

R. DELEMAR'IN ÜREMESİ VE LİPAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE KARIŞTIRMA VE HAVALANDIRMA HIZLARININ ETKİSİNİN GLUKOZ VEYA MELAS SAKKAROZU VE PFR İÇEREN ORTAMLARDA ARAŞTIRILMASI

Yeşim SAĞ AÇIKEL^{a*}, Mehtap ERŞAN^b, Ünsal AÇIKEL^b

^aHacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe, Ankara, Turkey

^bCumhuriyet Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Sivas, Turkey

vesims@hacettepe.edu.tr, mersan@cumhuriyet.edu.tr, uacikel@cumhuriyet.edu.tr,
unsal.acikel@gmail.com

(Geliş/Received: 06.11.2012; Kabul/Accepted: 12.09.2013)

ÖZET

Lipazlar (triacylglycerol hydrolases) yağ-su arayüzeyinde uzun zincirli açilgliserollerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen hidrolitik enzimlerdir. *Rhizopus delemar*' ın lipaz üretimi için karıştırma hızı, havalandırma hızı ve oksijen taşıyıcı olarak kullanılan perflorokarbon (PFR) miktarının etkisi karbon kaynağı olarak glukoz veya melas sakkarozu kullanılan ortamlarda kesikli bir biyoreaktörde incelenmiştir. Maksimum lipaz aktiviteleri, ana karbon kaynağı olarak glukoz veya melas sakkarozu içeren ortamlarda sırasıyla 43,0 U/L ve 103,12 U/L olarak 150 ve 200 devir/min karıştırma hızlarında büyümenin durgun fazında (fermentasyonun 120. saati) elde edilmiştir. Havalandırma hızının lipaz aktivitesi üzerine etkisi 1-4 vvm aralığında incelenmiş, en yüksek lipaz aktiviteleri karbon kaynağı olarak glukoz veya melas sakkarozu ve %10 PFR içeren ortamlarda 2 vvm havalandırma hızında sırasıyla 102,67 U/L, 171,20 U/L olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *R. delemar*, karıştırma hızı, havalandırma hızı

EFFECTS OF STIRRING AND AERATION RATES ON LIPASE PRODUCTION AND GROWTH OF *R. DELEMAR* IN THE MEDIA CONTAINING GLUCOSE OR MOLASSES SUCROSE AND PFC

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases) are hydrolytic enzymes that can catalyze the hydrolysis of the ester bond of long-chain acylglycerols at the oil-water interface. The effects of stirring rate, aeration rate, and the amount of perfluorocarbon (PFC), as an oxygen carrier, in the nutrient media containing glucose or molasses sucrose as main carbon sources were investigated in a batch bioreactor. The maximum lipase activities in the media containing glucose or molasses sucrose as main C source were found to be 43.0 U/L and 102.83 U/L, respectively, at the stationary phase of growth (120th hour of fermentation), at 150 and 200 revolution per minute stirring rates, respectively. The effect of aeration rate on lipase activity was investigated in range of 1-4 vvm. The maximum lipase activities in the media containing glucose or molasses sucrose and 10% PFC were determined as 102.67 U/L, 171.20 U/L, respectively, at 2 vvm aeration rate.

Keywords: Lipase, *R. delemar*, agitation rate, aeration rate

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Lipazlar, enzimler içerisinde yağ asitlerini sentezleyen veya yağları hidrolizleyen lipolitik enzimler olduğundan önemli bir grup oluştururlar. Lipazlar sulu ortamda katı ve sıvı yağların ve diğer lipidlerin

hidrolizini katalizleyerek diaçilgliserinler, monoaçilgliserinler, gliserin ve serbest yağ asitlerini oluştururlar [1]. Lipaz enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar başlıca üç amaçla kullanılır. Bunlar yağ asidi üretimi için trigliserid hidrolizi, lipid sentezi ve esterlerin interesterifikasyonuna dayanan yağ

modifikasyonudur [2]. Günümüzde mikrobiyal kaynaklı lipazlar, gıda endüstrisinde süt ürünlerinde, içeceklerde, et ve balık üretiminde aroma arttırımında, hayvansal yağların transesterifikasyonunda ve bitkisel yağların hidrolizinde, eczacılıkta transesterifikasyon ve hidroliz reaksiyonlarında, kozmetik sanayiinde kullanılan ürünlerin içeriğindeki kimyasal maddelerin sentezlenmesinde, deri, kağıt ve deterjan endüstrilerinde yağların hidrolizi amacı ile kullanılmaktadır [3-6].

Lipazlar kullanılacakları yerlere göre de farklılık göstermektedirler. Örneğin deterjan üretiminde kullanılacak lipazların yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde aktivite göstermesi gerekmektedir. Bu durumda istenen koşulları sağlayan yeni lipazları üretecek yeni mikroorganizmaların belirlenmesi gerekmektedir [7-9]. Mantarlardan elde edilen lipazlar farklı substrat spesifikliklerinden dolayı gıda ve diğer endüstrilerde bir çok kullanım alanı bulurlar. Misel yapılı mantar *R. delemar*, ikincil değil birincil esterlerin hidrolizi için çok yüksek seçicilik gösteren en az üç dış hücresel lipaz üretir [9, 10]. Lipaz üretiminde karıştırma ve havalandırmanın varlığının özellikle maya ve/veya kamçılı mantar türü mikroorganizmaların lipaz üretimini arttırdığı literatürde kaydedilmiştir [11-13]. Oksijen transfer hızını arttırarak, mikroorganizma üremesini, ürün-enzim üretkenliğini ve lipaz enzimi üretimini arttırmanın bir yoluda, perfluorokarbonlar (PFR) gibi oksijen taşıyıcılarının fermentasyon ortamlarına eklenmesidir [14, 15]. Perfluorokarbonlar, hidrokarbonların hidrojen molekülleri yerine flor konularak sentezlenen petrol-bazlı bileşiklerdir. Bu bileşikler çok kuvvetli karbonflorin bağlarının varlığı sayesinde hem kararlı hem de kimyasal olarak eylemsizlerdir. PFR' lerin aynı zamanda biyolojik olarak da inert ve biyolojik sistemler için zehirleyici olmadıkları bilinmektedir. PFR' de oksijenin çözünürlüğü saf sudakinden 10-20 kez daha büyüktür.

