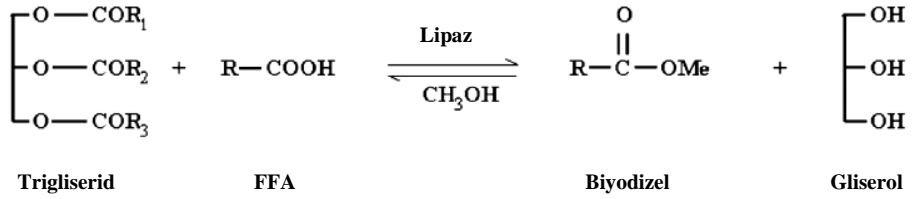
1.9.8. Kozmetik Endüstrisi

Çeşitli kişisel temizlik ürünlerinde yağların uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Sabunlar, el ve yüz kremlerinde, şampuanlarda, parfüm içeriklerinde kullanılmaktadır.

Lipazlar sürfektanlar ve aroma üretiminde de kullanılmaktadır. Sürfektanlar kozmetik endüstrisinin başlıca bileşenleridir. Kozmetikte kullanılan sürfektan monoaçilgliseroller ve diaçilgliseroller, gliserolün lipazlar tarafından katalize edilen esterifikasyon reaksiyonları sonucu oluşmaktadır (Pandey vd., 1999).

1.9.9. Biyodizel Üretimi

Enzimatik transesterifikasyon ile bitkisel yağlardan biyodizel üretimi sağlanmıştır. Fosil yakıtların elde edilmesi oldukça maliyetli ve zordur. Bu nedenle daha kolay ve ucuza mal etmek için bitkisel yağlar kullanılmaktadır.



Şekil 1.4. Biyodizel üretimi (Ak ve Mukhopodyay., 2012)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Lipaz Üretimi

Üretim ortamı olarak genel anlamda sıvı besi ortamı kullanılmaktadır. Lipaz üretim ortamı olarak besi içeriğini belirlemek için farklı çalışmalar yapılmıştır.

Aspergillus niger MTCC2594 suşu daha önceden hazırlanmış kültürlerden izole edilmiştir. Besi ortamı olarak belirlenen içerik hazırlandıktan sonra 4.3×10^8 spor hazırlanan sıvı besi ortamına ilave edilmiştir. 30 °C de 120 rpm de 48 saat çalkalamalı olarak enzim üretimi sağlanmıştır (Kambe vd., 2012).

Burkholderia multivorans'ın lipaz üretimini indükleyici olan zeytinyağı/oleik asit ve azot kaynağı olarak eklenen yeast ekstraktın lipaz üretimini maksimum oranda etkilediği bildirilmektedir (Gupta vd., 2007).

Aspergillus sp. fungusundan elde edilen lipaz enzimi üretiminde karbon kaynağı olarak zeytinyağı (% 1) (15.3 U/mL) azot kaynağı olarak pepton (% 1) (14.83 U/mL) kullanılmıştır. 30 °C de ve pH 5.5 de üretim yapılmıştır. (Cihangir ve Sarıkaya, 2004).

Maya ve fungus türlerinin üretimi için glukoz, yeast ekstrakt ve pepton kullanılmıştır. 30°C de 240 rpm de 24 saat içinde maya, 48 saat içinde mantar üretimi yapılmıştır (Ionita vd., 1996).

2.2. Lipazın Saflaştırılması

Aspergillus niger F044 lipazını, Yu ve grubu 74 kat saflaştırmışlardır. Bunu yaparken de amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, DEAE-Sepharose anyon değişim kromatografisi, sephadex G-75 jel filtrasyonu kromatografisi yöntemlerini kullanmışlardır (Yu vd., 2007).

Aspergillus niger MTCC 2594 suşundan elde edilen lipazın saflaştırma işleminde hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 35 ve 37 kDa olan 2 bant elde edilmiştir. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum koşullar ise pH 7.0 ve 37°C olarak belirlemişlerdir (Kambe vd., 2012).

Hurma bitkisinin temel mikroorganizması *Mucor hiemalis f. hiemalis* ekstrasellüler lipaz enzimi üreticisidir. Kolza yağı kullanılarak enzim 6 gün

içerisinde üretilmiştir. Elde edilen lipaz enziminin saflaştırmasında ultrafiltrasyon tekniği ile 220 kat saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat fraksiyonlaması, Sephadex G75 kromatografisi, Q-Sepharose iyon değişim kromatografisi ve Sephacryl S-200 kromatografisi kullanılmıştır. Saflaştırılmış enzimin poliakrilamid jel elektroforezi ile molekül ağırlığı 49 kDa olarak belirlenmiştir (Hiol vd., 1999).

Cryptococcus sp. S-2 lipazı ultrafiltrasyon ve SP-5PW iyon değişim kromatografisi ile 17.1 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırma sonucunda elde ettikleri enzimin SDS PAGE elektroforezi ile tek bant olduğunu gözlemlemişlerdir. Elde edilen bantın moleküler ağırlığını 22 kDa olarak belirlenmişlerdir (Kamini vd., 2000).

Ekstrasellüler elde edilen lipaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, sülfürofil sepharose kromatografisi, sephadex G-75 jel filtrasyonu kromatografisi ve ikinci kez sülfürofil sepharose kromatografisi ile 1200 kat saflıkta elde etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin aktivitesini 8800 U/mg olarak belirlenmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını 32 kDa olarak SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmişlerdir. Enzim tek bant olarak görüntülenmiştir (Hiol vd., 2000).

Aspergillus carneus lipazı 24 kat saflıkta %38 verimle elde edilmiştir. Saflaştırma basamakları olarak ilk amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan enzim hidrofobik etkileşim kolonu ile saflaştırılmıştır. Enzim kolona bağlandığı için %30'luk propanol ile enzim saf olarak elde edilmiştir (R.K. Saxena vd., 2003).

Pseudomonas fluorescens HU380 suşundan elde edilen lipaz enzimini DEAE sepharose kromatografisi ve Superdex-200HR kromatografisiyle saflaştırmışlardır. Elde edilen enzimin saflaştırma kat sayısı 24.3 ve spesifik aktivitesi 9854 U/mg olarak belirlenmişlerdir. Moleküler ağırlığını SDS PAGE jel elektroforezi ile 64 kDa olarak belirlenmişlerdir (Kojima vd., 2003).

N.rileyi ekstrasellüler lipazının saflaştırma çalışmalarında ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapmışlardır. Kolon kromatografisi olarak sephacryl S-100 HR kullanmışlardır. Saflaştırma işlemi sonunda 23.9 kat saflıkta ve 1.69 verimle saf lipaz enzimini elde etmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE yöntemiyle 81 kDa olarak belirlenmişlerdir (Supakdamrongkul vd., 2010).

Talaromyces thermophilus fungusundan elde edilen alkali lipaz enziminin saflaştırma işleminde sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanılmışlardır. 39 kDa molekül ağırlığına sahip lipaz enzimini saf olarak elde etmişlerdir (Romdhane vd., 2010).

Mucor hiemalis lipazı 12.63 kat saflaştırılarak %27.7 verimle elde edilmiştir. Saflaştırma basamakları olarak amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon kolon kromatografisi kullanılmıştır (Ülker ve Karaoğlu, 2012).

Aneurinibacillus thermoaerophilus' dan elde edilen sıcaklığa dayanıklı organik çözücülere karşı toleranslı lipaz enzimini saflaştırmak için iyon değişim kromatografisi olan Q Sefaroz ve jel filtrasyon kromatografisi olan Sephadex-G75 kolon kromatografilerini kullanmışlardır. Elde ettikleri lipaz enziminin spesifik aktivitesini 43.5 U/mg, verimini %19.7 olarak hesaplamışlardır. Enzimi 15.6 kat saf olarak elde etmişlerdir. Molekül ağırlığını 50 kDa olarak hesaplamışlardır (Masomian vd., 2012).

Staphylococcus sp. bakterisinden izole edilen lipaz enzimi 24 kat saflıkta elde edilmiştir. Saflaştırma işleminde ilk basamak olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Kolon kromatografisi olarak Sefakril S-200 kolonu kullanılmıştır. Elde edilen enzim bandının molekül ağırlığı 38kDa olarak belirlenmiştir (Daoud vd., 2013).

2.3. Lipaz Enzimi Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Mucor hiemalis f. hiemalis mikroorganizmasının optimum sıcaklığını belirlemek için reaksiyon karışımı 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 °C de inkübasyon yapılarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklığı belirlemek için enzim substrat karışımı pH 5.0 ve 9.0 arasındaki değerlerde ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada pH 7.0 da 40 °C optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir (Hiol vd., 1999).

Cryptococcus sp. S-2 lipaz enziminin en yüksek aktivitesi pH 7.0 'de ve 37 °C'de ölçülmüştür. pH 9.0 da %52.9 aktivite gözlemişlerdir. Enzimin pH 5.0- 9.0 arasında stabil olduğunu saptanmıştır. Sıcaklık 30, 40, 50, 60 °C 'de geriye kalan enzim aktivitesi sırayla %60.78, %89.7, %71.1 ve %71.1 olarak aktiviteleri belirlenmiştir (Kamini vd., 2000).

Termofilik *rhizopus oryzae* suşundan elde edilen lipaz enziminin optimum pH değerini 7.5 olarak bulmuşlardır. Lipaz enziminin pH 4.5, 7.5 aralığında aktivitesinin stabil olduğunu gözlemlemişlerdir. Optimum sıcaklığı 35 °C olarak belirlemişlerdir. 45 °C'de 30 dakika sonunda enzim aktivitesinin %65'inin korunduğunu belirtmişlerdir (Hiol vd., 2000).

A.niger NCIM 1207 suşundan elde edilen lipaz enziminin optimum pH değerini 2.5 ve optimum sıcaklığını 45 °C olarak belirlemişlerdir. Yüksek asidik pH değerlerinde enzim aktivitesinin %75'inin korunduğu gözlemlemişlerdir. Lipaz enzimi üzerine sıcaklık stabilitesi denemesinde enzim maksimum aktivitesini 45, 30 ve 50 °C'lerde gösterdiğini belirlemişlerdir. Farklı sıcaklıklarda yapmış oldukları denemelerde 5 saat boyunca 60 °C de aktivitesini kaybetmediğini gözlemlemişlerdir. Enzim 75°C de 4 saat inkübe edildiğinde ise aktivitesinin %40'ını koruduğunu gözlemlemişlerdir (Mahadik vd., 2002).

Pseudomonas fluorescens HU380 suşundan elde edilen lipaz enziminin optimum sıcaklığı ve pH değerlerini 45 °C ve pH 4.5 olarak belirlemişlerdir. Lipaz enziminin pH 6.0-7.0 değerlerinde 30 °C de 24 saat süre ile stabilitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir. 40 °C, pH 7.0 değerlerinde 0.1% Triton X-100 eklenerek 60 dakika boyunca stabilitesini korumuştur (Kojima vd., 2003).

Aspergillus carneus lipazının optimum pH değeri 9.0' dir. Sıcaklık değeri de 37 °C' dir. *A. carneus* lipazının pH 8.0 ve 10.0 değerleri arasında stabildir. Lipaz enziminin oda sıcaklığında enzim aktivitesini kaybetmediğini belirlenmiştir (Saxena vd., 2003).

N.rileyi MJ lipazının üzerine yaptıkları çalışmada optimum pH ve sıcaklık çalışmasında pH 8.0 ve sıcaklık 35 °C' dir. pH 7.0 ve 9.0 değerleri arasında ,15 ve 35 °C arasında aktivitesinin stabil olduğunu gözlemlendirdi (Supakdamrongkul vd., 2010).

Mucor hiemalis lipazı üzerine optimum pH ve sıcaklık denemelerinde optimum pH değerini 7.0 olarak, optimum sıcaklık değerini de 50 °C olarak belirlenmiştir. pH 5.0 ve 11.0 değerlerinde 24 saatlik ölçümlerde stabil olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin 30 ve 50°C arasında stabil olduğunu fakat 60-80 °C arasında aktivitesinin yarısını kaybettiğini belirlenmiştir (Ülker ve Karaoğlu, 2012).

Aneurinibacillus thermoaerophilus' dan elde edilen saf lipaz enziminin optimum pH değerini 7.0 olarak belirlemişlerdir. Enzimin 30 °C sıcaklıkta pH 4.0 ve 9.0 değerleri arasında aktivitesinin stabil olduğunu gözlemlemişlerdir. Saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığını 65 °C olarak belirlemişlerdir (Masomian vd., 2012).

Staphylococcus sp. lipazının optimum pH ve sıcaklık denemesinde pH 8.0, sıcaklık 45 °C olarak belirlemişlerdir. Enzimin pH 6.0-9.0 değerleri arasında %69 aktivitesini koruduğunu ve 45 °C sıcaklıkta 1 saat boyunca aktivitesini koruyabildiğini belirlemişlerdir (Daoud vd., 2013).

2.4. Lipaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Metal İyonları, EDTA ve İnhibitörlerin Etkisi

Cryptococcus sp. S-2 lipazının enzim aktivite üzerine 1 mM metal iyonları ve EDTA etkisine bakmışlardır. Hg²⁺ ve Cu²⁺ metal iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. EDTA enzim aktivitesine hiç etki yapmamıştır. Buldukları sonuçlara göre enzim metalloenzim değildir (Kamini vd., 2000).

Pseudomonas fluorescens HU380 mikroorganizmasından saflaştırılan lipaz enziminin Co²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺ metal iyonları tarafından inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir. EDTA ve Ca²⁺ iyonu tarafından ise aktive edildiğini belirlemişlerdir (Kojima vd., 2003).

A.carneus fungusundan elde edilen lipaz enzimi organik çözeltilerde Mg⁺, Na⁺ ve NH₄⁺ iyonlarına karşı yüksek aktivite gösterirken, SDS deterjanının yüksek inhibitör olduğunu belirlemişlerdir. Metal şelatlayıcı ajanlara karşı her hangi bir etki gözlemlememişlerdir (Saxena vd., 2003).

N.rileyi MJ lipazının enzim aktivitesi üzerine aktivite ve inhibitörlerin etkisi çalışmasında Na⁺, NH₄⁺ ve EDTA'nın enzim aktivitesini artırdığını Co²⁺, Cu²⁺ iyonları, sistein ve DTT'nin yüksek inhibisyon gösterdiğini belirlemişlerdir (Supakdamrongkul vd., 2010).

Mucor hiemalis lipazının aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinde Na⁺, K⁺, Hg²⁺ ve Cr³⁺ iyonlarının inhibe edici olduğunu; Mn²⁺ iyonunun aktive edici olduğunu gözlemlemişlerdir (Ülker ve Karaoğlu, 2012).

2.5. Lipaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Substrat Spesifitesinin Etkisi

A.carneus lipazının enzim aktivitesi üzerine substrat spesifite denemesinde p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil kaprat, p-nitrofenil laurat, p-nitrofenil miristat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil stearat, o-nitrofenil palmitat gibi çeşitli o- ve p-nitrofenil esterlerini kullanmışlardır. Bu deneme sonucunda en yüksek enzim aktivitesini p-nitrofenil laurat substratında gözlemlemişlerdir. Sonrasında en yüksekten en düşüğe doğru aktivite sıralamasında p-nitrofenil miristat ona en yakın p- nitrofenil palmitat, p- nitrofenil kaprat, p- nitrofenil asetat, p- nitrofenil stearat ve en az aktiviteyi ise o- nitrofenil palmitat substratında gözlemlemişlerdir (Saxena vd., 2003).

N.rileyi MJ lipazının p-nitrofenil laurat, p-nitrofenil palmitat ve p-nitrofenil caprat ile yapılan substrat spesifitesi çalışmasında p-nitrofenil caprat substrat olarak kullanımında, p- nitrofenil palmitata göre 10 kat daha yüksek aktivitede olduğu belirlenmiştir (Supakdamrongkul vd., 2010).

Aneurinibacillus thermoaerophilus lipazı üzerine yapılan substrat spesifitesi deneyinde doğal yağlar substrat olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmada uzun yağ asidi zincirine sahip olan yağlar kullanıldığında enzim yüksek aktivite gösterirken kısa yağ asidi zincirine sahip olan yağlarda aktivitenin az olduğunu gözlemlemişlerdir. Bunun sebebi uzun yağ asidi zincirlerinde hidrofobik alanların daha fazla olması ile açıklamışlardır (Masomian vd., 2012).

Staphylococcus sp. lipazı üzerine substrat spesifitesi denemesinde uzun zincirli ve kısa zincirli trigliseridler üzerine deneme yapmışlardır. Triton X-100 aktiviteyi inhibe ederken maksimum aktiviteyi zeytinyağı ve tributirin ile göstermiştir. Tributirinde spesifik aktivitesi 260 U/mg ve zeytin yağında spesifik aktivitesini 802 U/mg olarak belirlemişlerdir. Bu denemede elde ettikleri sonuca göre *Staphylococcus* türleri kısa zincirli yağ asitleri ile daha yüksek aktivite gösterirken uzun zincirli yağ asitlerinde aktivitede düşüş gözlemlemişlerdir (Daoud vd., 2013).

Cohnella sp. A01 bakterisinden elde edilen lipaz enzimi üzerine substrat spesifitesi denemelerinde çeşitli p-nitrofenil esterlerini kullanmışlardır. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinde p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil hekzanoat, p-nitrofenil oktanoat, p-nitrofenil dekanoat, p-nitrofenil miristat, p-nitrofenil stearat, p-

nitrofenil palmitat kullanmışlardır. En yüksek aktiviteyi p-nitrofenil bütirat ile gözlemlemişlerdir. Sırasıyla diğer yüksekten düşüğe doğru aktivite p-nitrofenil stearet, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil hekzanoat da gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar ışığında lipaz enziminin uzun ve kısa zincirli yağ asitlerinde yüksek aktivite gösterdiğini fakat orta uzunluktaki yağ asidi zincirlerinde düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Golaki vd., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar

Zeytinyağı, Tween 40 [poli (oksietilen) sorbitan monopalmitat], Tween 80 [poli(oksietilen) sorbitan monooleat], p-nitrofenil bütirat ve p-nitrofenil palmitat **Sigma** firmasından; p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil kaprilat, p-nitrofenil kaprat, p-nitrofenil laurat, fenil metil sülfonil florür (PMSF), TEMED, 1,4- dithiothreitol (DTT), N-bromo suksinamit (NBS), sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC), arabic gum, agar, pepton, skim milk ve akrilamid, N,N-metilen bisakrilamid **Fluka** firmasından; sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton X-100, NH₄Cl, AlCl₃, CuCl₂, BaCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, MgCl₂, MnCl₂, NiCl₂, NaCl, KCl, HgCl₂, PbCl₂, CoCl₂, EDTA, amonyum sülfat, amonyum persülfat, amonyum nitrat, sodyum hidroksit, p-nitrofenol, β-merkaptolanol, etanol, isopropanol, glisin ve yeast ekstrakt (maya özütü) **Merck** firmasından; Aldrich firmasından; dimetil sülfoksit (DMSO), **Panreac** firmasından; CaCl₂ ve üre, **Riedel- de Haen** firmasından; Na₂O₃Se ve LiCl sağlanmıştır.

3.1.2. Mikroorganizma

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarı fungus stoklarında bulunan, lipaz ürettiği daha önceden kalitatif olarak saptanmış olan *Aspergillus* sp. suşu, enzim üretimi için seçilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Fungusdan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için taze kültürler kullanıldı. Agar yüzeyindeki miseller steril plastik öze yardımıyla toplandı. Miseller steril Eppendorf içine alınarak, -20 °C’de bir saat bekletildi. Daha sonra miseller 55 °C’lik su banyosunda 15-20 dk bekletilerek çözüldü. Dondurma-çözme işlemi en az 2 kez tekrarlandı. En son -20 °C’de dondurulan miseller steril pestil yardımı ile ezildi. Misellerin üzerine 600 µL STE, 25 µL proteinaz K (25 mg/ml) ve 75 µL SDS (%10) eklenerek 2 saat 55 °C’lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüplere 1:1

fenol-kloroform eklenerek 5 dk alt üst edildi ve daha sonra 13.200 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Örneklerin üst fazı steril Eppendorf içine alınarak üzerlerine 1 mL % 96'lık etanol eklendi ve 2-3 kez alt üst edildi. Daha sonra 20 dk, -20 °C'de bekletilen örnekler 13.200 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra 37 °C'lik etüvde bekletilip etanol uzaklaştırıldı. Son olarak Eppendorflara 100 µL steril distile su eklenerek bir gece 37 °C'lik etüvde bekletildi (Tran-Dinh vd., 1999).

