

Candida utilis MAYASIYLA LİPAZ ENZİMİ AKTİVİTESİNİN FARKLI ORTAM KOŞULLARINDA İNCELENMESİ

Neşe KEKLİKÇİOĞLU ÇAKMAK, Ünsal AÇIKEL

Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Sivas
nkeklkcioglu@gmail.com, unsal.acikel@gmail.com

(Geliş/Received: 15.07.2014; Kabul/Accepted: 24.07.2015)

ÖZET

Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar, EC 3.1.1.3), yağ-su ara yüzeyinde, uzun zincirli açilgliserollerin, ester bağlarının hidrolizini katalizleyen hidrolitik enzimlerdir. Bu çalışmada *Candida utilis* mayasının lipaz enzimi aktivitesi üzerine başlangıç pH, başlangıç sakkaroz derişimi, aktivatör ve inhibitörlerin etkileri araştırılmıştır. *Candida utilis* mayasının üremesi ve lipaz enzimi üretimi için optimum pH değerinin 4 olduğu tayin edilmiştir. Lipaz enzimi aktivitesinin incelendiği deneysel çalışmalar için hazırlanan besin ortamlarında karbon kaynağı olarak bir şeker endüstrisi atığı olan melas kullanılmıştır. Melas sakkarozunun ana karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamda başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla lipaz enzimi aktivitesinin arttığı görülmüştür. Besin ortamına soya, mısır, zeytin, ayçiçek ve kanola yağları eklenmiş ve enzim aktivitesini artırıcı etkileri incelendiğinde en yüksek aktivite artışı, ortama %1,25 soya yağı eklendiğinde 788,5 U/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon ortamında bulunan Cu (II) ve Ni (II) metal iyonlarının lipaz aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü ayrıca Ni (II)' nin aktiviteyi azaltıcı etkisinin Cu (II)' ye göre daha fazla olduğu sonucu elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *Candida utilis*, Cu (II), Ni (II), melas, inhibisyon

STUDY OF LIPASE ENZYM ACTIVITY WITH *Candida utilis* YEAST IN DIFFERENT MEDIA CONDITION

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3) are hydrolytic enzymes that can catalyze the hydrolysis of the ester bond of long chain acylglycerols at the oil-water interface. In this study; the effects of initial pH, initial sucrose concentration, activators and inhibitors on *Candida utilis* yeast, lipase enzyme are searched. It is qualified that the optimum pH value for growth rate of *Candida utilis* yeast and production of lipase enzyme is 4. Molasses which is a remnant of sugar industry is used as a main carbon source in nutrient media that is prepared for experimental studies in which lipase enzyme activity is worked out. In the media in which molasses is used as a main carbon source, it is observed that lipase enzyme activity increases with the increase of initial sucrose concentration. Soybean oil, corn oil, olive oil, sunflower oil and canola oil are added to the nutrient media and when the additive effect of enzyme activity is observed it is found out that the highest activity increase is 788,5 U/L with the addition of 1,25% soybean oil. The result is that; Cu(II) and Ni(II) metal ions in the fermentation media lower the lipase activity severely and besides, lowering effect of Ni(II) is much more than that of Cu(II).

Keywords: Lipase, *Candida utilis*, Cu (II), Ni (II), molasses, inhibition

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Enzimler metabolik reaksiyonları hızlandıran, protein yapısında olan ve biyoteknolojik yöntemler ile üretilen ticari öneme sahip ürünlerdir. Günümüzde bilinen 4000 adet enzim vardır ve bunların yaklaşık olarak 200 tanesi endüstriyel olarak kullanılmaktadır [1]. Lipazlar,

triglisidlerin, di ve monoglisidlere, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen ayrıca belli şartlar altında gliserol ve yağ asitlerinden triglisidleri meydana getiren (ters tepkimeyi oluşturan) ve endüstride geniş uygulama alanı bulan biyolojik katalizörlerdir [2,3]. Lipazların büyük çoğunluğu ticari olarak üretilirler. Ticari lipazlar ise genellikle