Bu çalışmada ana karbon kaynağı olarak glukoz veya melas sakkarozu içeren ortamlarda, *R. delemar*' ın lipaz aktivitesi ve biyokütle konsantrasyonu üzerine karıştırma hızının etkisi, PFR içeren ve içermeyen ortamlarda havalandırma hızının etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca havalandırma hızları 1-4 vvm aralığında değiştirilerek çözünmüş O₂ profilleri elde edilmiş ve çözünmüş O₂ konsantrasyonunun lipaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

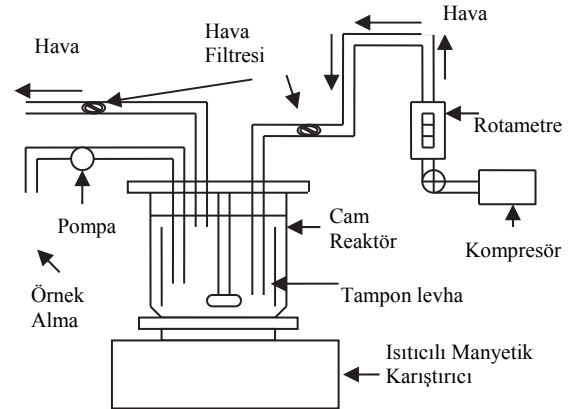
2. MATERYAL ve METOT (MATERIAL and METHOD)

2.1. Mikroorganizma Üretimi ve Lipaz Üretim Gerçekleştirildiği Deney Düzeneği (Experimental Setup for Microorganism Growth and Lipase Production)

R. delemar (NRRL 2872) Amerikan Tarım Bakanlığı'ndan temin edilmiş olup, 100 mL çalışma hacmine sahip, 250 mL' lik erlenlerde, 30 °C sabit

sıcaklık ve 150 devir/min karıştırma hızında çalıştırılan çalkalamalı su banyosunda üretilmiştir. *R. delemar* çoğalması ve lipaz enzimi üretmesi için iki farklı karbon kaynağı glukoz veya melas sakkarozu 1 g/L konsantrasyonunda kullanılmıştır. Kompleks besin ortamının diğer bileşenleri (g/L) olarak; K₂HPO₄ 0,5, KH₂PO₄ 0,5, MgSO₄.7H₂O 0,2, maya özütü 2' dir. Glukoz veya melas sakkarozu içeren ortamlara indükleyici olarak ayçiçeği yağı sırasıyla % 1,0 ve % 0,5 (v/v) eklenmiştir. Optimum aşılama oranı (aşı hacmi/biyoreaktörün üretim hacmi) 5/1000 olarak belirlenmiştir [16].

En uygun karıştırma hızı ve hava giriş hızının belirlendiği çalışmalarda 100 mL çalışma hacmine sahip, 150 mL' lik pyreks camdan yapılmış, silindirik bir biyoreaktör kullanılmıştır (Şekil 1). Biyoreaktörün kapağı üzerinde hava girişi ve çıkışı delikleri, örnek alma deliği ve karıştırıcı mil yatağı bulunmaktadır. Biyoreaktör içinde vorteks oluşumu önleyici tampon levha ile manyetik karıştırıcının bağlı olduğu şaft vardır. Biyoreaktör sabit sıcaklığa ayarlanabilen bir manyetik karıştırıcı üzerinde oturtulmuştur. Biyoreaktör ortamının pH' ı, kesikli karıştırılmalı kaplarda gerçekleştirilen çalışmalarda bulunan en uygun pH 8,0 ve sıcaklık 30±0,5 °C' ye ayarlanmıştır [17]. Hava giriş hızının ve çözünmüş O₂ konsantrasyonunun lipaz aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda karıştırma hızı 100 devir/dak.' da sabit tutulmuştur.



Şekil 1. Karıştırılmalı ve havalandırılmalı biyoreaktör (Stirred and aerated bioreactor)

2.2. Analitik Ölçüm Yöntemleri (Analytical Measurement Methods)

Fermentasyon ortamındaki çözünmüş O₂ konsantrasyonu, masa tipi çift göstergeli, pH/mV/iyon/iletkenlik/çözünmüş O₂/sıcaklık ölçer (PCD 5500) ile bütünleşik kullanılabilen bir O₂ elektrodu ile ölçülmüştür.

Biyoreaktörden belirli zaman aralıklarında, belirli hacimlerde alınan örnekler filtrasyon işleminden geçirildikten sonra, berrak sıvıda enzim aktivitesi

ölçülmüştür. Enzim aktivite tayininde para-nitrophenil palmitate (p-NPP) yöntemi adı verilen spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır [16-18]. 1 U lipaz aktivitesi 37 °C' de, 1 dakikada açığa çıkan 1 µmol p-nitrophenol olarak ifade edilir.

Biyokütle analizi için reaksiyon ortamından alınan belirli hacimdeki örnek daha önceden darası alınmış mavi bant süzgeç kağıdı aracılığı ile süzülür, 8 saat süre ile 80 °C' ye ayarlanmış etüvden alındıktan sonra sabit tartıma gelince süzgeç kağıdının ağırlığı bulunur. Biyokütle analizi fermentasyon ortamlarında türbidimetrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir [19].

3. DENEYSSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA (RESULTS and DISCUSSION)

Kesikli düzende yürütülen fermentasyon çalışmalarının bir kısmı, 100 ml çalışma hacmine sahip erlenlerde, sabit karıştırma hızı (150 devir/min) ve sıcaklıkta (30 °C) orbital karıştırma inkübatörde yürütülmüştür. Bu çalışmalarda ana karbon kaynağı olarak glukoz veya melas sakkarozu, içeren ortamlarda elde edilen maksimum enzim aktivitesi sırasıyla 31,92 U/L, 93,07 U/L olarak belirlenmiştir. Biyoreaktörde karıştırma ve havalandırma hızlarının etkisinin incelendiği deneylerdeki sonuçlar kesikli karıştırma inkübatörde elde edilen maksimum enzim aktiviteleri referans alınarak değerlendirilmiştir.

3.1. Karbon Kaynağı Olarak Glukoz veya Melas Sakkarozu İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamlarda Karıştırma Hızının Etkisi (Effect of Stirring Speed in Media Containing Glucose or Molasses Sucrose as Carbon Source and Sunflower Oil as Inducer)

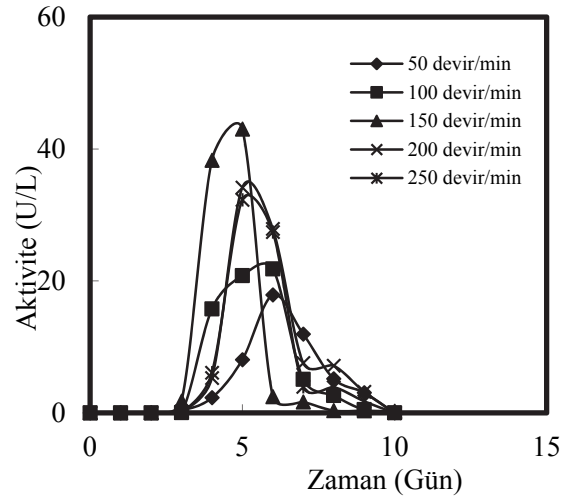
R. delemar ile lipaz enziminin üretimi üzerine karıştırma hızının etkisi, karbon kaynağı olarak glukoz veya melas sakkarozu içeren, bileşimi bölüm 2.1.' de verilen besin ortamlarında ve özellikleri açıklanan biyoreaktörde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Şekil 2' de ana karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamda biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi verilmektedir. Lipaz enzimi aktivitesi *R. delemar* üremesinin durgun evresinde gözlenir. Lipaz mikroorganizma üremesinden bağımsız bir ikincil metabolittir. Lipaz enzimi aktivitesi, fermentasyon ortamının koşullarına bağlı olarak, mikroorganizma üremesinin 4.-5. gününde en yüksek değerine ulaşır. Bundan sonra mikroorganizma üremesinin 6. gününden itibaren ölüm evresine girilmesiyle birlikte enzim aktivitesi düşmeye başlar.

R. delemar bir fungal hücre olduğundan, eğer yeterli karıştırma sağlanmazsa, pelletler oluşturarak topaklaşmaktadır. Bu da kütle transfer kısıtlamaları nedeniyle, hem substratın ve indükleyicilerin mikroorganizma hücreleri içine difüzyonunu, hem de

salgılanan enzimin fermentasyon sıvısına difüzyonunu yavaşlatmaktadır. Maksimum enzim aktivitesi 150 devir/min karıştırma hızında 43,0 U/L olarak elde edilmiş, daha sonra karıştırma hızının 250 devir/min' e kadar artırılması ile kademeli olarak azalmıştır. Ana karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda ise en yüksek enzim aktivitesi 200 devir/min karıştırma hızında elde edilmiştir, daha sonra karıştırma hızının 250 devir/min' e kadar artırılması ile azalmıştır (Çizelge 1). Yüksek karıştırma hızlarında aktivite değerlerinin göreceli olarak azalması, şiddetli karıştırma hızı nedeniyle, arttan kesme kuvvetleri ile mikroorganizma hücrelerinin zarar görmeye başlaması ile açıklanabilir.

Çizelge1. Melas sakkarozu içeren ortamlarda farklı karıştırma hızlarında maksimum lipaz aktiviteleri (Maximum lipase activities obtained at different stirring rates in the media containing molasses sucrose)

Karıştırma Hızı (devir/min)	Maksimum lipaz aktivitesi (U/L)
50	79,94
100	86,09
150	93,07
200	103,12
250	89,95

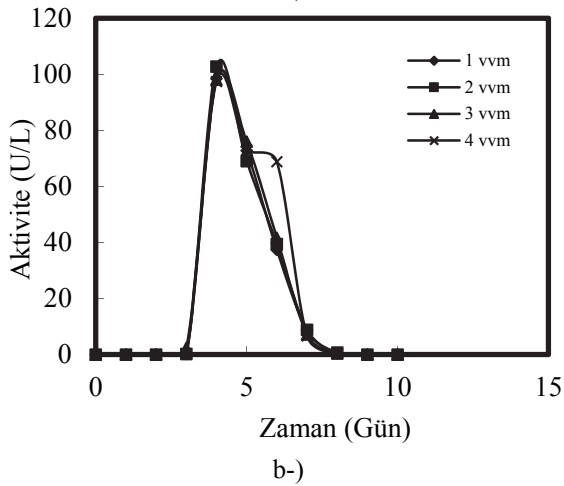
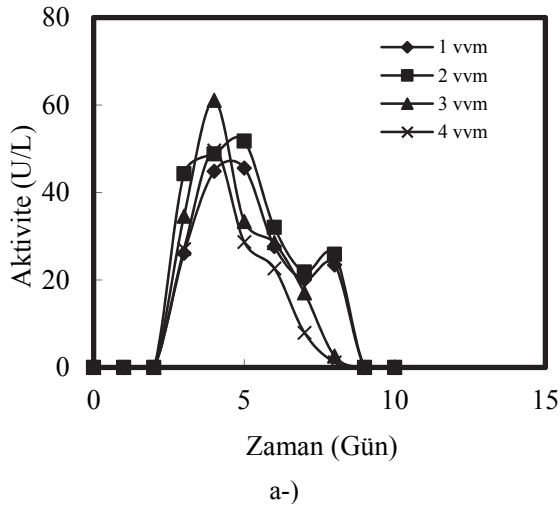