3.2.2. İzole Edilen Fungusların Moleküler Tanılanması

Tanılama işlemi için internal transcribed spacer (ITS), PCR ile çoğaltıldı. Kullanılan PCR karışımı Çizelge 3.1.'de verildi. Primer olarak ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3') tercih edilmiştir. PCR koşulları; 94 °C'de 3 dk ön denaturasyon sonrasında, 35 döngülük 94 °C'de 1 dk denaturasyon, 60 °C'de 1 dk primer bağlanma, 72 °C'de 1 dk uzamayı içermektedir. Son adım 72 °C'de 5 dakikalık final uzamayı içermektedir (Tran-Dinh vd., 1999). PCR ürünlerinden 3 µL, yükleme tamponundan da 3 µL alınarak % 5 safe view içeren % 1,5'lük agaroz jele yüklendi. DNA büyüklük standardı; 1 kb'lık (Fermentas Gene Ruler TM) kullanıldı. Jel elektroforezi 75 V, 45 dk yapıldı. PCR ürünleri sekans için Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderildi. Sekans her örnek için revers ve forward olarak yapıldı. Öncelikle Clustal W programı kullanılarak hizalandı, ardından BLAST programı kullanılarak tanısı yapıldı.

Çizelge 3.1. ITS bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı

Reaktifler (konsantrasyon)	Hacim
PCR buffer 10X1	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
Primer R (10 p/Mol)	2 µL
Primer F (10 p/Mol)	2 µL
Taq Polimeraz (5U/µL)	0.4 µL
DNA (100 ng/µL)	1 µL
Distile su	34.6 µL
Toplam hacim	50 µL

3.3. Aflatoksin Testi

Aspergillus sp. HBF 39 suşunun aflatoksin üretip üretmediği Glukoz Yeast Ekstrakt, Hg Czapek Dox Agar, ve AFPA besiyerleri kullanılarak saptandı.

Glukoz Yeast Ekstrakt; 4 g glukoz, 1 g yeast ve 4 g agar 200 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı (Yabe vd., 1987).

Hg Czapek-Dox Agar; 9.08 g Czapek-Dox agar, 0.0272 g HgCl₂, 2 g NH₄H₂PO₄ ve 0.1 mL Corn step likor 200 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı (Hara vd.,1974).

AFPA (*Aspergillus flavus-parasiticus* Agar); 9.1 g AFPA 200 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı (Pitt vd., 1983).

Hazırlanan bu ortamlara malt ekstrakt agarda spor oluşumu sağlanan stoklardan tek nokta ekimi yapıldı ve 30 °C'de 5 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kültürler UV ışığı altında incelenerek ışımaya yapan türlerin aflatoksin ürettiği kabul edildi.

3.4. Lipaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini

Lipaz aktivitesi substrat olarak p-NPL (p-nitrofenil laurat) kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Sigurgisladottir vd., 2003). p-NPL etanolde 10 mM konsantrasyonda hazırlanmış ve reaksiyon karışımına final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde eklenmiştir. Aktivite tayini enzimin optimum sıcaklık ve pH'ı belirlenmeden önce çizelge 3.2'de belirtilen koşullar altında gerçekleştirilmiş, optimum koşullar belirlendikten sonra ise çizelge 3.3'deki koşullar altında gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımlarına 0.25 mL 0.1 M Na₂CO₃ eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Karışımlar 10.000 x g'de 15 dakika santrifüjlenmiş (Heraeus-Biofuge pico, Germany) ve süpernatantların 410 nm'de köre karşı absorbanları spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japan) ölçülmüştür.

Çizelge 3.2. Ham lipaz enzim aktivite tayini için deney bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
20 mM Fosfat Tamponu (35 °C, pH 7.5)	900 µL	880 µL
Enzim çözeltisi(10mM)	0 µL	20 µL
35 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
p-NPL(p-nitrofenol laurat)	100 µL	100 µL
35 °C'de 30 dk inkübasyon		
0.1 M Na₂CO₃	250 µL	250 µL
11000 x g'de 15 dk santrifüj		
410 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü		

Çizelge 3.3. Optimum koşullar altında standart kantitatif lipaz tayini

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
20 mM Fosfat Tamponu (30 °C, pH 6.0)	900 µL	880 µL
Enzim çözeltisi	0 µL	20 µL
35 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
p-NPL	100 µL	100 µL
35 °C'de 20 dk inkübasyon		
0.1 M Na₂CO₃	250 µL	250 µL
11000 x g'de 15 dk santrifüj		
410 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü		

Bir ünite lipaz aktivitesi, reaksiyon koşulları altında dakikada pNP-laurattan 1µmol p-nitrofenol oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak belirtilmiştir.

Aktivitenin hesaplanması aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır;

$$VA = \left(\frac{V}{l \cdot \epsilon \cdot v \cdot t} \cdot A \right) \cdot SF$$

$$SA = \frac{VA}{\text{mg protein/mL}}$$

SA: spesifik aktivite (U/mg)

VA: volüm aktivite (U/mL)

V: reaksiyon hacmi (mL)

l: ışık yolu (1cm)

ϵ : molar absorbans katsayısı ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

v: örnek hacmi (mL)

t: inkübasyon zamanı (20 dk)

A: absorbans

SF: seyreltme faktörü

3.5. Molar Absorbans Katsayılarının Belirlenmesi

Paranitrofenol (p-NP)'ün farklı pH'lardaki molar absorbans katsayılarını belirlemek için ilk olarak 50 °C'lik etüvde 24 saat kurutuldu. Daha sonra pNP'ün 1 mM'lık stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden pH 5.0-9.0 arasındaki tamponlarla final konsantrasyonu 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 M olacak şekilde uygun hacimde seyreltmeler yapılarak 410 nm'de absorbanları ölçüldü. Elde edilen değerlerle absorbansa karşı konsantrasyon grafikleri çizildi ve grafiğin eğiminden molar absorbans katsayıları belirlendi.

3.6. Protein Tayini

Çalışmada yapılan protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı (Bradford, 1976). Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yüklüdür, bu durumda kırmızı renklidir ve 470 nm'de maksimum absorbands verir. Boya proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 590 nm'de maksimum absorbands verir. Bu yöntemde renk oluşumu 2 dakika sonra gerçekleşir ve 1 saat stabil kalır. Bradford yöntemine göre protein tayini yapılırken kullanılan çözeltiler ve standartlar aşağıda verildiği gibi hazırlandı.

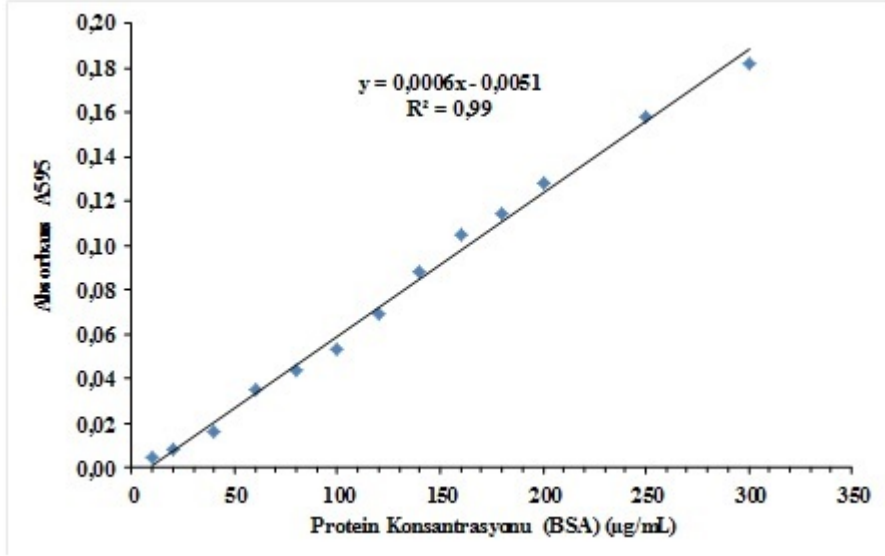
Coomassie Brilliant Blue G-250 Çözeltisinin Hazırlanışı

Coomassie Brilliant Blue G-250'nin 100 mg'ı, 50 mL %95'lik etil alkolde çözüldü. Çözelti 100 mL % 85'lik fosforik asitle karıştırıldı ve hacmi ultra saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan boya çözeltisi çözünmeyen boya kalıntılarını uzaklaştırmak için filtre kâğıdından süzüldü.

Protein Standart Grafiğinin Hazırlanışı

Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. BSA'nın 1 mg/mL'lik standart çözeltisi kullanıldı. Standart çözeltiler bu stoktan 20-200 µg/mL olacak şekilde, ultra saf su ile seyreltilerek hazırlandı.

Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 50 µL aktarıldı, köre ise 50 µL ultra saf su eklendi. Bütün tüplere 2.5 mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklendi ve karıştırıldı. İki dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve protein standart grafiği konsantrasyona karşı absorbands grafiği, linear regresyon analiziyle çizildi. Bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu, bu standart grafiğin çiziminden elde edilen denklemin formülünden hesaplandı. Grafiğin formülü $y = 0.0006x - 0.0051$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.99$ 'dur.



Şekil 3.1. Protein standart grafiği

3.7. Sporulasyon Ortamının Hazırlanışı

Aflatoksin testi sonucunda aflatoksin üretmeyen ve lipaz aktivitesi gösteren fungus olarak *Aspergillus niger* HBF 39 seçildi. Fungusun en iyi spor üretim zamanını belirlemek için malt ekstrakt agar kullanıldı. Malt agar uygun sıcaklıkta saf su ile homojen hale getirildi ve 121°C 10 dk otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan alınan malt agar yatık pozisyonda oda sıcaklığında donması beklendi. Katı hale gelen malt agara stok kültürden ekim yapıldı. Hazırlanan kültür 30 °C'de etüvde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sporulasyon ortamına % 0.1'lik steril Tween 80 ve cam bilye ilave edilerek sporların çözeltiye geçmesi için 5 dakika yavaşça karıştırıldı. Sıvı ortama geçen süspansiyonun 1 mL'si, 9 mL steril fizyolojik tuzlu suya (% 0.9 NaCl) ilave edildi. Uygun inokulum miktarını belirleyebilmek için ilk seyreltme (10^{-1}) kullanılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Her seyreltmede Thoma lamı ile mililitredeki spor sayımı yapıldı. Spor sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Mililitredeki spor sayısı} = A \times SF \times 10^4$$

A = 0.1 mm³ hacimde sayılan spor

SF = Seyreltme faktörü

10⁴ = Mililitreye çevirme çarpanı

Her seyreltmedeki spor sayısı yukarıdaki formüle göre hesaplanarak inokülasyon için uygun spor sayısını içeren seyreltme belirlendi.

3.8. *Aspergillus niger* HBF 39'un Lipaz Üretim Ortamı

Aspergillus niger HBF 39 fungusu için her yapılan denemede Çizelge 3.4'de belirtilen ortam içeriği kullanıldı. Ortam malzemeleri karıştırıldıktan sonra pH 5.5 olarak NaOH ile molaritesi ayarlanılarak yapılan denemelerde kullanıldı.

Çizelge 3.4. *Aspergillus niger* HBF 39 lipaz üretim ortamının içeriği

Kimyasal Madde	Miktarı (g/L)
NaNO ₃	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
KH ₂ PO ₄	20
Yeast ekstrakt	1
Peptone	5
Olive oil	10

3.9. *Aspergillus niger* HBF 39'un Lipaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

3.9.1. Lipaz Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

İnokulum miktarının lipaz enzimi üretimi üzerine etkisini belirlemek için, 500 mL'lik erlenlere 100 mL lipaz üretim ortamı eklendi. Daha sonra hazırlanan bu besi ortamlarına *A. niger* HBF 39 spor solusyonundan uygun seyreltmelerle 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ ve 10⁹ spor/mL olacak şekilde inokule edildi. Kültür ortamları 30

°C’de, 180 rpm’de, 10 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Excella E24, New Jersey, USA) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon boyunca kültür ortamından her gün örnek alınarak enzim aktivite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda kültür ortamı Buhner hunisinde önceden darası alınan filtre kâğıdı (Munktell, Germany) kullanılarak vakumlama yöntemiyle süzüldü. Üstte kalan pelletler cam petriye alınarak 80 °C’de, 24 saat bekletildi, elde edilen kuru ağırlıkların tartımı yapıldı.

3.9.2. Lipaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Aspergillus niger HBF 39’un en iyi lipaz üretimini gerçekleştirdiği sıcaklığı belirlemek için, 500 mL’lik erlenlere 100 mL lipaz üretim ortamı pH 5,5 olacak şekilde ayarlanarak eklendi. Hazırlanan bu besi ortamlarına *A. niger* HBF 39 spor solusyonundan 10^6 spor/mL olacak şekilde inoküle edildi. Kültür ortamları farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40 ve 50 °C), 180 rpm’de, 10 gün inkübasyona bırakıldı. Kültür ortamlarından aseptik koşullar altında her gün örnek alınarak, enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Ortamın pH değeri kayıt edildi.

3.9.3. Lipaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH’sının Etkisi

A. niger HBF 39’un en iyi lipaz ürettiği başlangıç pH’ını belirlemek için, 500 mL’lik erlenlere 30 °C’de farklı pH’larda (pH 2.0-9.0) 100 mL lipaz üretim ortamı hazırlandı. Kültür ortamlarının pH’larının hazırlanışında: pH 2.0-3.0 için 0.2 M glisin-HCl tamponu, pH 3.5-5.5 için 0.2 M sitrat tamponu, pH 6.0-7.5 için 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu ve pH 8.0-9.0 için Tris-HCl tamponu kullanıldı. Hazırlanan bu kültür ortamlarına *A. niger* HBF 39 spor solusyonundan 10^6 spor/mL olacak şekilde inoküle edildi. Kültür ortamları 180 rpm’de, 10 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince kültür ortamlarından aseptik koşullar altında her gün örnek alınarak, enzim aktivite ölçümleri yapıldı. Ortamın pH değeri kayıt edildi.

3.10. *Aspergillus niger* HBF 39’un Büyüme Kinetiği

Büyüme kinetiği, kültür koşullarının optimize edilmesinden sonra belirlenen 30 °C ve pH 5.5’da çalışıldı. *A. niger* HBF 39’un üretimi için, 100 mL lipaz üretim ortamı, 500 mL’lik 10 adet erlene eklendi. Bu besi ortamlarına *A. niger* HBF 39 spor solusyonundan 10^6 spor/mL olacak şekilde inoküle edildi. Kültür ortamları çalkalamalı inkübatörde 30 °C de, 180 rpm, 10 gün inkübasyona bırakıldı. *A. niger*

HBF 39'un büyüme kinetiğini saptamak için her gün erlenlerden bir tanesi, darası ölçülmüş filtre kâğıdı (398 nolu Filtrak, Germany) kullanılarak, Buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Darası ölçülmüş filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkanarak, 80 °C'daki etüvde 24 saat kurutuldu. Hassas terazide (Scaltec SBA 31, Germany) tartıldı ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütle (g/100 mL) hesaplandı. Ayrıca kültür ortamı süzüntüsünün günlük pH (Senso Direct pH 200, Germany), protein tayini ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. En iyi enzim aktivitesi gösteren süzüntü, enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere -20 °C da derin dondurucuda (Bosch, Germany) saklandı.

3.11. Lipazın Saflaştırılması

A. niger HBF 39 lipaz enzimi üretimi için optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon zamanı belirlendikten sonra saflaştırma işlemlerine geçildi. Optimum koşullarda (İnkübasyon zamanı 3 gün, pH 5.5 ve 30 °C) enzim üretimi yapılarak kültür ortamı süzüldü ve süzüntü enzim kaynağı olarak kullanıldı. Saflaştırma işleminde sırasıyla DEAE Sepharoz CL-6B (iyon değişim) kolonu, Butyl Sefaroz 4 Fast Flow (hidrofobik etkileşim) kolonu, Q Sefaroz Fast Flow (iyon değişim) kolon kromatografisi yapıldı. Aksi belirtilmedikçe tüm saflaştırma adımları 4 °C'de yapıldı. Tüm saflaştırma işlemleri yarı otomatize edilmiş protein saflaştırma sistemi ile yapıldı (Bio-Rad Biologic LP).

Ham ekstrakt olan ekstraselüler sıvının saflaştırma katsayısı 1 kabul edilerek ve diğer fraksiyonların spesifik aktiviteleri ham ekstrakt spesifik aktivitesine oranlanarak saflaştırma katsayıları hesaplandı. Fraksiyonların % verimlerini belirlemek için ham ekstrakt verimi 100 olarak kabul edilerek ve fraksiyonların total aktivitesi ham ekstrakt total aktivitesine oranlanarak % verimleri hesaplandı. Elde edilen veriler saflaştırma çizelgesi oluşturularak özetlendi.

3.11.1. Diyaliz

Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan tüm küçük molekülleri uzaklaştırmak için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca biyolojik moleküllere zayıf bir şekilde bağlı olan küçük iyonları ve molekülleri de bu yöntemle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür (Metin, 2007).

Ham enzim kaynağı yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) uygun uzunlukta kesildi ve tek tip gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantları gidermek için ön işleminden geçirildi (Çizelge 3.5). Diyaliz torbası ön işleminden geçirildikten sonra enzim örneği aktarıldı ve uçları klipsler yardımı ile bağlandı. Enzim için uygun tampon içinde +4 °C de 1 gece bekletilerek içeriğindeki ağır metallere, tuzdan ve iyonik olmayan moleküllerden arındırıldı. İçerisinde bulunduğu tampon diyaliz işlemi tam gerçekleştirilmesi için 2 kez değiştirildi. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcıda +4 °C de yapıldı.

Çizelge 3.5. Diyaliz torbasının ön işleminden geçirilmesi

1	%0.3'lük sodyum sülfite çözeltisinde 80 °C' de 1 dakika bekletilir.
2	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.
3	%0.2'lik sülfürik asitte 1 dakika bekletilir.
4	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.

3.11.2. İyon Değişim Kromatografisi (DEAE Sefaroz CL-6B)

İyon değişim kromatografisi proteinlerin elektrik yüküne bağlı olarak ayrılmasını sağlayan ve protein saflaştırma işlemlerinde çok sık kullanılan önemli bir tekniktir. Bu metotta pozitif veya negatif yüke sahip maddelerin elde edilmesi sağlanır. Sabit faz yüzeyinde ya pozitif ya da negatif yüklü gruplar bulunur. Eğer pozitif yüklü olanların elde edilmesi isteniyorsa, numune katyon değiştiren kolona uygulanmalıdır. Bu halde nötr ve negatif yüklü olanlar mobil fazda kalırlar ve pozitif yüklü olanlar sabit faza bağlanırlar. Aksine negatif yüklü olanların elde edilmesi gerekiyorsa, bu kez bir anyon değiştiricisi kolona ilave edilir. Böylece nötr ve pozitif olanlar, hareketli fazla kolondan geçip atılırlar. Sabit faza bağlanmış olan türler, hareketli fazdaki iyon yoğunluğu artırılarak veya pH değiştirilerek kolondan ayrılırlar.

İyon değişim kromatografisi için, negatif yüklü proteinlerin saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak pozitif yüke sahip DEAE sefaroz CL-6B (35 mL yatak hacimli, 2.5x10 cm, Biorad, USA) kullanıldı. Diyaliz sonrası elde edilen diyalizat, 20 mM fosfat (pH 7.5, 4 °C) tamponu ile dengeye getirilen DEAE sepharoz CL-6B kolonuna yüklendi. Daha sonra, kolon 120 mL/saat akış hızında aynı tampon ile yıkanarak bağlanmayan proteinlerin kolondan çıkması sağlandı.

Bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırıldıktan sonra kolona 0 M'dan 1.0 M'a kadar artan NaCl linear tuz gradienti uygulanarak kolona bağlı proteinlerin çıkması sağlandı. Kolondan çıkan örnekler 5'er mL'lik fraksiyon hacimlerinde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı 280 nm'deki absorbans değişimi ile izlendi. Protein içeren fraksiyonlar alınarak standart deney koşullarda (pH 7.5, 30 °C) aktivite tayini yapıldı ve yüksek aktivitenin gözlemlendiği fraksiyonlar toplanılarak birleştirildi ve bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımında kullanıldı.

3.11.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (Butyl Sefaroz 4 Fast Flow)

Hidrofobik etkileşim kromatografisi protein moleküllerinin hidrofobik grupları ile durgun faz arasındaki hidrofobik etkileşime dayanır. Durgun faz hidrofilik bir polimere (dekstran veya agaroz) bağlı küçük non-polar grupları (butil, oktil veya fenil) içermektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ilgili proteinin bulunduğu fraksiyon yüksek tuz derişimi içeren tampon içerisinde (genellikle amonyum sülfat) kolona yüklenir. Bağlı proteinlerin kolondan uzaklaştırılması ise tampondaki tuz derişimi azaltılarak yapılır. Yani ters tuz gradienti oluşturularak yıkama yapılır. Bu yöntem özellikle amonyum sülfat gibi tuzlarla yapılan çöktürmeden sonra proteinlerin daha ileri saflaştırılması için idealdir (Metin vd., 2007).