mikrobiyal kaynaklıdır. Lipaz üreten mikroorganizmalar; bakteriler, mayalar ve funguslardır [2]. Mikrobiyal lipazların üretiminde çoğunlukla karbon kaynağı olarak daha ekonomik olan zeytinyağı, ayçiçek, soya, fındık, kanola, susam, pamuk, buğday, yer fıstığı ve palmye yağları gibi bitkisel yağlar kullanılmaktadır. Yağlı bir ortamda çoğalan mikroorganizmalar, lipaz üretme potansiyeline sahiptir. Mikroorganizmalar yağları karbon kaynağı olarak kullanırken bir yandan da lipaz üretmektedirler. Biyoteknolojinin sürekli yeni arayışlar ve mevcut prosesleri geliştirme çabası içerisinde olmasından dolayı mikrobiyal kaynaklı lipaz üretimi büyük bir hız kazanmıştır. Mikrobiyal lipazların, kimyasal üretiminde (esterlerin sentezi ile), gıda endüstrisinde [4], atık su arıtımında [5,6], kağıt sektöründe [3], ilaç sanayinde [7], deri sanayinde [8] ve tıp [9, 10, 11, 12] alanında kullanımı son yıllarda oldukça yaygın hale gelmiştir. Lipazların özellikle deterjan endüstrisinde kullanımı en yaygın halde kullanılan endüstridir [3,13]. Deterjan üretiminde lipazlar yağları hidroliz etme özellikleri ile yağlı lekelerin çıkarılmasında büyük bir kullanım alanı bulmuştur. Deterjan lipazları, farklı bileşimdeki yağların parçalanabilmesi için düşük substrat özelliğine sahip olmalı, sert yıkama koşullarına ve çok sayıda deterjan formülasyonlarının önemli bileşenleri olan surfaktan ve diğer enzimlerin zararlı etkilerine karşı dayanabilmelidir.

Candida utilis (yem maya) mayaların şeker metabolizması üzerinde fizyolojik çalışmalar için popüler bir mikroorganizmadır [14]. *Candida* türü maya tüm maya türlerinin yaklaşık dörtte birini içeren heterojen bir sınıftır. Crabtree-negatif mayalarının içerisinde yer alan *Candida* türü maya en yüksek solunum aktivitesine sahip, biyomalzemelerin üretiminde büyük avantaj sağlayan, aktif glukoz taşınımında etkili bir mayadır [15]. *Candida utilis*, yüksek protein içeriği ve iyi bir amino asit profili gösterir [16, 17]. Lipaz enzimi üretebilen *Candida utilis* mayası, geniş bir kullanım alanına sahiptir ve 6-aminopenisillanik asit, B6 vitamini, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), flavin adenin dinükleotid (FAD), metil ketonlar, sitrik asit, riboflavin, triptofan ve biyokütle üretiminde kullanılır. Optimum çoğalma sıcaklığı 0 – 50 °C olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında ürer. En iyi üreme 25 – 30°C’ de olmaktadır. Hücre çapı 1–10 µm aralığında değişmektedir. Maya özütü, glukoz, sülfat ve potasyum gibi besinleri içeren ortamlarda özellikle pH 4,0 – 4,5 aralığında hızlı büyürler. Besin ortamının çok asidik olmaması kaydıyla diğer pH’ larda da ürerler.

Bu çalışmada *Candida utilis* mayasının lipaz enzimi aktivitesi üzerine başlangıç pH, başlangıç sakkaroz derişimi, aktivatör ve inhibitörlerin etkileri araştırılarak optimum şartlar belirlenmiştir.