Şekil 2. Glukoz içeren ortamlarda farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (Change of enzyme activities obtained at different stirring rates with time in the media containing glucose)

3.2. Karbon Kaynağı Olarak Glukoz, İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamda Hava Giriş Hızının Etkisi (Effect of Aeration Rate in Medium Containing Glucose as Carbon Source and Sunflower Oil as Inducer)

R. delemar ile lipaz enziminin üretimi üzerine hava giriş hızının etkisi, öncelikle karbon kaynağı olarak glukoz kullanılan besi ortamında incelenmiştir. Farklı hava giriş hızlarında zamanla enzim aktivitelerindeki değişim Şekil 3. a-)’ da verilmektedir. Karıştırma hızı

100 devir/min' de sabit tutulmuştur. Daha yüksek karıştırma hızları, özellikle yüksek hava giriş hızlarında, reaktör içinde vorteks oluşumu ve köpüklenmeye yol açmaktadır. Maksimum enzim aktiviteleri 1 ve 2 vvm hava giriş hızlarında fermentasyonun 5. gününde elde edilirken, 3 vvm ve 4 vvm hava giriş hızlarında maksimum enzim aktivitesi fermentasyonun 4. gününde elde edilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi 3 vvm hava giriş hızında, 61,07 U/L olarak elde edilmiştir. Bu değer havalandırmasız ortamda elde edilen değerden, 1,42 kat daha büyüktür. Ortamda havalandırmanın varlığı hem enzim aktivitesini arttırmış, hem de daha erken ve uzun süreli enzim aktivitesi gözlenmesini sağlamıştır. Örneğin 2 vvm hızda havalandırılan ortamda, fermentasyonun 3. ile 6. günleri arasında 44,27-51,73 U/L arasında kararlı bir enzim aktivitesi gözlenmiştir.



Şekil 3. Farklı hava giriş hızlarında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi: a-) Glukoz içeren ortamlarda; b-) Melas sakkarozu içeren ortamlarda (Change of enzyme activities obtained at different aeration rates with time in the media containing: a-) glucose; b-) molasses sucrose)

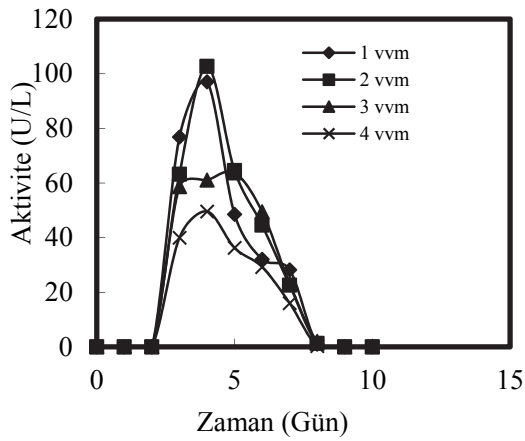
3.3. Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu, İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamda Hava Giriş Hızının Etkisi (Effect of Aeration Rate in Medium Containing Molasses Sucrose as Carbon Source and Sunflower Oil as Inducer)

Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, farklı hava giriş hızlarında zamanla enzim aktivitelerindeki değişim Şekil 3. b-)’ de verilmektedir. Maksimum enzim aktivitesi 2 vvm hava giriş hızında, fermentasyonun 4. gününde 102,83 U/L olarak elde edilmiş olmakla beraber, 1-4 vvm hava giriş hızlarında yakın değerler almaktadır. 4 vvm hava giriş hızında ise fermentasyonun 4. gününden başlayarak, 6. günde dahil olmak üzere 97,47 U/L ile 68,80 U/L arasında yüksek ve uzun süreli enzim aktivitesi gözlenmiştir. Frost ve Moss (1987) tarafından, karıştırma veya hava püskürtme ile sıvının havalandırılmasında kaydedilen ilerlemelerin, tek hücreli organizmalar ve pek çok durumda kamçılı küf mantarlarının lipaz üretimi için çok gerekli olduğu gösterilmiştir [20]. Elibol ve Özer^b (2000) tarafından *Rhizopus arrhizus* ile lipaz üretiminin hücre çoğalmasından ziyade oksijenin varlığına bağlı olduğu gösterilmiştir [15]. O₂ taşınımının artırılması, hem mikroorganizma çoğalması hem de enzim üretiminde artış ve/veya fermentasyon süresinde azalma sağlar. Bu çalışmada *R. delema* ile lipaz üretimine hava giriş hızının etkisi için elde edilen bulgular literatürle uyumludur.