Hidrofobik etkileşim kolonu olarak Butyl Sefaroz 4 Fast Flow kolonu (10 mL yatak hacimli, 1x10 cm, Biorad, USA) kullanıldı. Kolon ilk olarak 2.5 M NaCl içeren 20 mM fosfat (pH 7.5, 4 °C) tamponu ile yıkanarak denge durumuna getirildi. Kolonda tampon akış hızı 120 mL/saat olacak şekilde ayarlandı. DEAE sefaroz CL-6B kolonundan elde edilen enzim örneğine 2.5 M NaCl eklenerek örnek kolona yüklenecek duruma hazırlandı. Daha sonra örnek kolona yüklendi. 2.5 M NaCl içeren 20 mM fosfat (pH 7.5, 4 °C) tamponu ile yıkama yapılarak bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması sağlandı. Kolondan çıkan örnekler 5'er mL'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı 280 nm absorbansdaki değişim ile izlendi. Kolon yıkama işlemine 280 nm'de absorbans düşene kadar devam edildi. Daha sonra kolona 2.5 M'dan 0 M'a kadar azalan NaCl ile ters tuz gradienti uygulandı. Enzim Butyl kolonuna oldukça sıkı bağlandığı için gradientin bitiminin hemen ardından, kolona bağlı olduğu düşünülen proteinimizin kolondan çıkması için %30 izopropanol ile yıkandı. Elde edilen fraksiyonlarda enzim aktivite ölçümleri standart deney koşullarında yapıldı. Enzim izopropanolden arındırmak için 20 mM fosfat (pH 7.5, 4 °C) tamponu 1

gece diyaliz işlemine bırakıldı ve bir sonraki işlem olan Q Sefaroz Fast Flow kolonu için hazır hale getirildi.

3.11.4. İyon Değişim Kromatografisi (Q Sefaroz Fast Flow)

Son adımda, negatif yüklü proteinlerin saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak pozitif yüke sahip Q Sefaroz Fast Flow (10 mL yatak hacimli, 1 x10 cm, Biorad, USA) kullanıldı. Diyaliz sonrası elde edilen diyalizat, 20 mM fosfat (pH 7.5, 4 °C) tamponu ile dengeye getirilen Q Sefaroz Fast Flow kolonuna yüklendi. Daha sonra, kolon 120 mL/saat akış hızında aynı tampon ile yıkanarak bağlanmayan proteinlerin kolondan çıkması sağlandı. Bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırıldıktan sonra kolona 0 M'dan 0.5 M'a kadar artan NaCl linear tuz gradienti uygulanarak kolona bağlı proteinlerin çıkması sağlandı. Kolondan çıkan örnekler 5'er mL'lik fraksiyon hacimlerinde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı 280 nm'deki absorbans değişimi ile izlendi. Protein çıkışının gözlemlendiği fraksiyonlar alınarak standart deney koşullarında (pH 7.5, 30 °C) aktivite tayini yapıldı ve yüksek aktivitenin ölçüldüğü fraksiyonlar toplanarak birleştirildi ve karakterizasyon çalışmalarında saf enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere ayrıldı.

3.12. Elektroferez ve Zimografi

3.12.1. Lipazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonların saflığı ve enzimin molekül ağırlığı Laemmli yöntemine (1970) göre PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile tayin edildi. Standart olarak domuz miyozini (200.000 Da), *E. coli*'den β -galaktozidaz (116.000 Da), tavşan kasından fosforilaz B (97.400 Da), sığır serum albumini (66.000 Da), yumurta albumini (45.000 Da) ve sığır eritrositinden karbonik anhidraz (29.000 Da) kullanıldı. Lipazın görüntülenmesi için PAGE kullanılarak zimogram yapıldı. SDS-PAGE, PAGE (Laemmli, 1970) aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

PAGE ve SDS-PAGE İçin Gerekli Çözeltiler

Yüzde 30'luk akrilamid/N,N'-metilenbisakrilamid stok çözeltisi: 30 g akrilamid ve 0.8 g N,N'-metilenbisakrilamid 100 mL ultra saf suda çözüldü. Hazırlanan çözelti koyu renkli şişede ve 4 °C'de saklandı.

Ayırma tamponu (separating tamponu): 1.5 M Tris-HCl hazırlandıktan sonra, konsantre HCl kullanılarak pH'ı 8.8'e ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yoğunlaştırma tamponu (Stacking tamponu): 0.5 M Tris-HCl hazırlandıktan sonra pH'ı 6.8'e ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Amonyum persülfat: % 10'luk amonyum persülfat ultra saf su içerisinde taze olarak hazırlandı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS): % 10'luk SDS ultra saf su içerisinde yavaş yavaş karıştırılarak hazırlandı.

Örnek tamponu: 0.6 M Tris-baz (pH 6.8) 5 mL, SDS 0.5 g, sukroz 5.0 g, β -merkaptotanol'den 0.25 mL ve % 0.5'lik stok brom fenol mavisi çözeltisinden 5 mL alınarak karıştırıldı ve hacmi ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. PAGE için hazırlanan yükleme tamponunda SDS ve β -merkaptotanol kullanılmadı. Örnek tamponu kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı. β -merkaptotanol'ün etkisi zamanla kaybolduğundan gerektiği zaman hazırlanan tampona aynı oranda ilave edildi.

Elektroforez tamponu (Yürütme tamponu): 3 g Tris-baz ve 14.4 g glisin ve 1 g SDS karıştırılarak hacmi ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanarak HCl ile pH'ı 8.3'e ayarlandı. PAGE için hazırlanan elektrot tamponunda SDS kullanılmamıştır. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklandı. Tampon 2-3 kez kullanıldıktan sonra yenilendi.

Coomassie Blue G-250 Çözeltisi: Commasie blue boyadan 100 mg, önce 200 mL metanol (% 50) içinde çözüldü, daha sonra 35 mL asetik asit (% 10) ilave edilerek, ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Yıkama Çözeltisi: % 10 metanol ve % 7 asetik asit çözeltisinden oluşmaktadır.

Jelin Hazırlanışı: Protein kontaminasyonunu ve her türlü kirliliği önlemek için bütün işlemler pudrasız eldiven giyilerek yapıldı. Elektroforez camları % 70'lik etanolle üzerinde toz zerreciği kalmayacak şekilde temizlendikten sonra jelin sızmasını önlemek için standına yerleştirildi. Cam levhalar arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, hava kabarcığı kalmayacak şekilde degaze edilmiş % 10'lik ayırma jeli, TEMED ve amonyum persülfat ilave edildikten sonra

karıştırıldı. Hazırlanan jel mini elektroforez (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, U.S) camları arasına döküldü. Ayırma jelinin içeriği Çizelge 3.6'de verildi.

Jelin havayla temasını kesmek için, üzeri % 70'lik etanolla kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat bekletildi. Süre sonunda ayırma jelinin üzerindeki alkol kurutma kâğıdı ile jele temas etmeden yavaş yavaş alındı ve üzerine % 4'lük yoğunlaştırma jeli döküldü. Tarak, jelle arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jele yerleştirildi ve polimerleşmesi için 1-2 saat beklendi. Yoğunlaştırma jelinin içeriği Çizelge 3.7'de verildi.

Çizelge 3.6. Yüzde 10'luk ayırma jelinin içeriği

Jelin İçeriği	Miktar (mL)
Distile su	2.26
Ayırma tamponu (pH 8.8)	1.0
% 30'luk akrilamid/bis akrilamid	1.66
% 10' luk SDS (SDS-PAGE için)	0.05
% 10'luk amonyum persülfat	0.025
TEMED	0.00175

Çizelge 3.7. Yüzde 4'lük yoğunlaştırma jelinin içeriği

Jelin İçeriği	Miktar (mL)
Distile su	1.875
Yoğunlaştırma tamponu (pH 8.8)	0.25
% 30'luk akrilamid/bis akrilamid	0.3375
% 10' luk SDS (SDS-PAGE için)	0.025
% 10'luk amonyum persülfat	0.0125
TEMED	0.0035

Örneklerin Hazırlanışı ve Jele Uygulanışı

Jele uygulanacak örnekler ve standart, örnek tamponuyla uygun seyreltmeleri yapıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. (PAGE için örnekler kaynatılmadı). Tarak jele zarar vermeden çekildi ve jel elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen jel uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklar elektroforez tamponu ile dolduruldu ve uygun seyreltmeleri yapılan örneklerden 15 µL

yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde elektroforez tamponu eklendi. Güç kaynağı (UVP, Germany) ile 200 V 20 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayırma işlemi yapıldı.

Jelin Boyanması

Cam plaklar arasından çıkarılan jelden üst jel ayrıldı. Boyanın aldığı yol elektronik kumpasla ölçüldükten sonra, protein boyaması yapıldı. Coomassie Blue G-250 çözeltisi ile 2 saat 110 rpm'de çalkalanarak boyandı. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile 110 rpm' de yıkanarak uzaklaştırıldı ve bantlar görünür hale geldi.

3.12.2. Zimografi

PAGE jelinde örnekler yürütüldükten sonra jel çıkartıldı. İlk olarak 20 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ile yıkandı. Yıkama işlemi yapılırken tribütirin agar hazırlandı. Bunun için %1 tribütirin, 20 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, %0.5 gum arabic, 50 mM fosfat (pH 6.0) tamponundan oluşan karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım bıçaklı homojenizatörde (T25 basic IKA LABORTECHNIK) 3 dakika emülsifiye edildi. Daha sonra bu çözelti üzerine %1.5 agar eklendi. Bu agarlı çözelti mikrodalga fırında tamamen homojenize edildi ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Oda sıcaklığına gelen bu çözelti, petri kabına konulan yıkamadan çıkan jel üzerine döküldü ve 35 °C' de etüvde inkübasyona bırakıldı. Şeffaf bant oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

3.12.3. Lipazın Molekül Ağırlığının Hesaplanması

Elektroforez sonrasında SDS-PAGE sonuçları incelenerek lipaz bandı belirlenmiştir. SDS-PAGE jelinde boyanın, standartların ve enzimin kat ettikleri mesafeler elektronik kumpas (Mitutoyo, CD-15CP, U.K.) yardımı ile ölçülmüştür. Standartların ve enzimin R_f değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$R_f = \frac{\text{örneğin aldığı yol}}{\text{boyanın aldığı yol}}$$

Daha sonra standartların molekül ağırlıklarının logaritması alınmış ve R_f değerlerine karşı grafik çizilmiştir. Elde edilen standart grafiğin denkleminde yararlanılarak enzimin molekül ağırlığı saptanmıştır.

3.13. *Aspergillus niger* HBF 39 Lipazının Karakterizasyonu

3.13.1. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için elde edilen ham enzim ve saf enzim de 5-60 °C arasında 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Ham enzim için 0.2 M pH 7.5 fosfat tamponu, saf enzim için 0.2 M pH 6.0 fosfat tamponu kullanıldı. Enzim aktivitesi sadece sıcaklık parametresi değiştirilerek standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Volüm aktiviteyi hesaplanarak grafiği hazırlandı.

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık stabilitesini belirlemek için 4, 20, 30 ve 40 °C' de pH 6.0 olacak şekilde farklı zaman aralıklarında 24 saat boyunca enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her sıcaklık için 0. saatteki enzim aktiviteyi 100 olarak kabul edildi ve geri kalan aktiviteyi % değer olarak hesaplandı.

3.13.2. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için pH 1.0-9.0 arasındaki değerlerde 0.5 birim aralıklarla tampon çözeltiler hazırlandı. pH 1.0-3.0 için 0.2 M glisin-HCl tamponu, pH 3.5-5.5 için 0.2 M sitrat tamponu, pH 6.0-7.5 için 0.2 M fosfat tamponu ve pH 8.0-9.0 için Tris-HCl tamponu kullanıldı. Hazırlanan tamponların sıcaklıkları ham enzim için 35 °C, saf enzim için 30 °C olarak ayarlandı. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Volüm aktiviteyi hesaplanarak grafiği çizildi.

Enzim aktivitesi üzerine pH stabilitesinin etkisini belirlemek için pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 değerlerinde tamponlar hazırlanmıştır. Hazırlanan tamponlarla 20 kat seyreltilen enzim 30 °C deki sıcak su banyosunda 24 saat boyunca inkübe edildi. Farklı zaman aralıklarının da örnek alınarak enzim aktivitesi ölçümü standart deney koşullarında yapıldı. Her pH için 0. saatteki enzim aktiviteyi 100 olarak kabul edildi ve geri kalan aktiviteyi % değer olarak hesaplandı.

3.13.3. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini incelemek için optimum deney koşulları olan pH 7.5, 35 °C de ve sabit substrat konsantrasyonunda ham enzim farklı zaman aralıklarında inkübe edildi. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Volüm aktivitesi hesaplanarak grafiği çizildi.

3.13.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi optimum sıcaklık ve pH'da (30 °C ve pH 6.0), sabit inkübasyon süresinde (20 dk) ve farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 µM p-NPL) substrat kullanılarak enzim aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi sonucu belirlendi. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı.

3.13.5. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Enzimin yapay substratlara karşı spesifitesini belirlemek için pNP asetat (C2), pNP butirat (C4), pNP kaprilat (C8), pNP kaprat (C10), pNP laurat (C12), pNP palmitate (C18) kullanıldı. Etanol içinde 10 mM stok çözeltiler hazırlandı. Substratların final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde deney ortamına eklenerek enzim aktivitesi standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak ölçüldü.

pNPP için, 10 mM p-nitrofenil palmitat (pNPP) final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde % 0.4 Triton X-100 ve % 0.1 Gum arabic içeren 20 mM pH 6.0 fosfat tamponuna eklendi ve 5 dakika sonike edildi. Enzim çözeltisi bu tampon çözeltisinde 30 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler -20 °C'de 10 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuş. Örneklerin 410 nm'de enzimsiz körlerine karşı absorbanları okunmuştur. Reaksiyon durdurma işleminin standart Na_2CO_3 eklemek yerine, -20 °C'de bekletilerek yapılmasının nedeni pNPP'ın Na_2CO_3 ile bozularak kendiliğinden sararmasıdır.

3.13.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi

İnhibe edici ajanlar ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan fenil metil sülfonil florit (**PMSE**); SH-grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan **β -merkaptolanol**; SH-grubu ve disülfid

grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan 1,4- dithiothreitol (**DTT**); sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksidasyon ajanı olan 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (**DTNB**); triptofan inhibitörü olan N-bromo suksinamid (**NBS**); karboksil grubu inhibitörü olan sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (**CMC**); protein denatürantı olan **üre** ve sodyum dodesil sülfat (**SDS**) kullanıldı.

İnhibitörlerin 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. PMSF; n-propanolde, DTNB; 0.1 M NaOH de ve diğerler inhibitörler ise ultrasaf suda çözüldü. Deney ortamına final konsantrasyonu 1 ve 5 mM olacak şekilde eklendi ve standart koşullarda aktiviteyi tayin edildi. Hiçbir inhibitör veya denatürant içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edildi. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

3.13.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için $AlCl_3$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $HgCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$, KCl , $LiCl$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $NaCl$, NH_4Cl , $NiCl_2$, $PbCl_2$, $ZnCl_2$ ve EDTA kullanıldı. Metal iyonları 100 mM stok çözeltilerinden final konsantrasyonu 1, 5 ve 10 mM olacak şekilde deney ortamlarına eklendi. Hiçbir metal içermeyen deney ortamı, kontrol olarak kabul edildi. Standart koşullarda aktivite tayini yapıldı. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

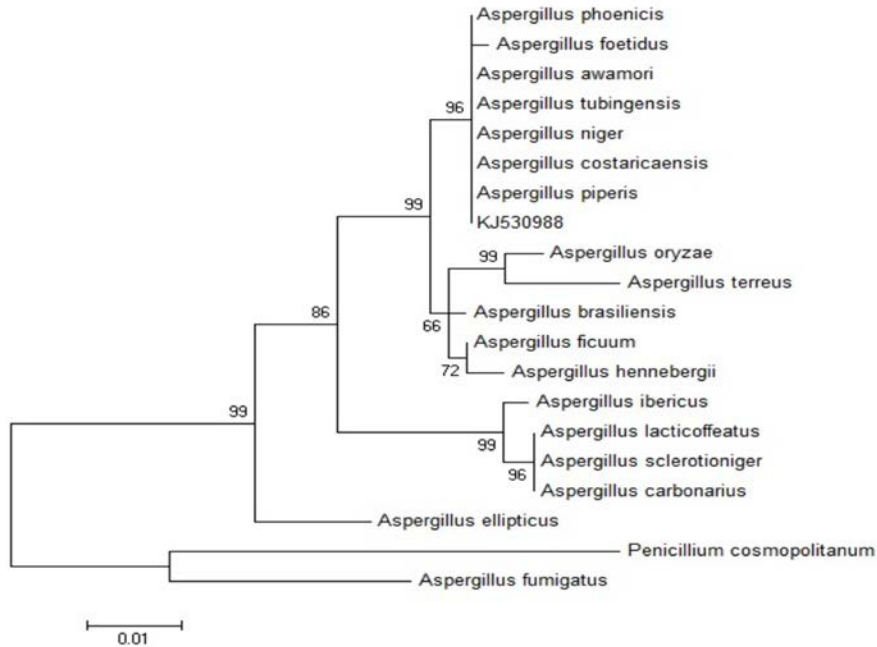
3.13.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Protein derişimi, V_{max} ve K_m değerleri lineer regresyon analizi ile saptandı (STATISTICA 7.0). Her deney üç tekrar üzerinden yapıldı. Gruplar arasındaki farkın ve bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (Tukey ve Duncan Testi) yapıldı. (STATISTICA 7.0) Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde eşlenmiş örneklerde t-testi uygulandı (STATISTICA 7.0).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fungusun Moleküler Tanısı

Morfolojik olarak tanımlaması yapılan *Aspergillus niger* HBF 39 suşunun ITS gen bölgesi PCR yöntemiyle çoğaltılarak elde edilen ekstraktlar sekans için MacroGen (Güney Kore) firmasına gönderildi. Gelen sekans sonuçları Clustal W programı kullanılarak hizalaması yapıldı. Hizalanan sekans dizisi www.pubmed.com adresinde yer alan nükleotid blast programı ile veri tabanında yer alan ITS dizileri ile karşılaştırılarak veri tabanında bulunan tür tanısı yapılmış funguslar arasında en yüksek benzerlik oranı *Aspergillus niger* olarak saptandı (Şekil 4.1). Nükleotid blast programında elde edilen diziler ile neighbor joining ağacı elde edildi. Bu ağaca göre *Aspergillus niger* fungusunun da içinde bulunduğu grupta HBF 39 suşunun yer aldığı gözlenerek daha önce yapılan morfolojik tanı desteklenmiştir. *Aspergillus niger* HBF 39 izolatu için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html> adresinde bulunan Sequin proramı kullanılarak Genbank'tan KJ530988 kayıt numarası alındı.



Şekil 4.1. *Aspergillus niger* HBF 39 ITS gen bölgesinin dizileri ile en yüksek homoloji gösteren GENBANK' daki dizilerle elde edilmiş neighbor joining ağacı

4.2. Aflatoksin

A. niger HBF 39 fungusunun aflatoksin pozitif olup olmadığı Hg Czapek Dox Agar, glukoz yeast ekstrakt ve AFPA besiyerleri kullanılarak saptandı. Hazırlanan bu ortamlara malt ekstrakt agarda spor oluşumu sağlanan stokdan tek nokta ekimi yapıldı ve 30 °C’de 5 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kültürler UV ışığı altında incelenerek ışımaya yapıp yapmadığına bakıldı. *A. niger* HBF 39’un UV ışığı altında ışımaya vermemesi dolayısıyla aflatoksin üretmediği saptandı. Bu sonuç, araştırmamıza konu olan fungusun endüstriyel çalışmalarda güvenli bir şekilde kullanılabileceğini gösterdi.

4.3. *Aspergillus niger* HBF 39’un Lipaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

Enzim üretimi için kullanılan mikroorganizmaların geliştirilmesinde enzim üretme kapasitelerinin taranması, besiyeri formülasyonu ve kültür koşullarının değerlendirilmesi önemli bir adımdır (Singh ve Satyanarayana, 2008). Kültür koşullarının optimizasyonunda amaç, sadece mikroorganizmanın en iyi gelişiminin ve enzim üretiminin gerçekleştiği sıcaklık ve pH’ın belirlenmesi değil; aynı zamanda enzimin ortama salındıktan sonra stabil olduğu sıcaklık ve pH’ın belirlenmesidir.

4.3.1. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

İnokulum miktarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için, 100 mL lipaz üretim ortamı içeren 500 mL’lik erlenlere, uygun seyreltmelerden 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 ve 10^9 spor/mL olacak şekilde inokule edildi. Her bir seyreltmenin pH değerine bakıldı ve enzim aktivitesi ölçüldü. İnkübasyon sonunda kuru ağırlıkları ölçülerek en uygun seyreltme belirlendi. Bu çalışma sonunda en uygun seyreltme 10^6 spor/mL olarak belirlendi.