2. MALZEME ve YÖNTEM (MATERIAL and METHOD)

2.1 Mikroorganizma Ve Büyüme Ortamı (Microorganism And Growth Media)

Çalışmamızda kullanılan *Candida utilis* mayası Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü’ nden temin edilmiş ve buzdolabında +4°C’ de muhafaza edilmiştir. Mikroorganizmaların üretiminde karbon kaynağı olarak bir şeker endüstrisi atığı olan melas kullanılmış ve Ankara şeker fabrikasından temin edilmiştir. Deneysel çalışmalar 100 mL çalışma hacmine sahip 250 mL’ lik steril erlenlerde 25°C sabit sıcaklıkta ve 150 devir/dk karıştırma hızında çalışan çalkalayıcıda kesikli olarak belirli zaman aralıklarında 4 saate kadar örnek alınarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel ortamda enzim aktifleştiriciler, metal iyonu içeren ve içermeyen besin ortamlarına alıştırılmış ve üstel üreme evresine gelmiş mikroorganizma çözeltilerinden 1 mL aşu alınarak deney ortamına eklenmesiyle başlatılmıştır. Şekerin kristallenme yolu ile elde edilmesiyle şurup olarak geriye kalan melas yaklaşık olarak %50 oranında şeker (sakkaroz) içermektedir. *Candida utilis* mayasının çoğalması ve lipaz enzimi üretimi için hazırlanan sıvı besin ortamlarında 1–10 g/L aralığında değişen derişimlerde melas sakkarozu, 0,5 g/L K₂HPO₄, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,2 g/L MgSO₄.7H₂O ve 2 g/L maya özütü kullanılmıştır. Enzim üretimi için ortam pH’ sı 2–5 aralığında ayarlanarak optimum aktivite pH değeri belirlenmiştir. Melas sakkarozu içeren ortamlara indükleyici yağlar %0,25–1,25 aralığında, Cu (II) ve Ni (II) metal iyonları ise ortama 25–250 mg/L aralığında eklenmiştir. Optimum aşılama oranı (aşu hacmi(mL)/biyoreaktörün üretim hacmi(mL)) 5/1000 olarak belirlenmiştir. Üreme çalışmaları için hazırlanan besin ortamları otoklavda 15 dk süresince 121°C ve 2 atmosfer basınçta sterillemiştir.

2.2 Analitik Ölçüm Yöntemleri (Analytical Measurement Methods)

Belirli zaman aralıklarında fermantasyon ortamlarından steril olarak alınan örnekler santrifüjleme işleminden geçirilerek, sıvı kısım metal iyonları, sakkaroz derişimi ve enzim aktivite tayininde, dipte çökelen kısım ise mikroorganizma derişiminin tayininde kullanılmıştır. Enzim aktivite tayininde para nitrofenil palmitat (*p*-NPP) yöntemi adı verilen spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır [18–20]. Bu yöntem 410 nm dalga boyunda para-nitrofenil palmitatın spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanır. Lipaz aktivitesinin bir birimi (U) 1 dakikada 1 mikromol *p*-nitrofenolü hidrolize etmek için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanır [21].

Fermantasyon ortamından alınan örneklerdeki yağ maya derişimi, g/L cinsinden spektrofotometrik olarak 360 nm’ de okunarak tayin edilmiştir. Glukoz tayininde sakkaroz derişimi g/L cinsinden,

sakkarozun dinitrosalisilikasit (DNS) ile verdiği kompleks yardımıyla spektrofotometrik olarak 575 nm' de okunarak elde edilmiştir [22]. Cu (II) ve Ni (II) içeren deney ortamlarından alınan serbest Cu (II) ve Ni (II) derişimi, bu iyonların C₅H₁₂NOS₂ (sodyum dietil ditiyokarbomat) ile yaptığı kompleks yardımıyla spektrofotometrik olarak 460 nm' de okunarak tayin edilmiştir.

2.3 Mikroorganizma Özgül Üreme Hızı (The Specific Growth Rate Of Microorganism)

Kesikli sistemde üstel üreme evresinde mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi özgül üreme hızı ile ifade edilir ve Eşitlik 1 ile verilir.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

t=0 anında X=X₀, t=t anında X=X sınır koşullarında Eşitlik 1' in integrasyonu ile Eşitlik 2 elde edilir.

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (2)$$

Bu eşitliklerde;

μ : Özgül üreme hızı (sa⁻¹)
X: Kuru mikroorganizma derişimi (g/L)
t : Zaman (sa)

2.4 Metal İyonu İçermeyen Ortamda Büyüme Kinetiğinin Modellenmesi (Modeling Of Growth Kinetics In Absence Of Metal Ion Media)

Kesikli sistemde substrat inhibisyonunun gözlenmediği durumda, özgül üreme hızı ile mikroorganizmanın üreme hızını kontrol eden besin maddesi (substrat) arasındaki ilişki Monod eşitliği [23] ile verilir (Eşitlik 3).