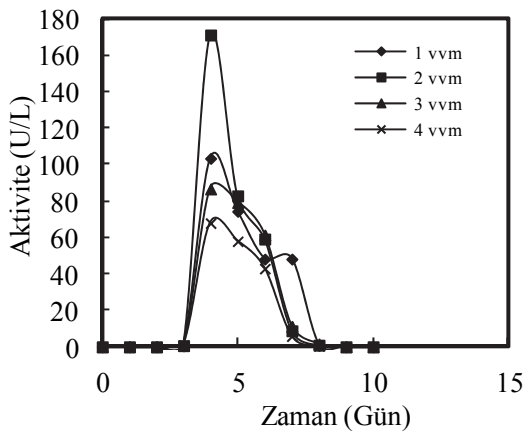
3.4. Karbon Kaynağı Olarak Glukoz, İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı ve PFR İçeren Ortamda Hava Giriş Hızının Etkisi (Effect of Aeration Rate in Medium Containing Glucose as Carbon Source, Sunflower Oil and PFC as inducer)

R. delema ile lipaz enzimi üretimi üzerine havalandırmanın etkisinin artırılması için, ikinci grup deneyler PFR içeren ortamda hava giriş hızları artırılarak gerçekleştirilmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz içeren besi ortamına O₂ taşıyıcısı olarak %10 oranında (v/v) PFR eklenmiştir. Glukoz, ayçiçeği yağı ve O₂ taşıyıcısı olarak da perfluorokarbon içeren ortamda, hava giriş hızları 1-4 vvm arasında artırılmıştır. Farklı hava giriş hızlarında zamanla enzim aktivitelerindeki değişim Şekil 4 a-)’ da verilmektedir. PFR içeren ortamda, 2 vvm hava giriş hızında, fermentasyonun 4. gününde oldukça erken ve yüksek, 102,67 U/L bir enzim aktivitesi elde edilmiştir. Elde edilen bu en yüksek aktivite değeri havalandırmasız ortamdan 2,38 kat, havalandırılmalı ancak PFR içermeyen ortamdan 1,68 kat daha büyüktür. 1 vvm hava giriş hızında fermentasyonun 4. gününde 97,07 U/L enzim aktivitesi elde edilirken, 3 vvm hava giriş hızında fermentasyonun 3. gününden başlayarak 6. günde dahil olmak üzere biraz daha düşük (63,73 U/L) fakat uzun süreli enzim aktivitesi gözlenmiştir. PFR içeren ortamda hava giriş hızının artırılmasının mikroorganizma konsantrasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır, farklı hava giriş

hızlarında elde edilen çoğalma eğrileri Şekil 5. a-)' da verilmektedir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonuna, fermentasyonun 6. gününde 2 ve 3 vvm hava giriş hızlarında ulaşılmış olup sırasıyla 6,82 ve 6,87 g kuru mikroorganizma ağ. /L değerleri elde edilmiştir. Çoğalma eğrisinde 6. günden sonra gözlenen, mikroorganizma konsantrasyonundaki azalma, mikroorganizmanın ölüm evresine girdiğine işaret etmektedir. Bu değerler aynı fermentasyon koşullarında havalandırmasız ortamda elde edilen mikroorganizma konsantrasyonu değeri (6,55 g kuru mikroorganizma ağ. /L) ile karşılaştırıldığında görülmektedir ki hava giriş hızının artırılması ve ortama PFR eklenmesi, mikroorganizma konsantrasyonundan ziyade lipaz enziminin üretimini arttırmıştır. Başka bir deyişle mikroorganizmanın lipaz aktivitesi mikroorganizma çoğalmasından ziyade, hava giriş hızının artırılması ve fermentasyon ortamında O₂ taşınımının hızlandırılması ile artmıştır.

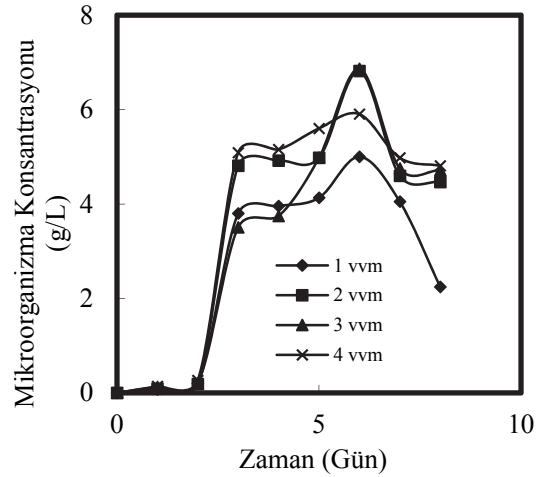


a)

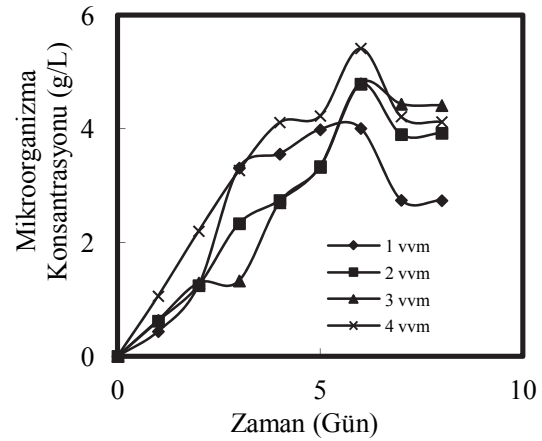


b-)

Şekil 4. % 10 PFR içeren ortamlarda farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesinin zamanla değişimi: a-) Glukoz içeren ortamlarda; b-) Melas sakkarozu içeren ortamlarda (Change of enzyme activities obtained at different aeration rates with time in the media containing 10% PFC and a-) glucose b-) molasses sucrose)



a-)



b-)

Şekil 5. %10 PFR içeren ortamlarda farklı hava giriş hızlarında elde edilen mikroorganizma konsantrasyonlarının zamanla değişimi: a-) glukoz içeren ortamlarda; b-) melas sakkarozu içeren ortamlarda (Change of microorganism concentrations obtained at different aeration rates with time in the media containing 10% PFC and a-) glucose; b-) molasses sucrose)