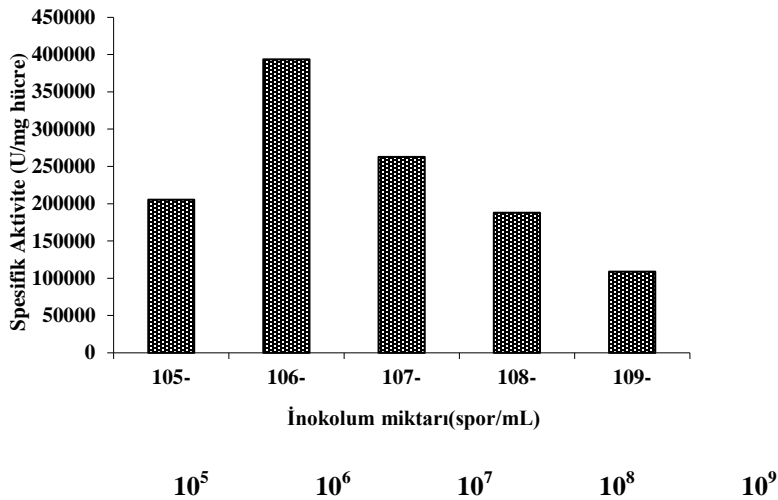
Yapılan çalışmada inokülasyon miktarı arttıkça hücrelerde gelişimin gerilediği gözlemlendi. En ideal hücre gelişiminin olduğu ve en yüksek aktivitenin gözlemlendiği seyreltme 10^6 spor/mL ideal seyreltme olarak belirlendi.

10^9 spor/mL seyreltmede hücre gelişimi yok denecek kadar az olduğu gözlemlendi. 10^8 , 10^7 spor/mL hücre sayısı fazla olmasına rağmen enzim

aktivitesinin 10^6 spor/mL seyreltmeye göre daha düşük olduğu belirlendi (Şekil4.2).

Aspergillus niger MTCC2594 suşu daha önceden hazırladıkları kültürlerden izole edilmiştir. Besi ortamı olarak belirlenen içerik hazırlandıktan sonra 4.3×10^8 spor hazırlanan sıvı besi ortamına ilave edilmiştir. 30 °C de 120 rpm de 48 saat çalkalamalı olarak enzim üretimi sağlanmıştır (Kambe vd., 2011).

Aspergillus niger NCIM 1207 (Nutan D. vd., 2003) suşu bizim çalışmamızda olduğu gibi 10^6 spor/mL spor kullanarak üretim yapmışlardır.



Şekil 4.2. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

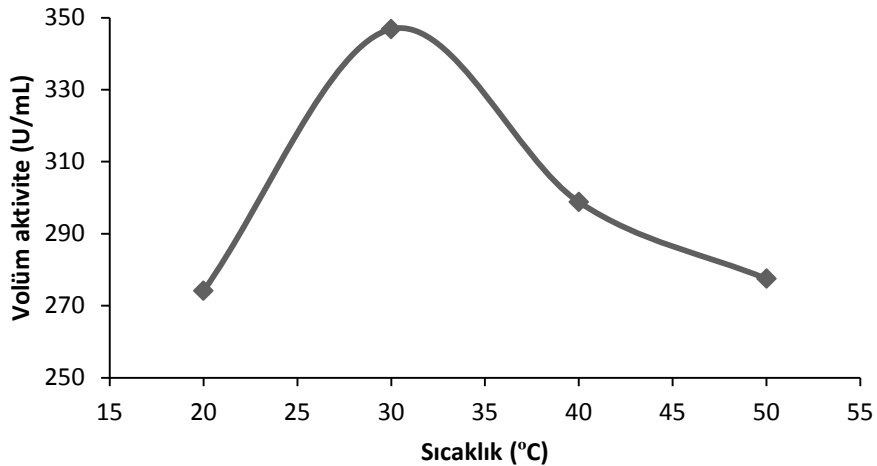
4.3.2. Lipaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

A. niger HBF 39'un en iyi lipaz üretimini gerçekleştirdiği sıcaklığı belirlemek için, 500 mL'lik erlene 100 mL 20, 30, 40 ve 50 °C'de pH'ı 5.5 olacak şekilde hazırlanan lipaz üretim ortamı eklendi. *A. niger* HBF 39 spor solusyonundan 10^6 spor/mL olacak şekilde kültür ortamına inoküle edildi ve 180 rpm'de, 10 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları, ortamın pH'sı ve lipaz aktiviteleri tayin edildi. *A. niger* HBF 39'un en iyi gelişimini ve enzim üretimini gerçekleştirdiği sıcaklık 30 °C olarak belirlendi (Şekil 4.3).

Çalışmamızda 50 °C’de az da olsa enzim aktivitesi gözlemlendi. Fakat en iyi gelişim ve enzim aktivitesi 30 °C de gözlemlendi. Bu durum mikroorganizmamızın mezofilik bir mikroorganizma olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık bir organizmanın büyüme miktarını tayin eden önemli bir faktördür. Funguslarla yapılan çalışmalarda gelişme sıcaklığının 25-60 °C arasında değiştiği belirtilmiştir (Akbulut, 2014). Ancak, mezofilik mantarların optimum gelişme sıcaklığı 25-30 °C arasındadır (Kaşık, 2010).

N. rileyi MJ suşundan lipaz üretimi için pH 8.0 değerinde ayarlanan besi ortamına inoküle edilen sporlar çalkalamalı inkübatörde 150 rpm de 8 gün boyunca 25 °C de gelişim gösterdiği saptanmıştır (Spakdamrongkul vd., 2010).



Şekil 4.3. Lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

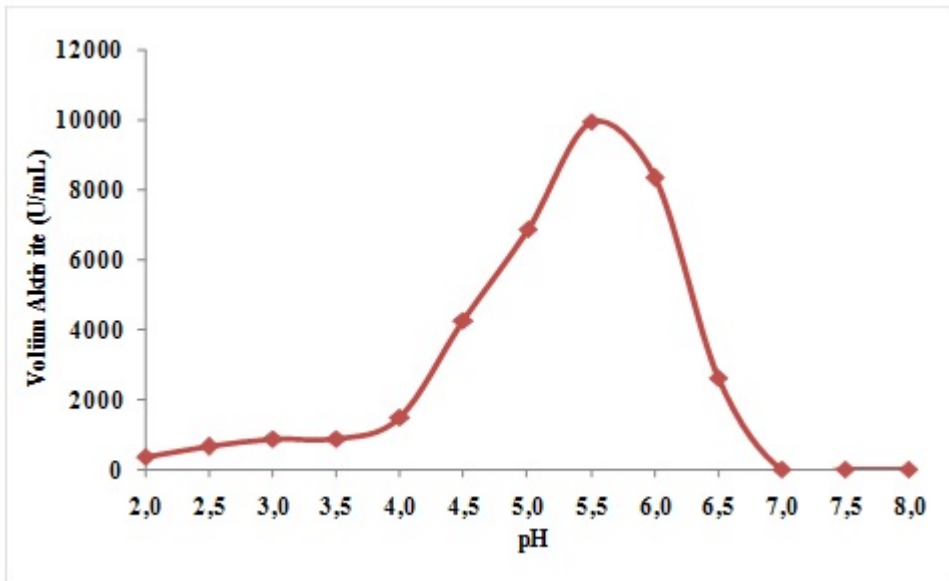
4.3.3. Lipaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH’sının Etkisi

A. niger HBF 39’un maksimum lipaz enzimi ürettiği başlangıç pH’sını belirlemek için, 500 mL’lik erlenlere farklı pH’larda (pH 2.0- 9.0) 100 mL lipaz üretim ortamı eklenip, 30°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları, ortamın pH’sı ve lipaz aktiviteleri tayin edildi. *A. niger* HBF 39 fungusunun en iyi enzim üretimini pH 5.5’ deki kültür ortamında gerçekleştirdiği saptandı.

Her mikroorganizmanın kendine uygun pH koşulları vardır. Mikroorganizmanın bulunduğu çevreye adaptasyonuna göre pH koşulları değişmektedir. Uygun olmayan pH koşullarında, hücre geçirgenliği ve enzim aktiviteleri olumsuz etkilenir, protein sentezi durur, hücreler toksik maddelere karşı daha duyarlı hale gelirler. *A. niger* HBF 39'un pH 2.0, 2.5, 3.0, 7.0, 7.5, 8.0 değerlerinde enzim üretimi neredeyse hiç gözlemlenmezken en yüksek enzim üretimi pH 5.5 de gözlemlendi. pH 4.0 ve 4.5 değerlerinde enzim üretimi azalırken 5.0 değerinde aniden enzim üretiminde artış gözlemlendi. pH 5.5 değerinden sonra üretimde belirgin bir şekilde azalma görüldü (Şekil 4.4).

Yapılan literatür taramasında fungusların en iyi gelişim gösterdiği ve lipaz ürettiği pH'nın 4.5 ile 9.5 arasında değiştiği bildirilmiştir (Akbulut, 2014).

Ionita ve arkadaşları yaptıkları çalışmada çeşitli fungus ve mayaların üretimi üzerine pH etkisini belirlemişlerdir. Mayalar arasında *C. lipolytica* ve *H. anomala* en iyi üretici olarak belirlenirken, funguslar arasında *A. oryzae* ve *A. niger* en iyi lipaz enzim üreticisi olarak belirlenmiştir. *C. lipolytica* pH 5.0-6.5, *H. anomala* ve *R. nigricans* pH 6.5-7.5, *A. oryzae* ve *A. niger* pH 7.5-8.5 değerleri arasında en iyi lipaz üretimi gerçekleştirdikleri saptanmıştır (Ionita vd., 1997).



Şekil 4.4. Lipaz enzimi üretimi üzerine pH'nın etkisi.

4.3.4. *Aspergillus niger* HBF 39'un Büyüme Kinetiği

A. niger HBF 39'un zamana bağlı gelişimini ve en iyi lipaz üretim zamanını saptamak için, optimum pH ve sıcaklıkta (5.5, 30 °C) 10 gün boyunca her gün biyokütle, pH ve enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı (Çizelge 4.1).

A. niger HBF 39 belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta geliştirildiğinde; hücre gelişimi 1. günde en düşük seviyede olup, süreye bağlı olarak biyokütle miktarı artmaya devam ettiği, 3. ve 4. günler arasında sabit bir değere ulaşmıştır. dördüncü günden sonra zamana bağlı olarak biyomasda düşme meydana geldi (Şekil 4.5).

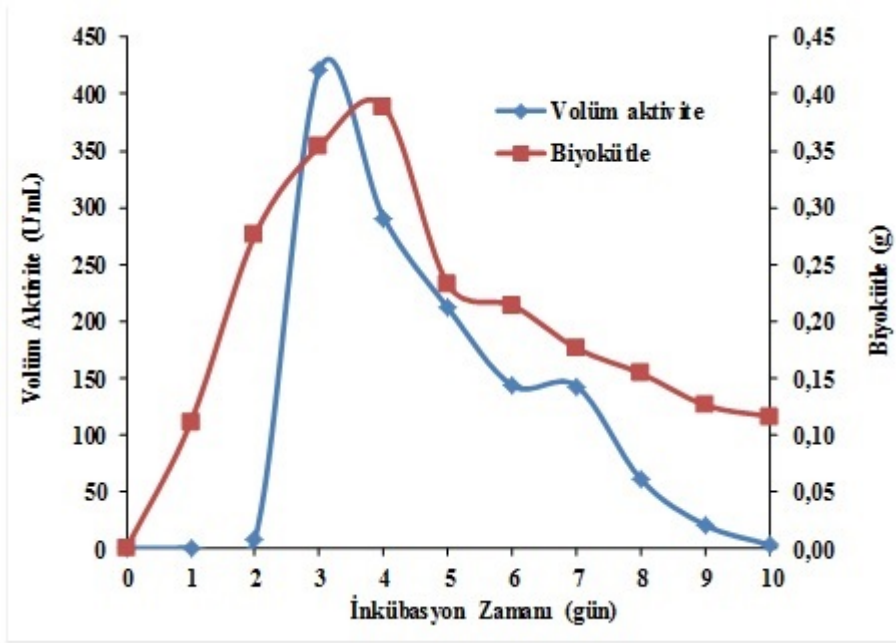
Enzim aktivitesi 1. ve 2. günde çok düşük seviyede ölçülmüştür. üçüncü günde enzim aktivitesi en yüksek seviyeye ulaşmıştır. dördüncü günden itibaren zamana bağlı olarak enzim aktivitesinde düşüş görülmüştür.

Başlangıçta 5.5 olan pH, zamana bağlı olarak azaldığı, 10 günde pH 3.75'e kadar düştüğü görülmüştür. pH'nın düşmesi fungusun asidik ürünler oluşturduğunu göstermektedir. Enzim üretiminin en yüksek olduğu 3. günde pH 4.5 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6).

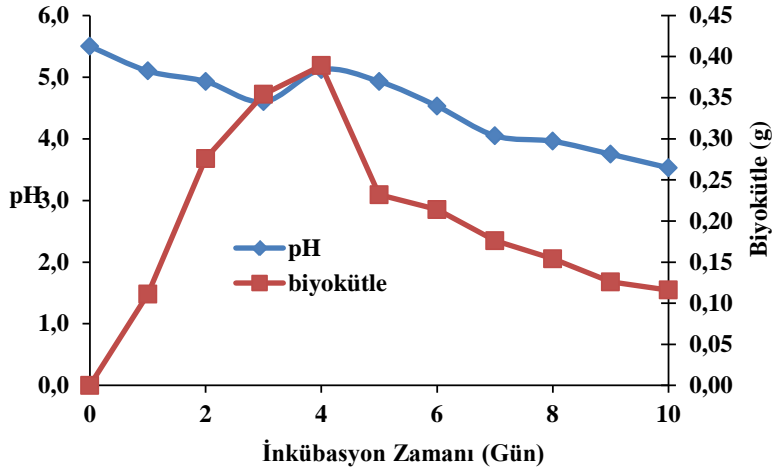
Ionita ve arkadaşlarının fungus ve mayalarla yaptıkları çalışmada, 30°C de ve 240 rpm'de mayaların 1 gün içinde, fungusların ise 2 gün içinde lipaz üretimi yaptıkları belirlenmiştir (Ionita vd., 1997).

Çizelge 4.1. *Aspergillus niger* HBF 39' un büyüme kinetiği

İnkübasyon süresi (Gün)	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Biyokütle (mg/mL)	Final pH
1	18 ± 4	a	0.11	5.10
2	165 ± 25	a	0.27	4.93
3	8426 ± 177	b	0.35	4.60
4	5816 ± 208	c	0.38	5.12
5	4229 ± 28	d	0.23	4.93
6	2868 ± 8	e	0.21	4.53
7	2855 ± 88	f	0.17	4.05
8	1209 ± 9	g	0.15	3.96
9	409 ± 55	h	0.12	3.75
10	0 ± 0	-	0.11	3.53



Şekil 4.5. *Aspergillus niger* HBF39'un gelişime bağlı hacimsel aktivite ve biyokütle değişimi.



Şekil 4.6. *Aspergillus niger* HBF 39'un gelişime bağlı pH ve biyokütle değişimi.

4.4. Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Molekül Ağırlığının Tayini

Optimum koşullar sağlanarak üretilen kültür ortamı süzülerek mikroorganizmadan arındırıldı ve elde edilen kültür ortamı ham enzim kaynağı olarak kullanıldı. İlk olarak iyon değişim kromatografisi yapılacağı için besi ortamından kaynaklanan tuzları uzaklaştırmak üzere diyaliz işleminden geçirildi. Daha sonra sırasıyla DEAE sefaroz CL-6B, Butyl sefaroz 4Fast Flow ve Q sefaroz Fast Flow kolonları kullanıldı.

Diyalizat iyon değişim kromatografisi (DEAE sefaroz CL-6B) kolonuna uygulandığında proteinlerin bir kısmı bağlanmadan kolondan çıktı (Şekil 4.7). Bu fraksiyonlarda çok düşük seviyede enzim aktivitesi saptandı. Bu durum lipazın kolona bağlandığını gösterdi. Bu nedenle kolona bağlı proteinleri kolondan uzaklaştırmak için 0-1 M NaCl ile tuz gradienti uygulandığında tekrar protein çıkışı gözlemlendi. Çok yüksek enzim aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilerek bir sonraki adım olan hidrofobik etkileşim kromatografisine uygulandı. Bu saflaştırma sonucunda lipaz enzimi %41 verimle ve 1.5 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.2).

İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim örneğine 2.5 M NaCl eklenerek proteinlerin hidrofobik alanlarının açığa çıkması sağlandı. Daha sonra bu örnek 2.5 M NaCl'li tamponla kararlı hale getirilen hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonuna (Butyl sefaroz 4Fast Flow) uygulandı. Kolon bu tuzlu tamponla yıkandığında oldukça fazla miktarda protein çıkışı gözlemlendi (Şekil 4.8). Bu fraksiyonlarda enzim aktivitesi çok düşük olduğu için, enzimin kolona bağlandığı düşünülerek 2.5-0 M NaCl ile ters tuz gradienti uygulandı. Ancak protein çıkışı olmasına rağmen enzim aktivitesi gradientin sonlarına doğru çok düşük oranda gözlemlendi (Daha önceki denemelerde bu aşamadan sonra tuz içermeyen tamponla kolon yıkandığında enzim çıkışı gözlemlendi. Ancak çok geniş bir fraksiyon aralığında gözlemlendi. Bu durumda enzimimiz çok fazla seyreltik duruma geldi. Bu yüzden bu durumu engellemek için kolona bağlı enzimleri hızlı ve birkaç fraksiyonda elde edebileceğimiz yöntem olan %30'luk izopropanol ile yıkamaya karar verildi. Bu aynı zamanda bir kolon temizleme işlemidir). Kolona çok sıkı bağlı proteinleri uzaklaştırmak için %30'luk izopropanol ile kolon yıkandığında tekrar protein çıkışı gözlemlendi. Bu fraksiyonlarda enzim aktivitesi ölçüldüğünde çok yüksek aktivitede görüldü. Bu fraksiyonlar birleştirildi. Tampon ile bir gece diyaliz yapılarak izopropanol uzaklaştırıldı. Elde edilen diyalizat bir

sonraki adım olan iyon değişim kromatografi kolonuna uygulandı. Bu saflaştırma sonucunda lipaz enzimi %39 verimle ve 6.1 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.2).

Hidrofobik etkileşim kromatografisinden elde edilen diyalizat yine bir iyon değişim kromatografi kolonuna (Q sefaroze Fast Flow kolon) uygulandı (bu kolonun, DEAE sefaroze CL-6B kolonundan farkı negatif yüklü proteinleri daha sıkı bağlamasıdır). Kolona diyalizat uygulandığında proteinlerin bir kısmı bağlanmadan kolondan çıktı (Şekil 4.9). Bu fraksiyonlarda çok düşük seviyede enzim aktivitesi saptandı. Bu durum lipazın kolona bağlandığını gösterdi. Bu nedenle kolona bağlı proteinleri kolondan uzaklaştırmak için 0-0.5 M NaCl ile tuz gradienti yapıldığında tekrar protein çıkışı gözlemlendi. Çok yüksek enzim aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilerek karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı. Bu saflaştırma sonucunda lipaz enzimi %35 verimle ve 18.5 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.2).

Saflaştırma sonucunda saflaştırma adımlarını izlemek, enzimin görüntülenmesini sağlamak, enzimin molekül ağırlığını saptamak ve enzimin tek bir monomerden mi yoksa birden fazla monomerden mi olduğunu saptamak için, PAGE zımogram ve SDS-PAGE yapıldı. PAGE zımogram ile enzimin görüntülenmesi yapıldı (Şekil 4.10A). SDS-PAGE jelleri incelendiğinde, saflaştırma adımları ilerledikçe protein bantlarının gittikçe azalarak, son adım olan Q sefaroze Fast Flow kromatografisinde tek bir bantta gözlemlenmiştir (Şekil 4.10B). Bu durum enzimin saflaştığına ve tek bir monomer olduğunu göstermektedir. SDS-PAGE’de yürütülen protein standartlarının Rf değerleri ile molekül ağırlıkları logaritması alınarak standart grafiği çizildi (Şekil 4.11). Bu grafiğin denklemi $y = -1.1064x + 5.2129$, tamamlayıcılık katsayısı $R^2 = 0.98$ bulundu. Bu denklemden yararlanarak lipazın molekül ağırlığı yaklaşık olarak 67.5 kDa olarak hesaplandı.

Birçok araştırmacı saflaştırma için farklı kromatografik adımlar kullanarak lipaz enzimini saflaştırmışlardır. Bu saflaştırma sonucunda fungal lipazların molekül ağırlıklarının 20 kDa ile 81 kDa arasında değiştiiği saptanmıştır.