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (3)$$

Burada S >> K_s olduğu zaman;

μ : Özgül üreme hızı (sa⁻¹)
 μ_m : Maksimum özgül üreme hızı (sa⁻¹)
K_s : Doygunluk sabiti (g/L)
S : Başlangıç sakkaroz derişimi (g/L)

Eşitlik 3' ün doğrusallaştırılmış şekli Eşitlik 4 ile gösterilir.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} \quad (4)$$

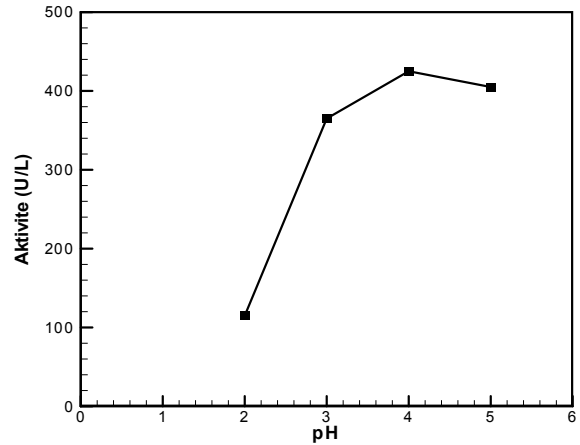
1/ μ ' ye karşı 1/S grafiğinin, x eksenini kesim noktasından μ_m , doğrunun eğiminden ise K_s bulunur. Düşük K_s değeri mikroorganizmanın düşük substrat derişimlerinde de hızlı ürediğini gösterir.

3. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA (EXPERIMENTAL FINDINGS AND DISCUSSION)

Kesikli karıştırmalı kaplarda, *Candida utilis*' in lipaz enzim aktivitesi üzerine etkileri başlangıç pH, başlangıç sakkaroz derişimi, aktivatör ve metal iyonlarının varlığı gibi farklı çevresel faktörlerin fonksiyonu olarak incelenmiştir.

3.1 Lipaz Enzimi Aktivitesine Başlangıç Ph' Sının Etkisi (The Effect Of İnitial Ph On Lipase Enzyme Activity)

Ortam pH' sı mikroorganizmanın enzim aktivitesi göstermesi için en önemli parametrelerden biridir. Şekil 1' den başlangıç pH' sındaki artışın enzim aktivitesini artırdığı ve pH 4 değerinde maksimum enzim aktivitesinin 425 U/L olarak elde edildiği görülmektedir. Bu grafikten yola çıkarak en yüksek enzim aktivitesine pH 4 değerinde ulaşılmış ve bundan sonra yapılan, aktivatör ve metal iyonları deneyleri sabit pH 4' de yapılmıştır.

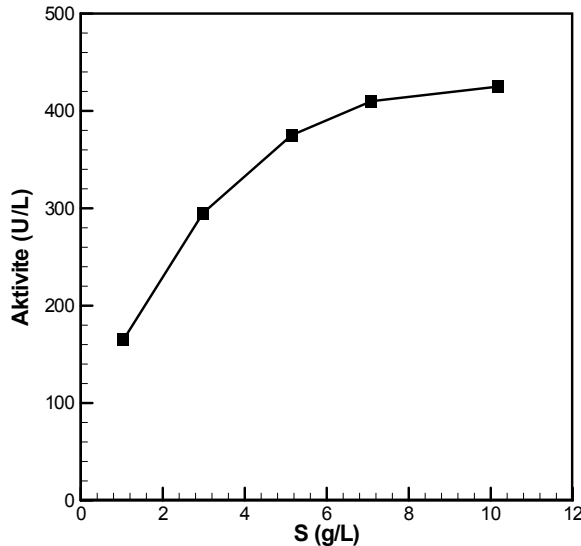


Şekil 1. *Candida utilis* için başlangıç pH' sının enzim aktivitesi üzerine etkisi (Başlangıç sakkaroz derişimi: 10 g/L; T: 25°C; Karıştırm Hızı: 150 devir/dakika) (Effect on enzyme activity of the initial pH for *Candida utilis* (İnitial sucrose concentration: 10 g/L; T: 25°C; Stirring rate: 150 rpm))