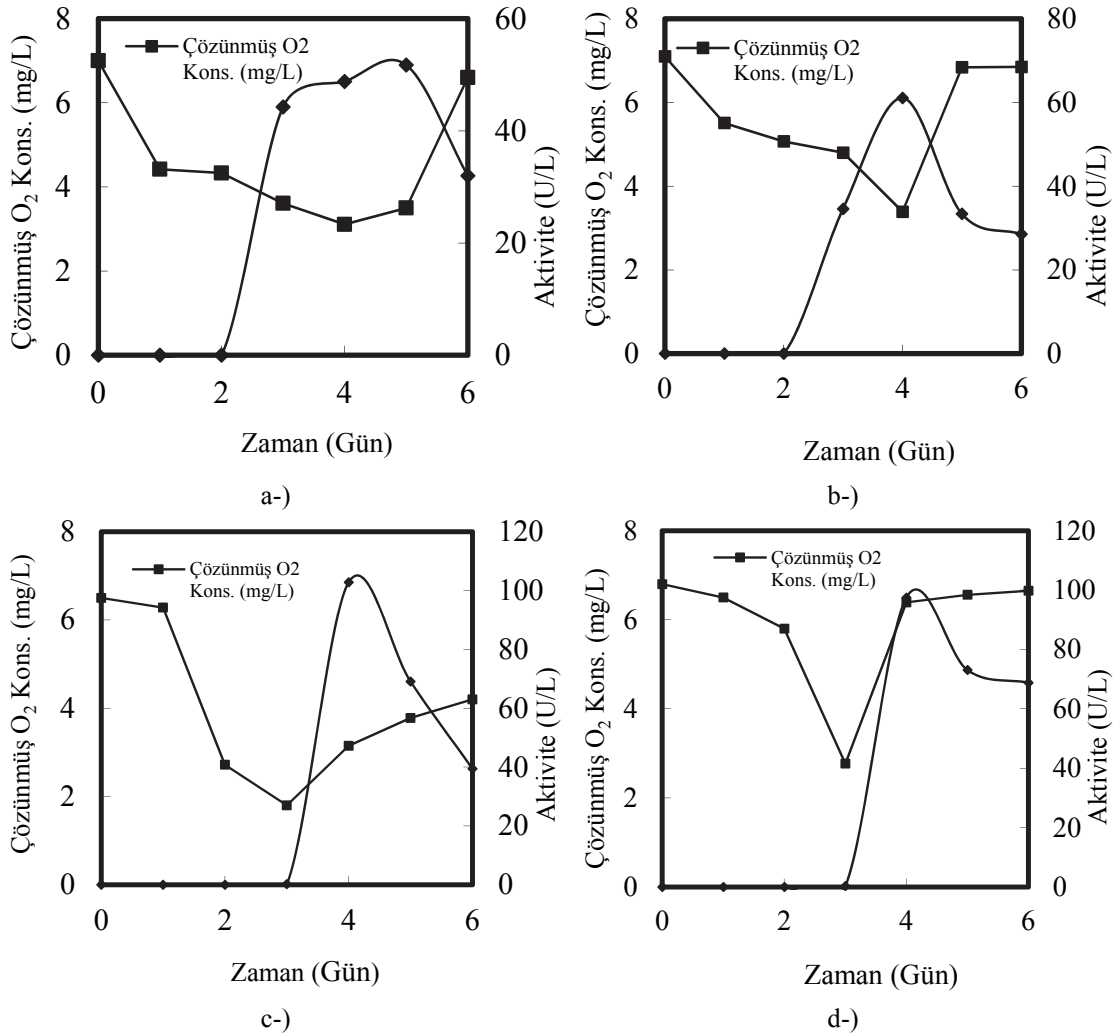
3.5 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu, İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı ve PFR İçeren Ortamda Hava Giriş Hızının Etkisi (Effect of Aeration Rate in Medium Containing Molasses Sucrose as Carbon Source, Sunflower Oil and PFC as Inducer)

Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren biyoreaktör besi ortamına O₂ taşıyıcısı olarak %10 oranında (v/v) PFR eklenmiştir. Farklı hava giriş hızlarında zamanla enzim aktivitelerindeki değişim Şekil 4 b-)' de verilmektedir. 1 vvm hava giriş hızında, 4. ile 7. günler arasında 103,47 U/L ile başlayan fermentasyonun 6. ve 7. günlerinde 48,16 U/L' ye düşen yüksek ve en uzun süreli enzim aktivitesi gözlenmiştir. 2-4 vvm arasında hava giriş hızının artırılması ile fermentasyonun 4. ile 6. günleri arasında yüksek, kararlı aktivite gözlenmiş olup, 2 vvm hava giriş hızında 171,20 U/L en yüksek enzim

aktivitesi elde edilmiştir. Elde edilen bu en yüksek aktivite değeri havalandırmasız ortamdan 1,84 kat, havalandırılmalı ancak PFR içermeyen ortamdan 1,66 kat daha büyüktür. PFR içeren ortamda, maksimum mikroorganizma konsantrasyonu 4 vvm hava giriş hızında elde edilmiş olup, 5,41 g kuru mikroorganizma ağırlığı /L olarak bulunmuştur (Şekil 5. b-). Elibol ve Mavituna (1995) PFR' nin besi ortamlarına katılmasının serbest suspans *Streptomyces coelicolor* hücrelerinin aktivitesini arttırdığı, ve bunun da daha yüksek antibiyotik konsantrasyonları ile sonuçlandığını göstermişlerdir [14]. Elibol ve Özer (2000)^b, fermentasyon ortamlarına PFR eklenmesinin daha yüksek lipaz üretimine neden olduğunu kanıtlamışlardır [15].