Pseudomonas fluorescens HU380 suşundan elde edilen lipaz enzimini DEAE sepharose kromatografisi ve Superdex-200HR kromatografisiyle saflaştırmışlardır. Elde edilen enzimin saflaştırma kat sayısı 24.3, molekül ağırlığı SDS-PAGE jel elektroforezi ile 64 kDa olarak belirlenmiştir (Kojima vd., 2003).

Yu ve arkadaşları *Aspergillus niger* F044 lipazı, 74 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırma adımları olarak da amonyum sülfat çöktürmesi, dializ, DEAE-Sepharose, sephadex G-75 jel filtrasyonu kromatografisi yöntemlerini kullanmışlardır (Yu vd., 2007). *Aspergillus niger* MTCC 2594 suşundan elde edilen lipazın saflaştırma işleminde hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 35 ve 37 kDa olan 2 monomerden oluştuğunu saptanmıştır (Kambevd., 2011).

Aspergillus carneus lipazı amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kolonu ile 24 kat saflıkta %38 verimle elde etmişlerdir. Molekül ağırlığı 27 kDa saptanmıştır (Saxena vd., 2003).

Mucor hiemalis f. hiemalis ekstrasellüler lipaz saflaştırmasında ultrafiltrasyon, amonyum sülfat fraksiyonlaması, Sephadex G75 kromatografisi, Q-Sepharose iyon değişim kromatografisi ve Sephacryl S-200 kromatografisi kullanılarak 2200 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı 49 kDa olarak belirlenmiştir (Hiol vd., 1999).

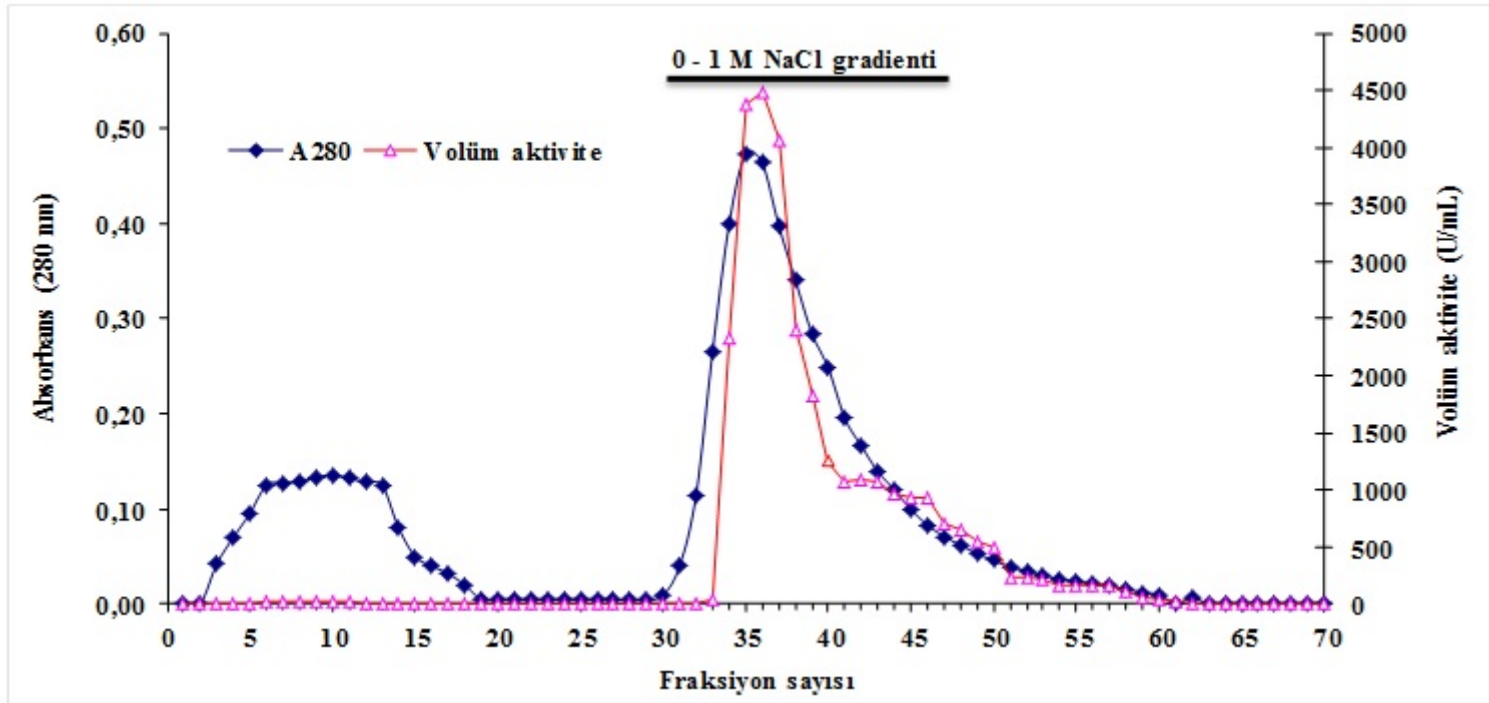
Cryptococcus sp. S-2 lipazı ultrafiltrasyon ve SP-5PW iyon değişim kromatografisi ile 17.1 kat saflaştırılmış ve SDS PAGE elektroforezi ile tek bant olduğu ve molekül ağırlığının 22 kDa olduğunu belirlemişlerdir (Kamini vd., 2000).

Rhizopus oryzae suşunun ekstrasellüler lipaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, sülforofil sepharose kromatografisi, sephadex G-75 jel filtrasyonu kromatografisi ve sülforofil sepharose kromatografisi ile 1200 kat saflaştırılmış ve moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 32 kDa olarak belirlemişlerdir (Hiol vd., 2000).

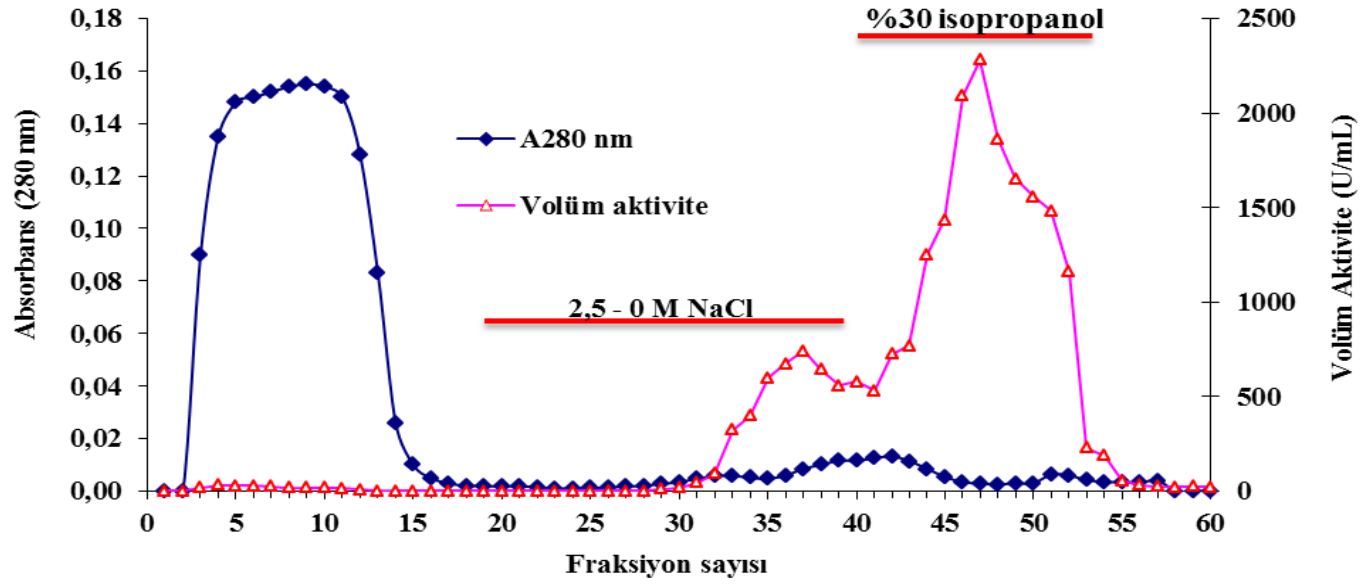
N.rileyi ekstrasellüler lipazı amonyum sülfat çöktürmesi ve sefakril S-100 HR kullanarak 23.9 kat saflıkta ve 1.69 verimle saflaştırmışlardır. Enzim moleküler ağırlığını SDS-PAGE yöntemiyle 81 kDa olarak belirlemişlerdir (Supakdamrongkul vd., 2010).

Talaromyces thermophilus fungusundan elde edilen alkali lipaz enziminin saflaştırma işleminde sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanmışlardır. 39 kDa molekül ağırlığına sahip lipaz enzimini saf olarak elde etmişlerdir (Romdhane vd., 2010).

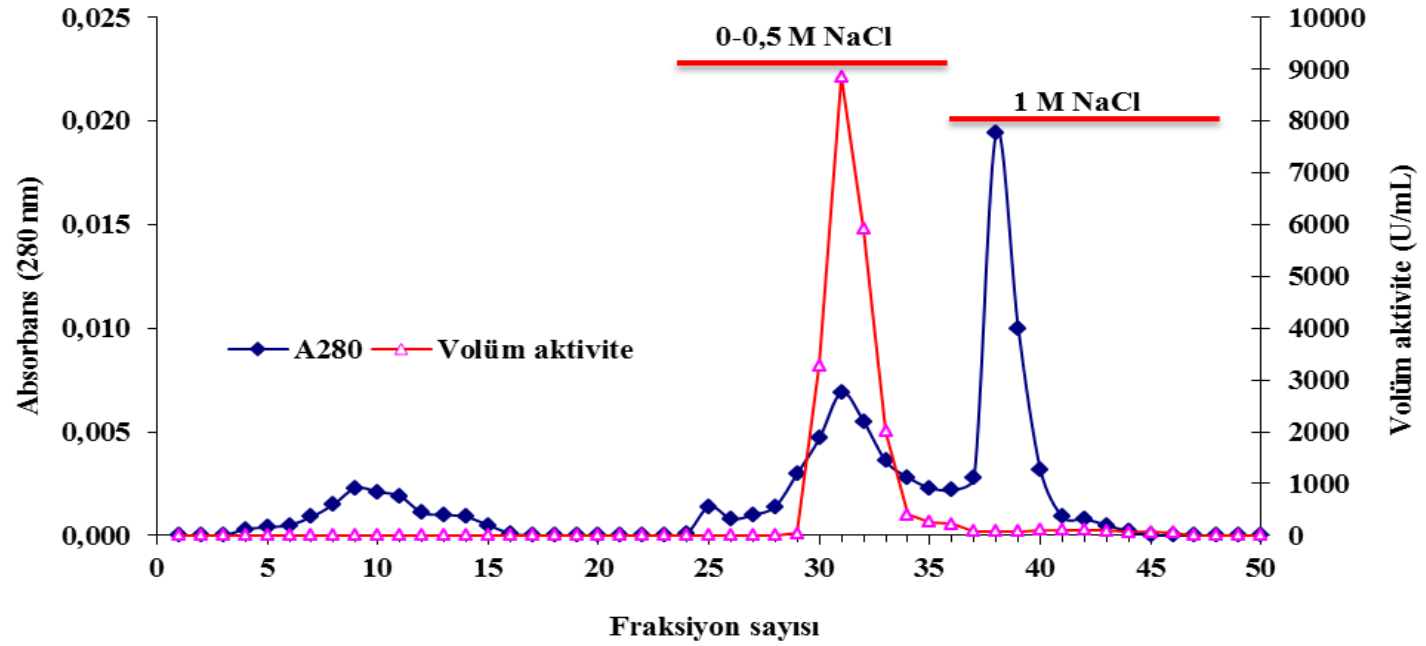
Mucor hiemalis lipazı 12.63 kat saflaştırarak %27.7 verimle elde etmişlerdir. Saflaştırma basamakları olarak amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon kolon kromatografisi kullanmışlardır. Enzimin moleköl ağırlığını 46 kDa olarak bulunmuştur (Ülker ve Karaoğlu, 2012).



Şekil 4.7. *Aspergillus niger* HBF 39 lipazının iyon değişim (DEAE Sefaroz CL-6B) kromatografisi



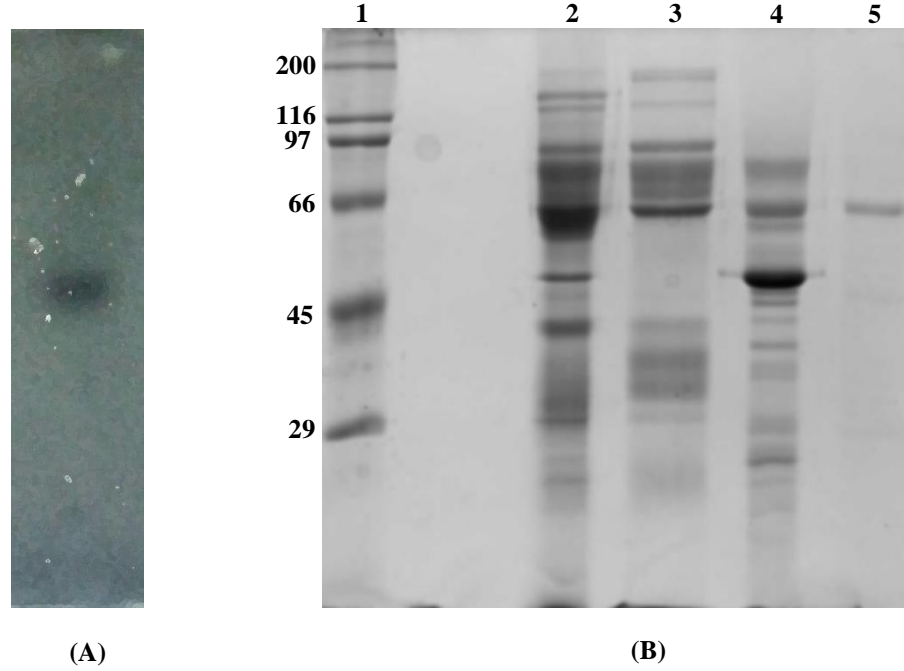
Şekil 4.8. *Aspergillus niger* HBF 39 lipazının hidrofobik etkileşim (Butyl Sefaroz 4 Fast Flow) kromatografisi



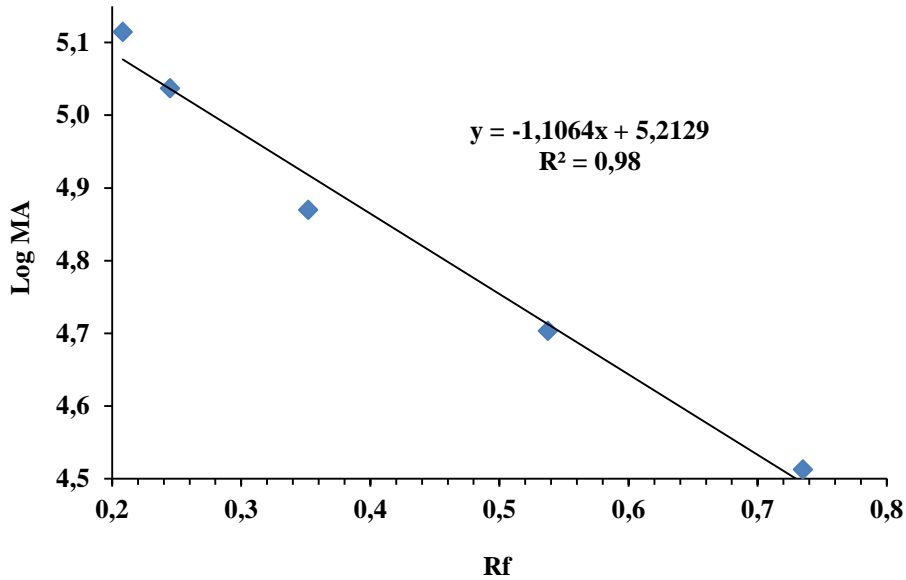
Şekil 4.9. *Aspergillus niger* HBF 39 lipazının iyon değişim (Q Sefaroz Fast Flow) kromatografisi

Çizelge 4.2. *Aspergillus niger* HBF 39 lipazının saflaştırma adımları

Fraksiyonlar	Total Hacim (mL)	Total Aktivite (U/mL)	Total Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Ham Enzim (Diyalizat)	225	407700	0.9	453000	1.0	100
DEAE sepharose CL-6B	96	167424	0.25	669669	1.5	41
Butyl sepharose 4 Fast Flow	71	157691	0.057	2766509	6.1	39
Q sepharose Fast Flow	36	142164	0.017	8362588	18.5	35



Şekil 4.10. (A) PAGE zimogram. (B) Saflaştırma adımlarının SDS-PAGE görüntüleri. 1; Standart, 200 kDa miyozin, 116 kDa β -galaktozidaz, 97 kDa fosforilaz B, 66 kDa sığır albumini, 45 kDa yumurta albumini, 29 kDa karbonik anhidraz. 2; Diyalizat. 3; DEAE-Sefaroz CL-6B. 4; Butyl Sefaroz 4 Fast Flow. 5; Q Sefaroz Fast Flow



Şekil 4.11. SDS-PAGE protein standart eğrisi

4.5. *Aspergillus niger* HBF 39 Lipazının Karakterizasyonu

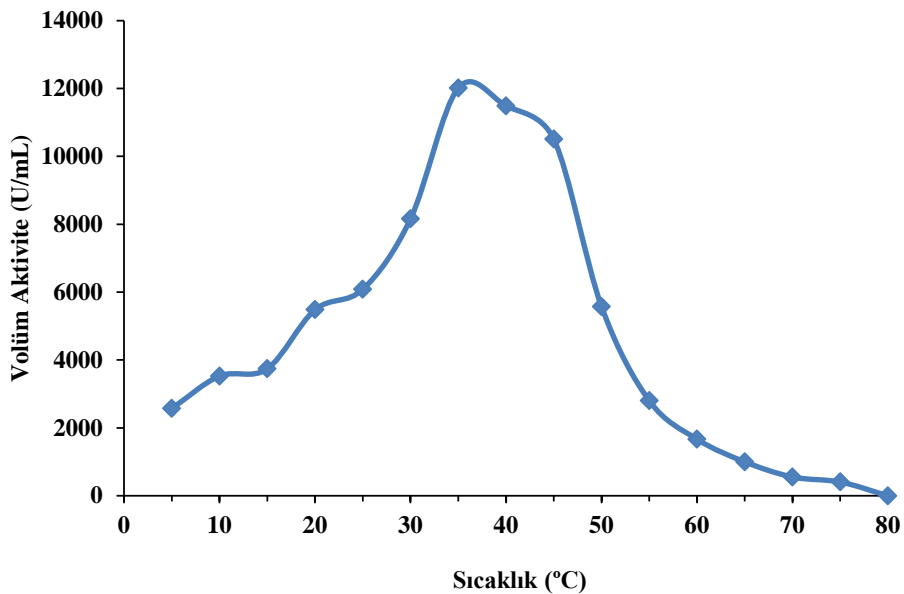
4.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Ham lipaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisine bakıldı sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12 sunuldu. Enzim aktivitesi 5 °C’de en düşük değerde olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle doğrusal bir şekilde artarak 35 °C’de maksimum seviyeye ulaştığı belirlendi. Sıcaklığın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitenin 45 °C’den sonra hızla düştüğü görüldü. Optimum sıcaklık (35 °C) ile 40 °C arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde 20, 25, 30, 40, 45 ve 50 °C’lerde enzim aktivite değişimi optimum aktivitenin sırasıyla %45, 50, 67, 95, 87 ve 46’sını gösterdiği saptandı.

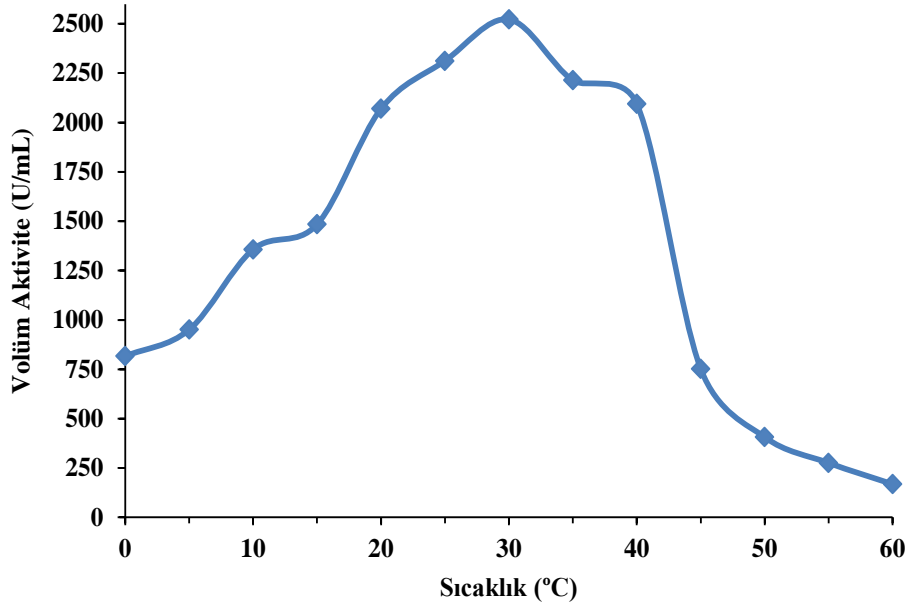
Saf lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin sonuçları Çizelge 4.4 ve Şekil 4.13’de sunuldu. Enzim aktivitesi 5°C’de en düşük değerde olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle aktivitenin doğrusal bir şekilde artarak 30 °C’de maksimum seviyeye ulaştığı saptandı. Sıcaklığın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, 40 °C’den sonra aktivitenin hızla düştüğü görüldü. Maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark

istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde 0, 5, 10, 15, 20, 25, 35 ve 40 °C'lerde aktivite değişimi optimum aktivitenin sırasıyla % 32, 38, 54, 59, 82, 92, 88 ve 83'ini gösterdiği saptandı. Hem ham enzimin hem de saf enzimin çok düşük sıcaklıklarda aktivite göstermesi, özellikle 0 °C bile aktive göstermesi, lipazın düşük sıcaklıklara adapte olmuş bir enzim olduğunu yani psikrofilik bir enzim olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara göre enzimin özellikle endüstriyel alanlarda düşük sıcaklık gerektiren reaksiyonlarda, organik kimyada biyokatalizör olarak kullanım potansiyeli bulunduğunu söyleyebiliriz. Düşük sıcaklıklarda aktivite göstermesi nedeniyle deterjan sanayisinde ve diğer endüstriyel alanlarda enerji tasarrufu sağlayabileceğini düşünüyoruz. Ancak enzimin yüksek sıcaklıklara (45 °C ve üst sıcaklıklar) dayanıklı olmadığı görülmektedir. Bu durum soğukta aktive olan enzimlerin genel özelliğidir.

Fungal lipazlarla yapılan çalışmalarda optimum sıcaklık 30-65 °C arasında bulunmuştur. *A. oryzae* lipazı 30 °C (Toida vd., 1995), *A.niger* NCIM 1207 lipazı 45 °C (Mahadik vd., 2002), *A. niger* AN0512 lipazı 50 °C (Liu vd., 2015), *A. nidulans* lipazı 40 °C (Mayardomo vd., 2000) ve *A. candidus* URM lipazı 65 °C (Farias vd., 2015) bulunmuştur.



Şekil 4.12. Ham enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 4. 13. Saf enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Çizelge 4.3. Ham enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
5	2575 ± 77	a	21
10	3528 ± 67	b	29
15	3742 ± 141	b	31
20	5483 ± 104	c	45
25	6083 ± 153	c	50
30	8157 ± 365	d	67
35	12013 ± 487	e	100
40	11486 ± 31	e	95
45	10505 ± 543	f	87
50	5576 ± 399	c	46
55	2801 ± 136	a	23
60	1668 ± 35	g	13
65	1001 ± 80	h	8
70	554 ± 18	hi	4
75	407 ± 52	hj	3
80	0	-	0

Çizelge 4.4. Saf enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
0	816 ± 80	a	32
5	951 ± 20	b	38
10	1357 ± 8	c	54
15	1484 ± 48	d	59
20	2069 ± 16	e	82
25	2312 ± 26	f	92
30	2522 ± 18	e	100
35	2213 ± 18	g	88
40	2094 ± 75	h	83
45	752 ± 30	a	30
50	406 ± 8	g	16
55	276 ± 12	i	11
60	168 ± 35	j	7

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

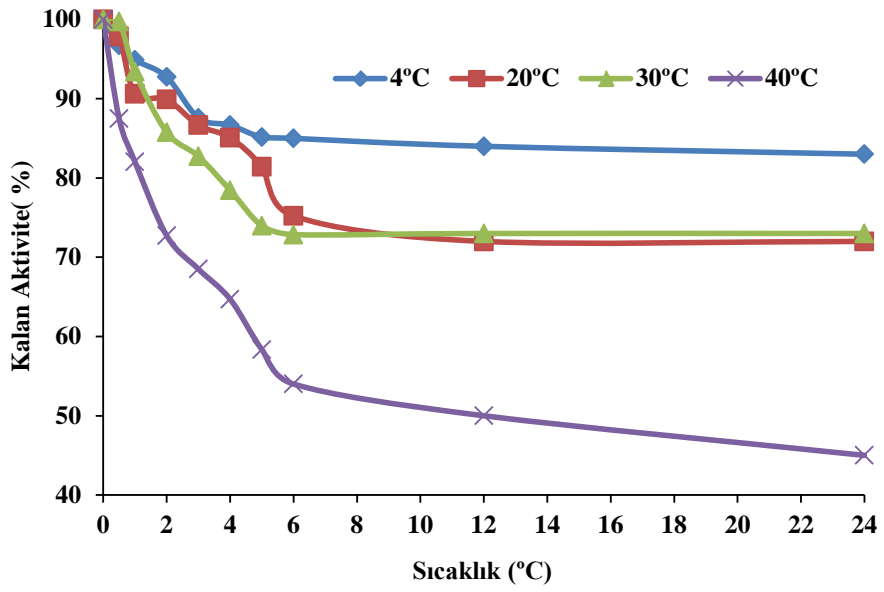
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.5.2. Saf Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için enzim 4, 20, 30 ve 40 °C sıcaklıklarda inkübe edildi. Enzim çözeltisinden belli zaman aralıklarında enzim aktivitesi ölçülerek kontrol değerlerine göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlendi.

A. niger lipazı 4, 20, 30 ve 40 °C'lerde 2 saatlik inkübasyonda bile %70 den fazla aktiviteyi koruduğu görülmektedir (Çizelge 4.5, Şekil 4.14). 30 °C sıcaklığa kadar sıcaklıklarda 24 saat boyunca %70'den fazla aktivite göstermiş olması bu sıcaklıklarda oldukça stabil olduğunu gösteriyor. Enzim 40 °C de bile 24 saat boyunca %40 dan fazla aktivite göstermiştir. Sıcaklık stabilite deneyleri sonucunda enzimin 40 °C ve altındaki sıcaklıklarda oldukça stabil olması, bu enzimin bu sıcaklık uygulaması yapan endüstriyel işlemlerde kullanılabileceğini göstermektedir.

Termofilik *Rhizopus oryzae* lipazı ile yapılan stabilite denemelerinde 45 °C'de 30 dakika sonunda enzim aktivitesinin %65'ini koruduğunu belirtilmiştir (Hiol vd., 2000). *Pseudomonas fluorescens* HU380 suşundan elde edilen lipazın 30 °C de 24 saat süre ile stabilitesini koruduğunu gözlemlenmiştir. 40 °C, pH 7.0 değerlerinde 0.1% Triton X-100 eklenerek 60 dakika boyunca stabilitesini korumuştur (Kojima vd., 2003). *N.rileyi* MJ lipazının 15 ve 35 °C arasında stabil olduğunu gözlemlenmiştir (Supakdamrongkul vd., 2010). *A. candidus* URM5611 lipazı 30-65 °C arasında stabil olduğunu bildirmişlerdir (Farias vd., 2015). *A. niger* AN0512 lipazının 60 °C de 20 saat sonra %50 aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2015). *Aspergillus niger* F044 lipazı 60 °C de 30 dk sonra orijinal aktivitenin %98.7 sini koruduğunu bildirilmiştir (Shu vd., 2007).



Şekil 4.14. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

Çizelge 4.5. Saf enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

İnk. Zamanı (dk)	4 °C			20 °C			30 °C			40 °C		
	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
0	1287 ± 13	A	100	1287 ± 13	a	100	1287 ± 13	a	100	1287 ± 13	a	100
30	1245 ± 23	B	96	1260 ± 4	b	97	1284 ± 12	a	99	1126 ± 10	b	87
60	1221 ± 7	B	94	1166 ± 4	b	90	1203 ± 4	b	93	1056 ± 4	b	82
120	1194 ± 9	B	92	1157 ± 7	b	89	1104 ± 3	b	85	936 ± 13	b	72
180	1127 ± 3	B	87	1116 ± 8	b	86	1065 ± 13	b	82	882 ± 14	b	68
240	1116 ± 3	B	86	1095 ± 7	b	85	1010 ± 12	b	78	833 ± 3	b	64
300	1096 ± 11	B	85	1048 ± 15	b	81	952 ± 8	b	73	751 ± 2	b	58
360	1094 ± 7	B	85	968 ± 1	b	75	938 ± 3	b	72	690 ± 2	b	53
720	1087 ± 7	B	84	930 ± 4	b	72	935 ± 2	b	72	645 ± 12	b	50
1440	1065 ± 4	B	82	929 ± 8	b	72	939 ± 7	b	72	575 ± 31	b	44

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S. H. :** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$)

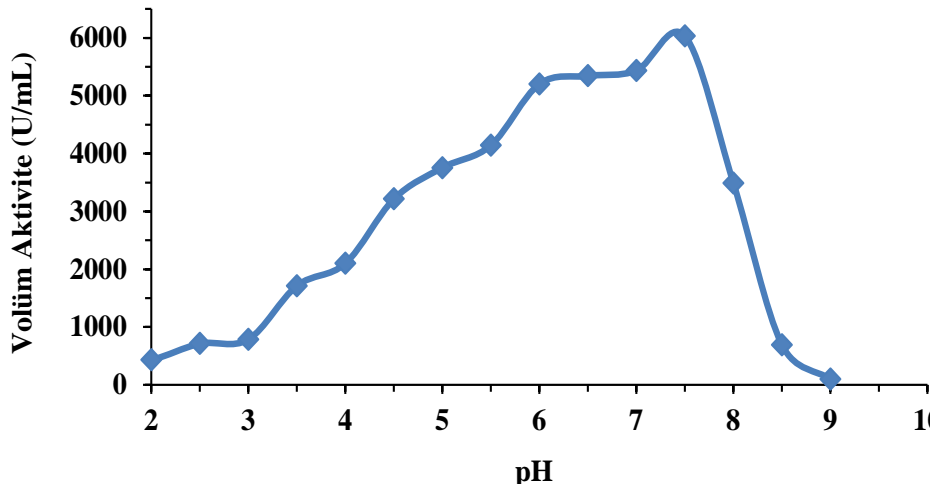
4.5.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Ham lipaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisiyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.15'da gösterildi. Enzim pH 1.0 da hiçbir aktivite göstermedi. Enzim aktivitesi pH 1.5'de en düşük değerde olup, pH'daki 0.5 birimlik artışlarla beraber, aktivite doğrusal bir şekilde artarak pH 7.5'de maksimum seviyeye ulaştığı ve pH'nın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitesinin hızla düştüğü görüldü. Enzim, pH 8.5 ve üzerinde aktivite göstermedi. Enzimin pH 7.5'deki maksimum aktivitesi ile diğer tüm pH değerlerindeki aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Ancak, pH 4.5 ile 7.5 arasındaki pH'larda enzim enzim optimum pH'ın %50'sinden fazla aktivite göstermiştir. Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 ve 8.0 değerlerinde başlangıç aktivitesinin sırasıyla %35, 53, 62, 69, 86, 89, 90 ve 58'ini koruduğu saptandı. Bu durum lipazın asidik pH'larda daha aktif olduğunu göstermektedir.

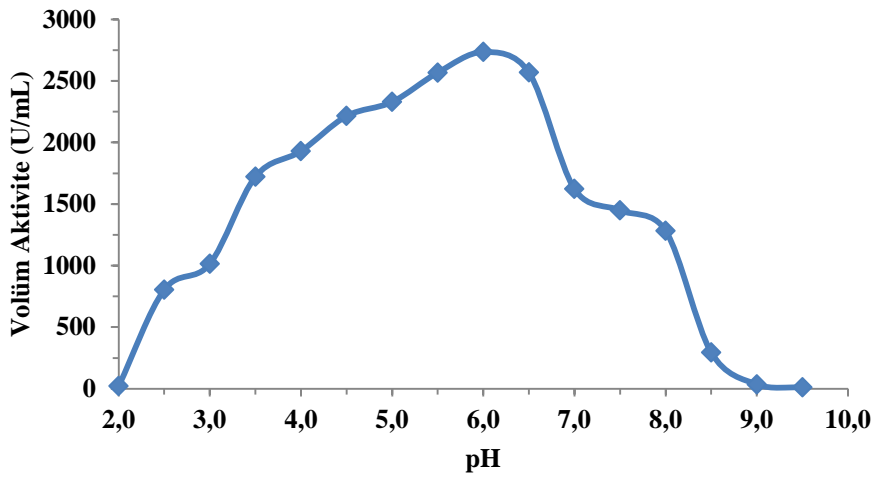
Saflaştırılmış lipaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisiyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.16'de gösterildi. Enzim pH 1.0 ve 2.0 arasında hiçbir aktivite göstermedi. Enzim aktivitesi pH 2.5'de en düşük değerde olup, pH'daki 0.5 birimlik artışlarla beraber, aktivite doğrusal bir şekilde artarak pH 6.0'da maksimum seviyeye ulaştığı ve pH'nın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitesinin düştüğü görüldü. Enzim, pH 9.0 ve üzerinde aktivite göstermedi. Enzimin pH 6.0'daki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm pH değerlerindeki aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Ancak, pH 3.5 ile 6.0 arasındaki pH'larda enzim enzim optimum pH'ın %60'ından fazla aktivite göstermiştir. Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde pH 2.5, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 değerlerinde başlangıç aktivitesinin sırasıyla %30, 36, 62, 70, 83, 85, 93, 93, 59, 53 ve 46'sını koruduğu saptandı. Bu durum lipazın pH 7.0 ve altındaki asidik pH'larda daha aktif olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlardan saflaştırılan enzimin asidik koşullarda işlem gören endüstriyel işlemlerde kullanılabileceği görülmektedir.

Bakteriyal lipazlar bazı istisnalar hariç genellikle nötral veya alkali pH'larda optimum aktivite gösterirler. Ancak, bakteriler arasında pH 4.0-11.0 arasında aktivite gösteren lipazlar mevcuttur. Fungal lipazlar genellikle pH 4.0-8.0 arasında optimum aktivite göstermekle birlikte hem daha asidik hemde daha bazik pH'larda

aktivite mevcuttur (Sharma vd., 2011). *A.niger* NCIM 1207 lipazı pH 2.5 (Mahadik vd., 2002), *A. candidus* URM lipazı pH 2.5 (Farias vd., 2015), *Pseudomonus fluorescens* HU380 lipazı pH 4.5 (Kojima vd., 2003), *A. niger* AN0512 lipazı pH 5.0 (Liu vd., 2015), *A. nidulans* lipazı pH 6.5 (Mayardomo vd., 2000), *Cryptococcus* sp. S-2 lipazı pH 7.0 (Kamini vd., 2000), *Mucor hiemalis* lipazı 7.0 (Ülker ve Karaoğlu, 2012), *A. oryzae* lipazı pH 7.0 (Toida vd., 1995), *A. japonicas* lipazı pH 7.3 (Bharti vd., 2013), termofilik *Rhizopus oryzae* lipazı pH 7.5 (Hiol vd., 2000) ve *N.rileyi* MJ lipazının ise optimum pH 8.0 olarak belirlenmiştir (Supakdamrongkul vd., 2010),



Şekil 4.15. Ham enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.



Şekil 4.16. Saf enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.

Çizelge 4.6. Ham enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

pH	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
1.0	0 \pm 0	a	0
1.5	334 \pm 2	b	6
2.0	434 \pm 5	b	7
2.5	714 \pm 9	b	12
3.0	787 \pm 10	b	13
3.5	1714 \pm 25	c	28
4.0	2101 \pm 31	d	35
4.5	3215 \pm 35	e	53
5.0	3755 \pm 40	e	62
5.5	4142 \pm 58	f	69
6.0	5203 \pm 65	g	86
6.5	5343 \pm 68	g	89
7.0	5436 \pm 68	g	90
7.5	6030 \pm 71	h	100
8.0	3488 \pm 39	e	58
8.5	694 \pm 6	b	12
9.0	100 \pm 1	a	2
9.5	0	-	0

Çizelge 4.7. Saf enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

pH	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Kalan Aktivite %
1.0	0 \pm 0	a	0
1.5	0 \pm 0	a	0
2.0	0 \pm 0	a	0
2.5	822 \pm 11	b	30
3.0	1005 \pm 26	c	36
3.5	1721 \pm 6	d	62
4.0	1929 \pm 20	e	70
4.5	2284 \pm 17	f	83
5.0	2329 \pm 5	f	85
5.5	2567 \pm 61	g	93
6.0	2734 \pm 51	h	100
6.5	2568 \pm 34	g	93
7.0	1621 \pm 59	i	59
7.5	1449 \pm 34	i	53
8.0	1282 \pm 38	j	46
8.5	294 \pm 21	k	10
9.0	35 \pm 3	a	1

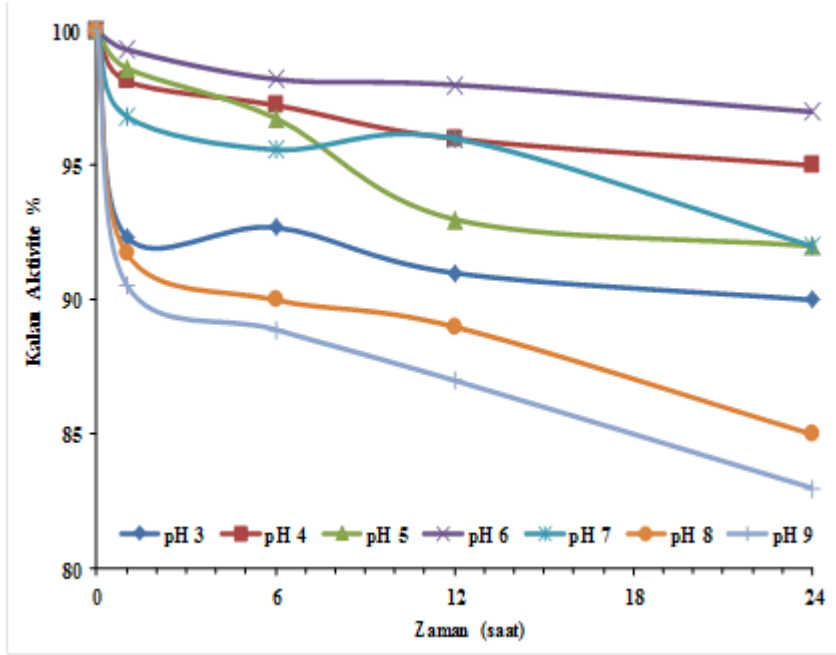
ORT: Her veri üç tekrarin ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.5.4. Saf Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.17'de gösterildi. Sonuçlardan da görüleceği gibi enzimin pH 3.0-9.0 arasında 24 saatlik inkübasyonda bile aktivitesinin % 83-99'unu koruduğu görülmektedir. Bu durum enzimin geniş bir pH stabilitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu geniş pH stabilitesi enzimin çok farklı alanlarda ve özellikle deterjan endüstrisinde kullanım potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

Aspergillus carneus lipazının optimum pH değeri 9.0 olarak belirlenmiştir. *A. carneus* lipazının pH 8.0 ve 10.0 değerleri arasında stabil olduğunu belirlenmiştir (Saxena vd., 2003). *Cryptococcus* sp. S-2 lipaz enziminin pH 9.0 da %52.9 aktivite gözlemlenmiştir. Enzim pH 5.0- 9.0 arasında stabil olduğunu gözlemlenmiştir (Kamini vd., 2000). Termofilik *Rhizopus oryzae* lipaz pH 4.5 ve 7.5 arasındaki aktivitesinin stabil olduğunu, pH 3.5-8.5 arasında 12 saat sonra %80 aktivitesini koruduğu ve pH 8.5 üzerinde ise %50 aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir (Hiol vd., 2000). *A.niger* NCIM 1207 lipaz enziminin yüksek asidik pH değerlerinde enzim aktivitesinin %75'ini koruduğu gözlemlenmişlerdir (Mahadik vd., 2002). *A. candidus* URM lipazı pH 2.5-9.0 arasında 3 saat sonunda aktivitesinin %65'ini koruduğunu (Farias vd., 2015), *A. niger* AN0512 lipazı pH 3.0 da 20 saat sonra aktivitesinin %90'nını koruduğunu (Liu vd., 2015), *A. oryzae* lipazı pH 6.0-9.0 arasında 25 °C de 18 saat, pH 7.0 da 30 °C de 3 saat stabil olduğunu (Toida vd., 1995) ve *Aspergillus niger* F044 lipazı pH 2.0-9.0 arasında 4 saat içinde oldukça stabil olduğunu (Shu vd., 2007) bildirmişlerdir. Literatür verileri ile kıyaslandığında bu çalışmaya konu olan lipaz enziminin pH stabilitesinin çok daha iyi olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.17. Enzim stabilitesi üzerine pH etkisi