3.6 Glukoz ve Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamda Çözünmüş Oksijen Profilleri ve Çözünmüş O₂ Konsantrasyonunun Lipaz Üretimine Etkisi (Effect of Dissolved Oxygen profiles and Dissolved O₂ concentration on Lipase Production in Medium Containing Glucose and Sunflower Oil)

Ana karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamda, havalandırma hızları 1-4 vvm aralığında değiştirilerek çözünmüş O₂ profilleri elde edilmiş ve çözünmüş O₂ konsantrasyonunun lipaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 6. a-)' da 2 vvm hava giriş hızında elde edilen çözünmüş O₂ profili ve lipaz aktivitesinin zamanla değişimi verilmektedir. En düşük çözünmüş O₂ konsantrasyonu fermentasyonun 3.-5. günleri arasında gözlenmiş olup, 3,11-3,61 mg/L arasında değişmiş, fermentasyonun 6. gününde ise 6,6 mg/L'



Şekil 6. Çözünmüş O₂ konsantrasyonunun ve lipaz aktivitesinin zamanla değişimi a-) Glukoz içeren ortam 2 vvm hava giriş hızı, b-) Glukoz içeren ortam 3 vvm hava giriş hızı, c-) Melas sakkarozu içeren ortam 2 vvm hava giriş hızı, d-) Melas sakkarozu içeren ortam 4 vvm hava giriş hızı (Change of dissolved O₂ concentration and enzyme activity with time a-) in the media containing glucose at 2 vvm, b-) in the media containing glucose at 3 vvm, c-) in the media containing molasses sucrose at 2 vvm, d-) in the media containing molasses sucrose at 4 vvm)

ye yükselmiştir. En yüksek enzim aktivitesi ise fermentasyonun, 3. ve 5. günleri arasında gözlenmiştir. Hava giriş hızı 3 vvm' de ise en düşük çözünmüş O₂ konsantrasyonu fermentasyonun 4. gününde 3,39 mg/L olarak gözlenmiş olup, en yüksek enzim aktivitesi de aynı günde elde edilmiştir (Şekil 6. b-)). Ana karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamda, en yüksek lipaz aktivitesinin 3 vvm hava giriş hızında ve 3,39 mg/L çözünmüş O₂ konsantrasyonunda elde edildiği de görülmektedir. Düşük hava giriş hızlarında (1-2 vvm) ortamdaki O₂ konsantrasyonu fermentasyonun 1. gününden itibaren, 3,78-4,42 mg/L' ye kadar düşerken, yüksek hava giriş hızlarında (3-4 vvm), 4,8 mg/L civarına düşmesi için fermentasyonun 3. gününe ulaşmak gerekmektedir [17]. Yüksek hava giriş hızlarında, fermentasyonun 4. gününde çözünmüş O₂ konsantrasyonu minimum değerine ulaştıktan sonra, 5. gün itibariyle hızla yükselerek yaklaşık fermentasyon başlangıcındaki değerine ulaşmaktadır. 2-4 vvm hava giriş hızlarında, en yüksek enzim aktivitesi, çözünmüş O₂ konsantrasyonunun 3,4-3,5 mg/L arasında değiştiği, çözünmüş O₂ konsantrasyonlarında gözlenmiştir.

3.7 Melas sakkarozu ve Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamda Çözünmüş Oksijen Profilleri ve Çözünmüş O₂ Konsantrasyonunun Lipaz Üretimine Etkisi (Effect of Dissolved Oxygen Profiles and Dissolved O₂ Concentration on Lipase Production in Medium Containing Molasses Sucrose and Sunflower Oil)

Ana karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, Şekil 6. c' de 2 vvm hava giriş hızında elde edilen çözünmüş O₂ profili ve lipaz aktivitesinin zamanla değişimi verilmektedir. 2 vvm hava giriş hızında, çözünmüş O₂ konsantrasyonu fermentasyonun, 2. gününde 2,72 mg/L' ye düşmüş, en düşük çözünmüş O₂ konsantrasyonu ise, fermentasyonun 3. gününde 1,8 mg/L olarak elde edilmiştir. Fermentasyonun 4. gününden itibaren ortamdaki çözünmüş O₂ konsantrasyonu yükselmeye başlayarak, 4.-6. günler arasında 3,15-4,20 mg/L arasında göreceli olarak düşük değerlerde bir plato gözlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi ise fermentasyonun 4. gününde ve 3,15 mg/L çözünmüş O₂ konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu hava giriş hızı ve çözünmüş O₂ konsantrasyonunda ayrıca ana karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamda elde edilmiş olan en yüksek enzim aktivitesi değerine ulaşıldığı görülmektedir. Şekil 6. d' de 4 vvm hava giriş hızında elde edilen çözünmüş O₂ profili ve lipaz aktivitesinin zamanla değişimi verilmektedir. 4 vvm hava giriş hızında, en düşük çözünmüş O₂ konsantrasyonu, fermentasyonun 3. gününde 2,77 mg/L olarak gözlenmiş olup, 4.-6. günler arasında hızla yükselerek 6,39-6,65 mg/L arasında plato değerine ulaşmıştır. En yüksek enzim aktivitesi fermentasyonun 4. gününde gözlenmiş, ancak 4.-6. günler arasında düşmekle beraber, daha uzun süreli ve kararlı bir enzim aktivitesi gözlenmiştir. 1-3 vvm hava giriş hızlarında

en yüksek enzim aktivitesi, çözünmüş O₂ konsantrasyonunun 3,0-4,0 mg/L arasında değiştiği çözünmüş O₂ konsantrasyonlarında elde edilmiştir [17].