Çizelge 4.8. Saf enzim stabilitesi üzerine pH etkisi

İnk. zamanı (dk)	pH 3.0			pH 4.0			pH 5.0			pH 6.0		
	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
0	1289 ±3	a	100	1289 ±3	a	100	1289 ±3	a	100	1289 ±3	a	100
60	1190 ±11	b	92	1265 ±3	b	98	1271 ±6	a	98	1280 ±1	a	99
360	1195 ±4	b	92	1253 ±1	b	97	1247 ±6	b	96	1266 ±3	b	98
720	1167 ±2	b	90	1244 ±10	b	96	1204 ±12	b	93	1261 ±1	b	97
1440	1164 ±7	b	90	1229 ±6	b	95	1188 ±15	b	92	1245 ±5	b	96

İnkübasyon zamanı (dk)	pH 7.0			pH 8.0			pH 9.0		
	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X	Kalan Aktivite %
0	1289 ±3	a	100	1289 ±3	a	100	1289 ±3	A	100
60	1248 ±4	b	96	1182 ±6	b	91	1167 ±21	B	90
360	1232 ±1	b	95	1158 ±6	b	89	1146 ±0	B	88
720	1234 ±3	b	95	1144 ±1	b	88	1124 ±4	B	87
1440	1181 ±7	b	91	1093 ±21	b	84	1079 ±7	B	83

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.5.5. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

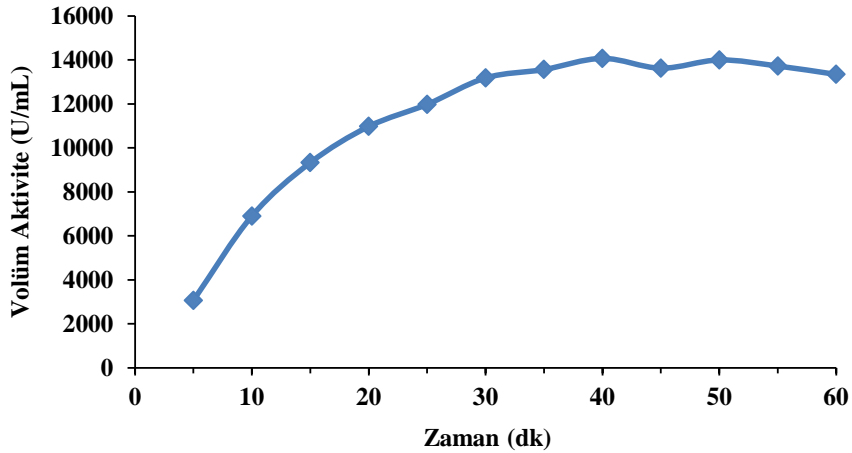
Zaman, enzim aktivitesinin ölçülmesinde önemli bir faktördür. Çünkü reaksiyon hızı belirli bir zamanda üretilen ürün miktarı ile belirlenir. Aktivite tayininin doğru tespiti için, oluşan ürünün linear olduğu bir noktada enzim aktivitesinin tayininin yapılması gerekmektedir. Enzim ve substrat farklı zaman aralıklarında inkübasyona bırakıldıklarında ilk 20 dakikada enzim aktivitesi zamana bağlı olarak doğrusal artmaktadır (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.18). Ancak inkübasyon zamanının artışı ile enzim aktivitesi doğrusallıktan sapmaktadır. Bu nedenle standart enzim aktivite deneyleri 20 dakikalık inkübasyonlarda yapıldı.

Çizelge 4.9. Saf enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Zaman (dk)	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x
5	3068 \pm 282	a
10	6901 \pm 549	b
15	9329 \pm 223	c
20	10974 \pm 38	d
25	11979 \pm 215	e
30	13179 \pm 156	f
35	13562 \pm 270	f
40	14069 \pm 185	f
45	13624 \pm 54	f
50	13998 \pm 146	f
55	13722 \pm 564	f
60	13340 \pm 55	f

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.18. Saf enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.

4.5.6. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi sabit inkübasyon süresinde, optimum sıcaklık ve pH'da (30 °C ve pH 6.0) farklı konsantrasyonlarda (50-1000 µM) pNPL kullanarak standart deney koşullarında enzim aktivitesi ölçülerek belirlendi (Çizelge 4. 10).

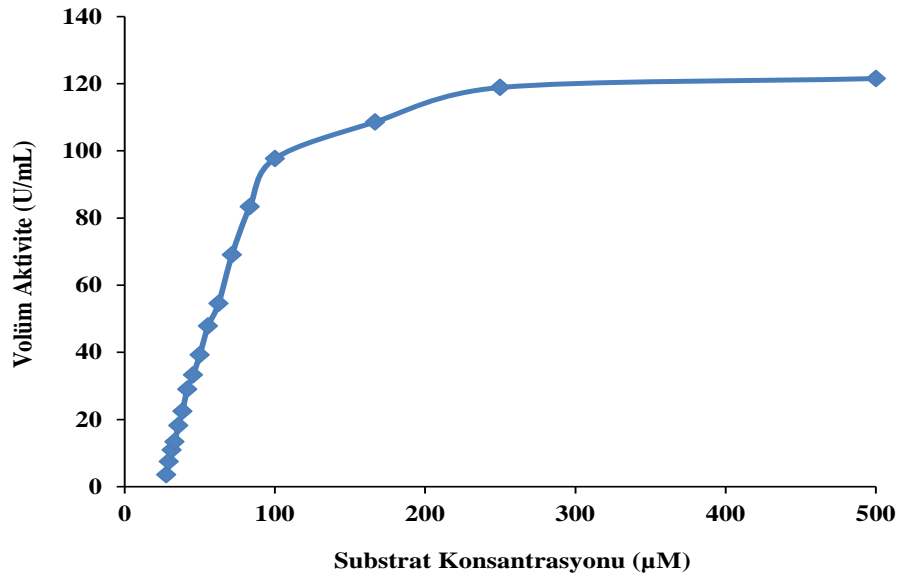
Substrat konsantrasyonunun 50 µM'dan 1000 µM'a kadar belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin de kademeli olarak arttığı görüldü. Substrat konsantrasyonuna karşı enzim aktivite grafiği çizildiğinde enzimin Michaelis-Menten kinetiği izlediği görülmektedir (Şekil 4.19). Lipazın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, $1/V'$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak Lineweaver- Burk $y = ax + b$ doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği, $1/V'$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak çizildi (Şekil 4.20). Bu grafiğin doğru denklemi , $y = 0.3547x + 0.0072$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise 0.99 bulundu. Denklemin dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0.0072$ değerini verdiği için, V_{max} değeri **139 U/mL** olarak hesaplandı. Doğrunun yatay eksenini kestiği nokta ise, $-1/K_m = -0.0203$ değerinde olup, K_m değeri **49 µM** olarak bulundu.

A. *niger* HBB 39 lipazı ile yaptığımız çalışmada K_m değeri daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen K_m değerlerinden çok daha düşük bulunmuştur. Bu durum enzimin bu substrata karşı spesifitesinin diğerlerine göre daha yüksek

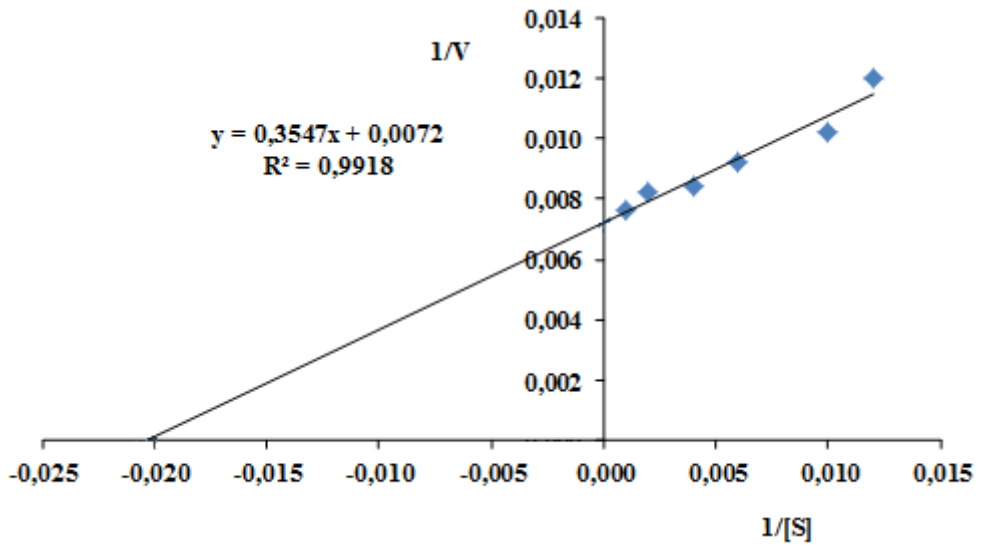
olduğunu göstermektedir. Substrat olarak pNPL kullanıldığında, *Bacillus* sp. lipazının 62.89 μM ve 833.33 U/mL (Bakır Ateşlier ve Metin, 2006), *Thermus thermophilus* lipazının 1 mM ve 0.044 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ (Kretza vd., 2012), *Bacillus* sp. J33 lipazının 2.5 mM ve 0.4 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ (Navani ve Kaur, 2000), *Bacillus* sp. lipazının K_m ve V_{max} 0.5 mM ve 0.139 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ (Nawani vd., 2006), *Bacillus* sp. lipazının 0.19 mM ve 0.032 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ (Nawani ve Kaur, 2007), *Rhizopus* sp lipazının 2.4 mM/L and a V_{max} value of 277.8 U/mL (Koblitz ve Pastore, 2006), *Yarrowia lipolytica* lipazının 0.234 mM ve 0.033 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ ve *Rhodotorula glutinis* lipazının K_m değeri ise 0.7 mM olarak bildirilmiştir (Hatzinikolaou vd., 1999) olarak bulmuşlardır.

Çizelge 4.10. Saf enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Substrat Konsantrasyonu	Volüm aktivite (U/mL)
25	0.71
26.32	1.96
27.78	3.56
29.41	7.51
31.25	10.89
33.33	13.38
35.71	18.23
38.46	22.45
41.67	28.99
45.55	33.26
50	29.26
55.55	47.80
62.5	54.52
71.43	69.01
83.33	83.38
100	97.69
166.66	108.59
250	118.86
500	121.53
1000	130.95



Şekil 4.19. *A. niger* HBF 39 lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten Grafiği)



Şekil 4.20. *A. niger* HBF 39 lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

4.5.7. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim aktivitesine karşı metal iyonlarının etkisini incelemek için enzim 1 mM, 5 mM ve 10 mM final konsantrasyonlarında AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , KCl , LiCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NH_4Cl , NiCl_2 , PbCl_2 , ZnCl_2 , $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$, HgCl_2 ve EDTA içeren deney ortamlarında 30°C 'lik su banyosunda 20 dakika inkübe edildi ve aktivite tayini yapıldı. Metal iyonları ve EDTA içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edilip, aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4. 11 ve Şekil 4.21 sunuldu.

A. niger HBB 39 lipazı üzerine metal iyonlarının etkisine bakıldığında Pb^{+2} , Hg^{+2} ve Fe^{+3} denen tüm konsantrasyonlarda inhibisyon neden olmuştur. Kambourova ve arkadaşlarının bildirdiğine göre metaller tarafından inhibisyonla ilgili olarak, Lee ve Rhee (1993) iki mekanizma ileri sürmüşlerdir; ya katalitik bölge direkt olarak inhibisyona uğruyor olabilir ya da metal iyonları açığa çıkan yağ asitleri ile kompleks oluşturarak onların çözünürlüklerini ve ara yüzeydeki davranışlarını değiştirerek bu inhibisyona yol açıyor olabilirler. Literatür bilgilerine göre genel olarak Pb^{+2} , Hg^{+2} ve Fe^{+2} lipazlar üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Toida vd., 1995; Verma vd., 2012; Yadav vd., 1998; Koblitiz ve Pastore, 2006; Hiol vd., 2000). Al^{+3} , Zn^{+3} , Mn^{+2} , Ca^{+2} ve Cu^{+2} denen tüm konsantrasyonlarda lipaz aktivitesinde kısmi bir inhibisyon gözlenmiştir. Ca^{+2} iyonları birçok lipaz üzerine aktive edici etki yaparken, *A. niger* HBB 39 lipazı üzerine kısmi bir inhibisyona neden olmuştur. NH_4^+ , Co^{+2} , Se^{+4} ve Mg^{+2} 1 mM konsantrasyonları enzim aktivitesinde önemli bir değişime neden olmazken, 5 mM konsantrasyonda NH_4^+ kısmi bir aktivite artışına, Co^{+2} ve Se^{+4} kısmi inhibisyona neden olmuştur.

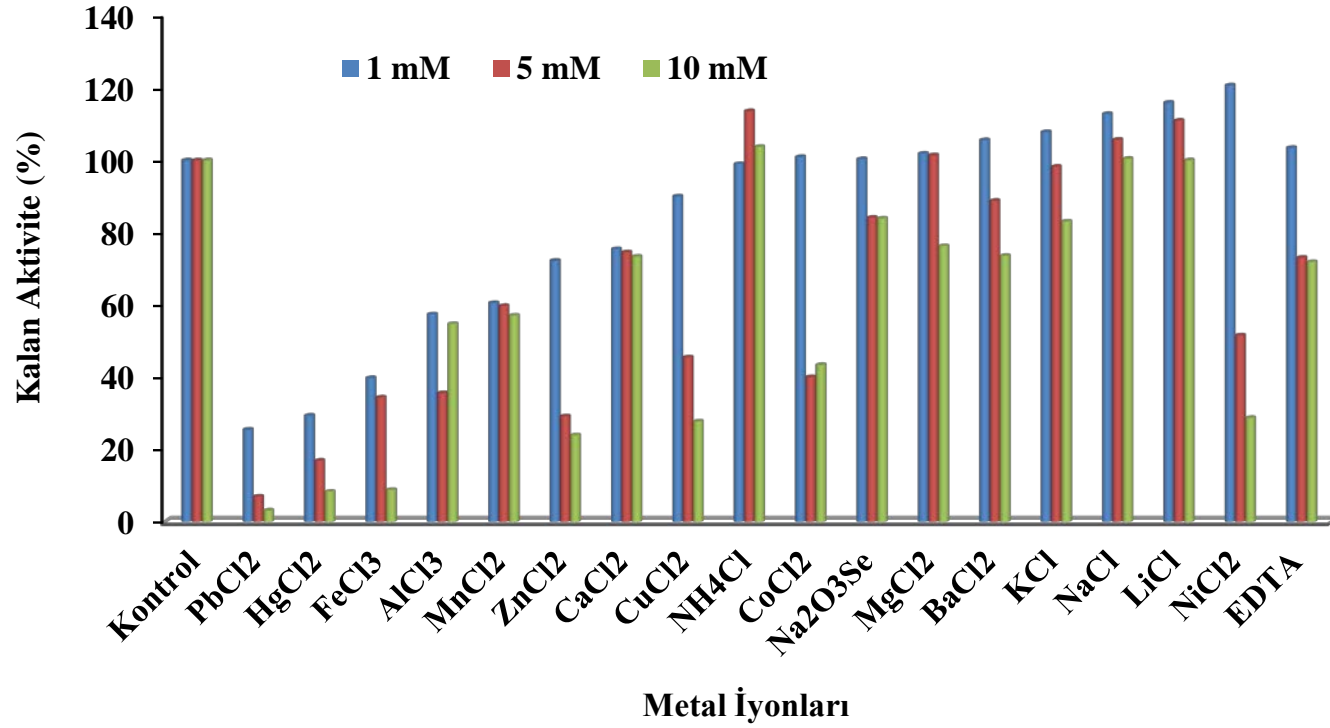
Ba^{+2} , K^+ , Na^+ , Li^+ ve Ni^{+2} 1 mM konsantrasyonda lipaz aktivitesinde kısmi bir artışa neden olmuş, sadece Ni^{+2} 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında kısmi bir inhibisyon gözlenmiştir. Bu iyonların ya enzimin yapısında bulunan negatif yüklü yan zincirlere sahip amino asitlere bağlanıp enzimin konformasyonunu değiştirerek yapısını stabilize ettiği; yada substrata bağlanarak reaksiyon için onun doğru yönelimini sağladığı düşünülmektedir.

EDTA 1 mM konsantrasyonda enzim aktivitesinde önemli bir değişime neden olmazken, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında aktivitenin sırasıyla %73 ve 71'ünü koruduğu görülmektedir. Enzimin EDTA tarafından inhibe edilmemesi aktivitesi

için bir metal iyonuna ihtiyacı olmadığını yani metalloenzim olmadığını göstermektedir. Benzer olarak *Aspergillus carneus* (Saxena *et al.*, 2003b), *Yarrowia lipolytica* (Yu *et al.*, 2007)'dan elde edilen lipazların da EDTA tarafından inhibe olmadıkları bildirilmiştir.

Aspergillus terreus lipazı Mg^{2+} ve Ca^{2+} iyonları tarafından aktive olurken, Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Fe^{3+} inhibisyona neden olduğu ve EDTA'nın hiçbir etki yapmadığını saptanmıştır (Yadav vd.,1998). *Aspergillus nidulans* lipazının Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} ve Mg^{2+} ile kuvvetle inhibe olurken, Ag^+ ve Na^+ kısmen inhibisyona neden olmuş, ancak K^+ aktiviteyi etkilemediğini saptamışlardır (Mayordoma vd., 2000) *A.carneus* lipaz enzimi Mg^{2+} , Na^+ ve NH_4^+ iyonları aktiviteyi arttırdığı ve metal şelatlayıcı ajanların herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir (Saxena vd., 2003).

Rhizopus oryzae lipazı Fe^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} and Fe^{2+} metal iyonları ile kuvvetli bir şekilde inhibe olduğunu bildirmişlerdir (Hiol vd., 2000). *Pseudomonas fluorescens* HU380 mikroorganizmasından saflaştırılan lipaz enziminin Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} metal iyonları tarafından inhibe edildiğini gözlemlenmiştir. Ca^{2+} iyonu ve EDTA tarafından ise aktivite edildiğini belirlemişlerdir (Kojima ve Shimizu, 2003). *Cryptococcus* sp. S-2 lipazının enzim aktivite üzerine 1 mM Hg^{2+} ve Cu^{2+} enzim aktivitesini inhibe ettiğini ve EDTA hiç etki yapmadığını enzim metalloenzim olmadığını ileri sürmüşlerdir (Kamini vd., 2000). *N.rileyi* MJ lipazının Na^+ , NH_4^+ ve EDTA'nın enzim aktivitesini artırdığı ve Co^{2+} , Cu^{2+} iyonları yüksek inhibisyon gösterdiğini belirlemişlerdir (Supakdamrongkul vd., 2010). *Mucor hiemalis* lipazını Na^+ , K^+ , Hg^{2+} ve Cr^{3+} iyonlarının inhibe ettiği, Mn^{2+} iyonunun ise aktive ettiğini gözlemlenmiştir (Ülker ve Karaoğlu, 2012).



Şekil 4.21. *A. niger* HBF 39 lipaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi

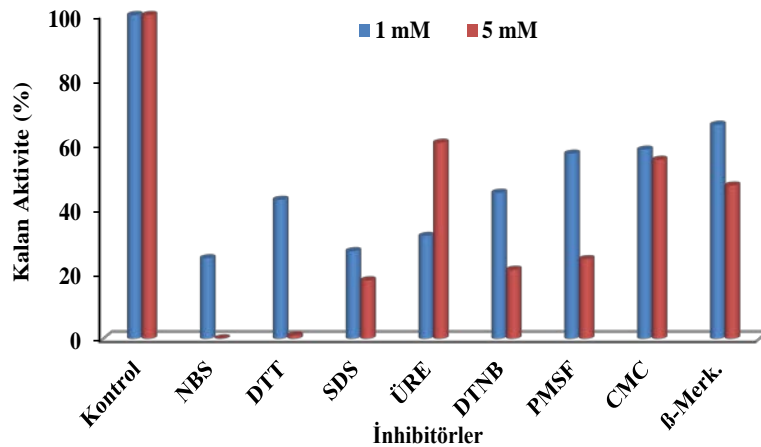
Çizelge 4.11. *A.niger* HBF 39 lipaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi

Metal iyonları	1 mM			5mM			10 mM		
	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	1923 ± 9	a	100	1923 ± 9	a	100	1923 ±9	a	100
PbCl₂	491 ± 11	b	25	136 ± 8	b	7	61 ±13	b	3
HgCl₂	566 ± 4	b	29	327 ± 6	b	17	160 ±20	b	8
FeCl₃	765 ± 101	b	39	662 ± 24	b	34	170 ±5	b	8
AlCl₃	1104 ± 11	b	57	685 ± 10	b	35	1052 ±780	b	54
MnCl₂	1165 ± 7	b	60	1149 ± 5	b	59	1098 ±5	b	57
ZnCl₂	1389 ± 29	b	72	562 ± 7	b	29	461 ±18	b	23
CaCl₂	1451 ± 14	b	75	1434 ± 6	b	74	1411 ±3	b	73
CuCl₂	1731 ± 9	b	90	875 ± 3	b	45	534 ±6	b	27
NH₄Cl	1904 ± 42	a	98	2185 ± 6	b	113	1994 ±9	b	103
CoCl₂	1941 ± 6	a	100	771 ± 17	b	40	835 ±4	b	43
Na₂O₃Se	1929 ± 10	a	100	1618 ± 6	b	84	1614 ±5	b	83
MgCl₂	1959 ± 3	a	101	1950 ± 33	a	101	1466 ±6	b	76
BaCl₂	2031 ± 9	b	105	1708 ± 12	b	88	1414 ±2	b	73
KCl	2073 ± 32	b	107	1889 ± 4	a	98	1598 ±14	b	83
NaCl	2169 ± 6	b	112	2033 ± 2	b	105	1931 ±4	a	100
LiCl	2229 ± 41	b	115	2134 ± 13	b	110	1923 ±17	a	100
NiCl₂	2322 ± 15	b	120	992 ± 8	b	51	554 ±10	b	28
EDTA	1990 ± 5	a	103	1405 ± 8	b	73	1382 ±15	b	71

4.5.8. Saf Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörler ve Denatürantların Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.12 ve Şekil 4. 22 de sunulmuştur. Denenen tüm inhibitör ve protein denatüranları *A. niger* HBF 39 lipazının aktivitesinde kontrole göre istatistiksel olarak az veya çok inhibisyona neden olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre lipazın triptofan inhibitörü olan NBS, SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan DTT, sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksidasyon ajanı olan DNTB, serin spesifik inhibitörü olan PMSF, karboksil grubu inhibitörü olan CMC ve SH-grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan β -merkaptetanol tarafından inhibe olması bu enzimin aktif merkezinde triptofan, sistein, serin ve karboksil grubu olan (glutamik asit ve aspartik asit) amino asitlerin kataliz işleminde sorumlu olduğu söyleyebiliriz. Ayrıca enzimin yapısında bulunan SH-grubu ve disülfid (-S-S-) gruplarının stabilizasyonda önemli olduğunu düşünmekteyiz. Protein denatürantı olan üre ve SDS'nin *A. niger* HBF 39 lipazında aktivitede azalmaya neden olması, bu enzim için denatürant ajanları olduğunu söyleyebiliriz.

Yapılan literatür araştırmalarında inhibitör ve denatürantların lipaz üzerine etkisinin çok farklı olabileceği görülmüştür. *A.carneus* lipaz aktivitesi üzerine β -merkaptetanol, DTT ve DTNB etki göstermezken, NBS ve PMSF inhibisyona neden olmuşlardır. Bu sonuçlardan enzimin katalizinde serin ve triptofan olduğunu ileri sürmüşlerdir (Saxena vd., 2003). *Yarrowia lipolytica* lipazının (Yu vd., 2007) SDS, *A. niger* AN0512 lipazının β -merkaptetanol, PMSF ve SDS (Liu vd., 2015) tarafından inhibe oldukları bildirilmiştir. *A. terreus* lipazı ise β -merkaptetanolden etkilenmezken, SDS tarafından denatüre olmuştur (Yadav vd., 1998). *N.rileyi* MJ lipazının DTT, PMSF ve β -merkaptetanol tarafından yüksek inhibisyon uğradığını belirlenmiştir (Supakdamrongkul vd., 2010).



Şekil 4.22. *A.niger* HBF 39 lipaz aktivitesi üzerine inhibitörler ve denatüranların etkisi

Çizelge 4.12. *A. niger* HBF 39 lipaz aktivitesi üzerine inhibitörler ve denatüranların etkisi

İnhibitörler	1 Mm			5 mM		
	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X	Kalan Aktivite %	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	1784 ± 28	A	100	1784 ± 28	a	100
NBS	0 ± 0	B	0	0 ± 0	b	0
DTT	825 ± 11	B	46	19 ± 4	b	1
SDS	520 ± 1	B	29	345 ± 18	b	19
ÜRE	610 ± 18	B	34	1165 ± 22	b	65
DTNB	867 ± 12	B	48	409 ± 82	b	22
PMSF	1100 ± 12	B	61	473 ± 3	b	26
CMC	1124 ± 7	B	62	1063 ± 23	b	59
β-Merkaptoetanol	1271 ± 31	B	71	910 ± 34	b	51

4.5.9. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

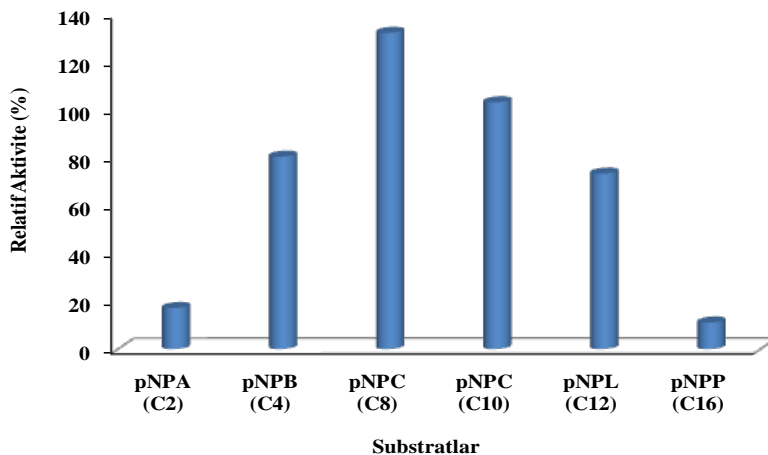
Enzimin yapay substratlara (p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil kaprilat, p-nitrofenil kaprat, p-nitrofenil laurat, p-nitrofenil palmitat) karşı spesifitesi spektrofotometrik olarak standart koşullarda tayin edilmiştir. Substrat olarak pNPL kullanıldığında elde edilen aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiş

ve diğer substratların pNPL'a göre % aktiviteleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.23 ve Çizelge 4.13 de sunulmuştur.

Lipazın yapay substratlar karşısında da geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğu görülmüştür. En düşük enzim aktivitesi genellikle esterazların tercih ettiği bir substrat olan pNPA (%23) kullanıldığında saptanmıştır. Enzim en yüksek aktiviteyi p-nitrofenil kaprilat karşısında göstermiştir (%180). p-nitrofenil kaprilattan sonra en yüksek aktiviteyi sırasıyla p-nitrofenil kaprat (%140), p-nitrofenil bütirat (%109) ve p-nitrofenil laurat (%100) göstermiştir. Bu sonuçlar enzimin orta zincir uzunluğundaki yağ asiti esterlerini tercih ettiğini göstermektedir. Bu durum lipazların genel karakteristik özelliği ile örtüşmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde *Streptomyces rimosus* (Abramić vd., 1999) ve *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 (Zhang vd., 2009) lipazlarının da en yüksek aktivitesini p-nitrofenil kaprilat (C8) karşısında gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 (Ateşlier Z.B.B., 2009) lipazının en düşük enzim aktivitesi pNPA (% 18) kullanıldığında saptanmıştır. Enzim en yüksek aktiviteyi p-nitrofenil kaprilat karşısında gösterdiği bildirilmiştir (% 270).

A.carneus lipazının enzim aktivitesi üzerine substrat spesifite denemesinde en yüksek aktivite p-nitrofenol laurat substratı ile gözlemlenmiştir. Sonrasında en yüksekte en düşüğe doğru aktivite sıralamasında p-nitrofenil miristat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil kaprat, p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil stearat ve en az aktivitesi ise o- nitrofenil palmitat substratı ile ölçülmüştür (Saxena vd., 2003). *N.rileyi* MJ lipazının p-nitrofenil laurat, p-nitrofenil palmitat ve p-nitrofenil kaprat ile yapılan substrat spesifitesi çalışmasında p-nitrofenil kaprat substrat olarak kullanımında, p-nitrofenil palmitata göre 10 kat daha yüksek aktivitede olduğunu gözlemlenmişlerdir (Supakdamrongkul vd., 2010).

Cohnella sp. A01 bakterisinden elde edilen lipaz enzimi üzerine substrat spesifitesi denemelerinde en yüksek aktiviteyi p-nitrofenil bütirat ile gözlemlenmiştir. Sırasıyla diğer yüksekte düşüğe doğru aktivite p-nitrofenil stearat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil hekzonat ile ölçülmüştür. Bu sonuçlar ışığında lipaz enziminin uzun ve kısa zincirli yağ asitlerinde yüksek aktivite gösterdiğini fakat orta uzunluktaki yağ asidi zincirleri taşıyan substratlarla düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Golaki vd., 2015).



Şekil 4.23. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi.

Çizelge 4.13. Enzimin substrat spesifitesinin etkisi

Substrat	Volüm aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
pNP asetat (C2)	328±7	a	23
pNP butirat (C4)	1543±92	b	109
pNP kaprilat (C8)	2538±66	b	180
pNP kaprat (C10)	1980±61	b	140
pNP laurat (C12)	1407±27	b	100
pNP palmitat (C16)	215 ±4	a	15

4.5.10. p-Nitrofenol'ün Molar Absorbans Katsayısı

Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'nın etkisi incelenmeden önce p-nitrofenolün farklı pH'lardaki molar absorbans katsayıları belirlenmiştir. Bunun için p-nitrofenolün pH 5,00-9.0 arasındaki tamponlarda 0,01-0,05 M arası çözeltileri hazırlanmış ve 410 nm'de absorbansları okunmuştur. Daha sonra absorbansa karşı konsantrasyon grafiği çizilerek grafiğin eğiminden molar absorbans katsayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. pNP' ün farklı pH'lardaki molarabsorbans katsayıları

pH	MolarAbsorbans Katsayısı (mM⁻¹cm⁻¹)
5,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na₂HPO₄)	0.28
5,50 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na₂HPO₄)	0.89
6,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na₂HPO₄)	1.87
6,50 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na₂HPO₄)	1.89
7,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na₂HPO₄)	13.28
7,50 (Tris-HCl)	19.32
8,00 (Tris-HCl)	17.92
8,50 (Tris-HCl)	18.46
9,00 (Glisin-NaOH)	18.81

5. SONUÇ

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji fungus stoklarında bulunan, lipaz ürettiği belirlenmiş olan *Aspergillus* sp. suşu, enzim üretimi için seçildi. Morfolojik olarak *A. niger* HBF 39 olarak teşhis edilen suşun ITS gen bölgesinin dizi analizi yapılarak www.pubmed.com adresinde yer alan veritabanında kayıtlı ve tür tanısı yapılmış olan funguslar ile karşılaştırıldı. Karşılaştırılan diziler arasında en yüksek benzerliğin (% 99) *Aspergillus niger* ile olduğu saptandı. *A. niger* HBF 39 izolatının Genbank kayıtlı numarası **KJ530988** dir.

A. niger HBF 39 fungusunun lipaz üretimi için, kültür koşulları optimize edildiğinde en iyi lipaz üretiminin pH'sı 5.5, sıcaklığın 30 °C ve 3. gün (lag fazı) olduğu saptandı.

Optimum koşullarında üretilen *A. niger* HBF 39 kültür ortamı süzildükten sonra elde edilen ham ekstrakt sırasıyla, diyaliz, iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim ve ikinci iyon değişim kromatografisi işlemlerinden geçirilerek %35'lik geri kazanımla 18.5 kat saflaştırıldı.

Saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE yapıldığında enzimin saflaştığı, monomerik yapıda olduğu ve molekül ağırlığının 67.5 kDa olduğu saptandı.

Saflaştırılmış enzimin pH 6.0 ve 30 °C maksimum aktivite gösterdiği, geniş sıcaklık ve pH aralığında stabil olduğu saptandı. Özellikle düşük sıcaklıklarda aktivite göstermesi enzimin soğuğa adapte olmuş, psikrofil bir enzim olduğunu göstermektedir.

Enzimin substratı olarak pNPL (pNP- laurat) için Km değeri 49 µM ve Vmax değeri 139 U/ mL olarak hesaplandı.

Lipaz aktivitesi, Ba²⁺, Li⁺, Na⁺ ve K⁺ katyonları tarafından aktive olurken Fe³⁺, Pb²⁺, Hg²⁺ katyonları tarafından inhibe olmuştur.

NBS, DTT, DNTB, PMSF, CMC ve β-merkaptoetanol tarafından inhibe olması bu enzimin aktif merkezinde triptofan, sistein, serin ve karboksil grubu olan amino asitlerin kataliz işleminde sorumlu olduğu söyleyebiliriz.

Lipaz enziminin geniş bir substrat spesifikliğine sahip olduğu ve orta uzun zincirli yağ asit esterleri için spesifik olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlar da göz önüne alındığında enzimin endüstriyel potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu ve enzimin özelliklerine uygun birçok endüstriyel işlemde kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

İleriki dönemlerde bu lipazın gerçek substratlarına karşı spesifitesi ve pozisyon spesifitesi gibi karakterizasyon çalışmalarına devam edilmesi düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Abramić, M., Leščić, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W., Pigac, J. 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 25: 522-529.
- Akbulut, N. 2014. Pamuk tohumundan (*Gossypium hirsutum* L.) lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, Kütahya.
- Bakır Ateşlier, Z. B. 2009. Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ün lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Bradford, M. M. 1975. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254.
- Cihangir, N., Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnolog**, 20: 193-97.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., Gargouri, Y., Ali, Y. B., Aloulou, A. 2013. Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, 57: 232– 237.
- Farias, C. M., de Souza, O. C., Sousa, M. A, Cruz, R., Magalhães, O. M. C., de Medeiros, E. V., Moreira, K. A., de Souza-Motta, C. M. 2015. High-level lipase production by *Aspergillus candidus* URM 5611 under solid state fermentation (SSF) using waste from *Siagrus coronata* (Martius) Becari. **African Journal of Biotechnology**, 14: 820-828.

- Gupta, N., Sahai, V., Gupta, R. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry** 42: 518–526.
- Golaki, B. P., Aminzadeh, S., Karkhane, A. A. , Yakhchali, B., Farrokh, P., Khaleghinejad, S. H., Tehrani, A. A., Mehrpooyan, S. 2015. Cloning, expression, purification, and characterization of lipase 3646 from thermophilic indigenous *Cohnella* sp. A01. **Protein Expression and Purification**, 109: 120–126.
- Hara, S., Fennell, D. I., Hesseltine, C. W. 1974. Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium and under UV light. **Applied Microbiology**, 27: 1118-1123.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 235-251.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Druet, D., Comeau, L. 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 25: 80–87.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., 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.
- Ionita, A., Moscovici, M., Popa, C., Vamanu, A., Popa, O., Dinu, L. 1997. Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 3: 147-151.
- Jaeger, K. E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Schimossek, K., Zonta, A., Reetz, M. T. 1997. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 3: 3-12.

- Jaeger, K. E., Reetz, M. T. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 16: 396-403.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 22: 307-313.
- Kamini N.R., Fujii T., Kurosu T., IefujiProduction H. Purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry** 36: 317–324.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçiöğlü, U., Dostbil, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. **KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi**, 9: 12-19.
- Koblitz, M. G. B., Pastore, G. M. 2006. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp. **Ciência e Agrotecnologia**, 30: 494-502.
- Kojima, Y., Shimizu, S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU3 80. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 96: 219-226.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- Liu, G., Hu S., Li, L., Hou, Y. 2015. Purification and characterization of a lipase with high thermostability and polar organic solvent-tolerance from *Aspergillus niger* AN0512. **Lipids**, 50: 1155–1163.
- Masomian, M., Rahman R. N. Z. R. A., Salleh A.B., Basri M. 2012. A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ physical factor studies. **World J Microbiol Biotechnol**, 26:1693–1701.

- Metin, K. 2007. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, Sayfa 555-598, Ankara.
- Metin, K., Bakır Ateşlier, Z. B. 2006. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, 38: 628-635.
- Mayordomo, I., Rande-Gil, F., Prieto, J. A. 2000. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 48: 105–109.
- Momsia, T., Momsia, P. 2013. A review microbial lipase-versatile tool for industrial applications. **International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research**. 2: 1-16.
- Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B, Khire, J. M., Gokhale, D. V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, 38: 715-721.
- Nakajima-Kambe, T., Edwinoliver, N. G., Maeda, H., Thirunavukaras K., Gowthaman, M. K., Masaki, K., Mahalinga, S., Kamini, N. R. 2012. Purification, cloning and expression of an *Aspergillus niger* lipase for degradation of poly (lactic acid) and poly (ϵ -caprolactone). **Polymer Degradation and Stability** 97: 139-144
- Nawani, N., Kaur, J. 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 206: 91-96.
- Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J. 2006. A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 290: 17-22.

- Nawani, N., Kaur, J. 2007. Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, 40 (4): 881-887.
- Nelson, D. L., Michael, M. C. 2005. Lehninger biyokimyanın ilkeleri (Çevirici: Nedret K.), 5.Baskıdan çeviri., Palme Yayıncılık, Ankara.
- Ning, An., Zhou, C. H., Zhuang, X. Y., Tong, D. S., Yu, W. H. 2015. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Applied Clay Science**, 114: 283-296.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger N., Soccol V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 29: 119-131.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. and Glenn, D. R. 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, 54: 109-114.
- Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R. 2010. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 64: 1-22.
- Romdhane, I. B. B., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouria A., Belghith, H. 2010. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. **Biochemical Engineering Journal**, 53: 112–120.
- Saxena, R. K., Davidson, W. S., Sheoran, A., Giri, B. 2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, 39: 239-247.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. 2001a. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19: 627-662.

- Sharma, A. K., Tiwari, R. P., Hoondal, G. S. 2001b. Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. **Journal of Basic Microbiol**, 41: 363-366.
- Shu, Z. Y., Yang, J. K., Yan, Y. J. 2007. Purification and characterization of lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chinese Journal of Biotechnology**, 23:96-101.
- Sing, A. K., Mukhopadhyay, M. 2012. Overview of fungal lipase: review. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 166: 486-520.
- Sigurgisladottir, S., Konráðsdóttir, M., Jónsson, A., Kristjánsson, J. K., Mathiasson, E. 2003. Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. **Biotechnology Letters**, 15: 361–366.
- Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A., Wiwat, C. 2010. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 105: 228-235.
- Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Ohnishi K., Sekoguchi J. 1995. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 59: 1199-1203.
- Tran-Dinh, N., Pitt, J. I., Carter, D. A. 1999. Molecular Genotype Analysis of Natural Toxigenic and Nontoxigenic Isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Mycological Research**, 103: 1485–1490.
- Ülker, S., Alpay Karaoğlu, Ş. 2012. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 114: 385–390.
- Verma, N., Thakur, S., Bhatt, A. K. 2012. Microbial lipases: Industrial applications and properties (A Review). **International Research Journal of Biological Sciences**, 1: 88-92.

- Yabe, K., Ando, Y., Ito, M., Terakad, N. 1987. Simple method for screening aflatoxin-producing molds by UV photography. **Applied and Environmental Microbiology**, 53: 230-234
- Yadav, R. P., Saxena, R. K., Gupta, R., Davidson, W. S. 1998. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. **Biothecnology and Applied Biochemistry**, 28: 243-249.
- Yu, M., Qin, S., Tan, T. 2007. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, 42: 384–391
- Zhang, A., Gao, R., Diao, N., Xie, G., Gao, G., Cao, S. 2009. Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 56: 78-84.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nilay Ezgi ÇAKAR

Doğum Yeri ve Tarihi : Kırıkkale / 11.10.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat
Fakültesi Biyoloji Bölümü (2008-2012)

Yüksek Lisans Öğrenimi :

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A) Projeler

- Protocatechuic asit'in (PCA) bir meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki durdurucu ve apoptotik etkisinin belirlenmesi, Nilay Ezgi ÇAKAR, TÜBİTAK-Öğrenci Projesi.2010.
- *Aspergillus* sp.'den Fitaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" ADÜ BAP, FEF13011, Araştırmacı, (2013-2015).
- *Anoxybacillus* sp. HBB 16'dan elde edilen lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu ADÜ BAP, FEF14004, Araştırmacı, (2014-..).
- *Aspergillus niger* HBF 39'dan lipazın üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu" ADÜ BAP, FEF15010, Araştırmacı,(2015-...).

B) Bildiriler

- S. Soyal, N. E. Çakar, K. Metin “*Aspergillus niger* Tarafından Üretilen Fitaz Enziminin Üretimi ve Karakterizasyonu” 22. Ulusal biyoloji kongresi. Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.

- K. Metin, S. Soyal ve N. E. Çakar “*Aspergillus niger* HBF201 Tarafından Üretilen Ekstrasellüler Fitazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015 Afyon.

B) İş Deneyimleri

-Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi –Kan Merkezi Laboratuvarı (2014-2015)

- Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi – (Biyokimya Laboratuvarı (2015- ...)

İLETİŞİM

E-Posta Adresi: nilay-ezgi@hotmail.com

Tarih :20/01/2016