Mikroorganizma glukoz veya melas sakkarozunun yanısıra O₂' nide ortamda ikincil bir substrat olarak tüketmektedir. Hava giriş hızı arttıkça, fermentasyon ortamlarındaki, mikroorganizma çoğalmasına bağlı olan, çözünmüş O₂ konsantrasyonundaki azalma düşmektedir. Çözünmüş O₂ konsantrasyonu eğrilerini, ters çoğalma eğrileri gibi düşünebiliriz. Mikroorganizma üremesinin maksimum olduğu aralıkta, hava giriş hızlarına da bağlı olarak çözünmüş O₂ konsantrasyonu minimum değerine düşer. Mikroorganizma çoğalma periyodunun 6. gününden itibaren ölüm evresine girildiğinde ise çözünmüş O₂ konsantrasyonu tekrar artarak, başlangıçtaki değerine doğru hızla yükselir. Çözünmüş O₂ konsantrasyonunun minimum olduğu noktada enzim aktivitesi de bir maksimum noktaya ulaşır. Melas sakkarozu içeren ortamda mikroorganizma üremesi daha hızlı olduğu için, durgun evreye glukoz içeren ortama göre daha önce girilir, bu nedenle maksimum lipaz aktivitesi, çözünmüş O₂ konsantrasyonunun minimum olduğu noktada değil, durgun evrenin ortalarına doğru fermentasyonun 4. gününde elde edilir.

4. SONUÇLAR (CONCLUSION)

R. delemar bir fungal hücre olduğundan, eğer yeterli karıştırma sağlanmazsa, pelletler oluşturarak topaklaşmaktadır. Bu da kütle transfer kısıtlamaları nedeniyle, hem substratın ve indükleyicilerin mikroorganizma hücreleri içine difüzyonunu, hem de salgılanan enzimin fermentasyon sıvısına difüzyonunu yavaşlatmaktadır. Ana karbon kaynağı olarak glukoz veya melas sakkarozu içeren ortamlarda, maksimum enzim aktivitesi sırasıyla 150 devir/min ve 200 devir/min karıştırma hızında 43,0 U/L ve 103,12 U/L olarak elde edilmiştir.

Bu nedenle ikinci aşama da O₂ transfer hızını arttırmak için besi ortamlarına %10 oranında (v/v) PFR eklenmesi, lipaz enzimi aktivitesini ana karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamda, havalandırmasız ortama göre 3,22 kat, havalandırılmalı ancak PFR içermeyen ortama göre 1,68 kat arttırmıştır. Ana karbon kaynağı olarak sakkaroz içeren ortamda ise, PFR eklenmesi havalandırılmalı ortamdan 1,84 kat, havalandırılmalı ancak PFR içermeyen ortama göre lipaz enzimi aktivitesini 1,66 kat arttırmıştır.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENTS)

Yazarlar MİSAG-282 nolu proje ile bu çalışmaya verdiği destekten dolayı TÜBİTAK' a teşekkür ederler.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Ellaiah P., Prabhakar T., Ramakrishna B., Thaer Taleb A., Adinarayana K., "Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*", **Process Biochemistry**, 39, 525-528, 2004.
2. Tweddell R.J., Kermasha S., Combes D., Marty A., "Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study", **Enzyme Microb. Technol.**, 22, 439-445, 1998.
3. Isobe K., Akiba T., Yamaguchi S., "Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*", **Agric. Biol. Chem.**, 52 (1), 41-47, 1988.
4. Farooqui A.A., Yang H.C., Horrock L.A., "Purification of lipases, phospholipases and kinases by heparin-Sephadex chromatography", **J. Chromatogr.**, 673 (2), 149-158, 1994.
5. Pabai F., Kermasha S., Morin A., "Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: partial purification, characterization and interesterification of buffer fat", **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 43, 42-51, 1995.
6. Dharmsthiti S., Kuhasuntisuk B., "Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment", **J. Indust. Microbiol. Biotechnol.**, 21, 75-80, 1998.
7. Taipa M.A., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S., "Purification of lipases", **J. Biotechnol.**, 26, 111-142, 1992.
8. Schuepp C., Kermasha S., Michalski M.-C., Morin A., "Production, partial purification and characterisation of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037", **Process Biochem.**, 32, 225-232, 1997.
9. Giuseppin M.L.F., "Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by *Rhizopus delema*", **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 20, 161-165, 1984.
10. Burkert J.F.M., Maugeri F., Rodrigues M.I., "Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* Using factorial design", **Bioresource Technol.**, 91, 77-84, 2004.
11. Vadehra D.A., Harmon L.G. "Factors affecting production of staphylococcal lipase", **J. Appl. Bacteriol.**, 32, 147-150, 1969.
12. Lee S.Y., Rhee J.S., "Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida*", **Enzyme Microbiol. Biotechnol.**, 15, 617-623, 1993.
13. Elibol M., Özer, D^a, "Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*", **Process Biochem.**, 36, 219-223, 2000.
14. Elibol M., Mavituna F., "Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2)", **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 35, 206-210, 1995.
15. Elibol M., Özer D^b, "Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*", **Process Biochem.**, 36, 325-329, 2000.
16. Açikel Ü., Erşan M., Sağ Açikel Y., "The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. Delema*", **Turk J Biol.**, 35-44, 2011.
17. Sağ Açikel Y., **Rhizopus delema ile lipaz üretimi**, Proje no: MİSAG 282, TÜBİTAK, 2006.
18. Wonderwülbecke T., Kieslich K., Erdman H., "Comparison of lipases by different assays", **Enzyme and Microbial Technology**, 14, 631-639, 1992.
19. Açikel, U., Erşan, M., "Acid phosphatase production by *Rhizopus delema*: A role played in the Ni(II) bioaccumulation process", **Journal of Hazardous Materials**, 184, 632-639, 2010.
20. Frost GM, Moss DA., "Production of enzymes by fermentation", **Biotechnology**, Germany:VCH Verlagsgesellschaft mbh, 7a, 65-211, 1987.