Babu ve Rao (2007), *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 ile yaptıkları çalışmada ortam pH' sını 6,4–6,8 aralığında tutarak lipaz aktivitesi üzerinde çalışmışlardır [2]. Preetha ve Viruthagiri (2007), *Rhizopus arrhizus* ile yaptıkları deneysel çalışmada ortam pH' sını 5,3–5,6 aralığında tutarak optimum lipaz aktivitesine ulaştıklarını savunmuşlardır [24]. Ertuğrul vd. (2007) *Bacillus* sp. ile yaptıkları çalışmada başlangıç pH etkisine bakmışlar ve optimum pH değerinin 6 olduğunu ifade etmişlerdir [25]. Sonuç olarak farklı maya türleri ile yapılan enzim aktivitesi çalışmalarında ortam pH' sının değişiklik gösterdiği ve buna bağlı olarak enzim aktivitesinin arttığı ya da azaldığı ortaya çıkmıştır.

3.2 Lipaz Enzimi Aktivitesine Başlangıç Sakkaroz Derişiminin Etkisi (The Effect Of Initial Sucrose Concentration On Lipase Enzyme Activity)

Lipaz enzimi aktivitesine başlangıç sakkaroz derişiminin etkisi günümüze kadar yapılan birçok çalışmada gözlenmiştir. Fakat bugüne kadar *Candida utilis* mayası ile sakkaroz derişiminin enzim aktivitesi üzerine yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Preetha ve Viruthagiri (2007), *Rhizopus arrhizus* ile yaptıkları çalışmada karbon kaynağı olarak glikoz, zeytinyağı, mısır yağı ve gliserol kullanmışlar ve en yüksek aktivite artışını glikozda 1,1 U/mL olarak gözlemişlerdir [24]. Açıkkel vd. (2011), karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve sakkarozun birlikte kullanıldığı durumda *Rhizopus delemar* ile yaptıkları çalışmada en yüksek lipaz aktivitesine sakkaroz derişimi 5g/L olduğunda 92,27 U/L olarak ulaşmışlardır [18]. Şengel vd. (2006) *Saccharomyces sp.*'nin aktif ve kararlı lipaz üretimine, karbon kaynağı olarak bitkisel yağ, yağ asidi, yağ asidi esterleri ve glukozun farklı derişimlerinin etkisini inceledikleri çalışmada ortama % 0,25, 0,5 ve 1 oranlarında glukoz eklendiğinde yüksek glukoz derişiminin substrat inhibisyonuna yol açtığı ve enzim aktivitesini olumsuz yönde etkilediğini savunmuşlardır [26]. Sağ Açıkkel vd.(2013) *Rhizopus delemar* üremesi ve lipaz üretimi üzerinde yaptıkları çalışmada %10 perflorokarbon (PFR) içeren ortamda karbon kaynağı olarak glukoz veya melas sakkarozu kullanıldığı durumda 2 vvm havalandırma hızında en yüksek aktiviteye sırasıyla 102,67 U/L ve 171,20 U/L olarak ulaşmışlardır. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi Şekil 2' de verilmiştir [27].



Şekil 2. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi (pH: 4, T: 25°C; Karıştırma Hızı: 150 devir/dakika) (Effect on enzyme activity of the initial sucrose concentration for *Candida utilis* (pH:4; T: 25°C; Stirring rate: 150 rpm))

Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu kullanılan bu çalışmada sakkarozun enzim üretimini ve aktivitesini doğrudan etkileyen bir parametre olduğu Şekil 2' den açıkça görülmektedir. Başlangıç sakkaroz derişimi (S) etkisi 1-10 g/L derişim aralığında incelendiğinde başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla lipaz enzimi aktivitesinin arttığı görülmüştür. En yüksek aktivitenin ise başlangıç sakkaroz derişimi 10 g/L olduğu durumda 425 U/L olduğu bulunmuştur.

3.3 Lipaz Enzimi Aktivitesine Aktivatörlerin Etkisi (The Effect Of Activators On Lipase Enzyme Activity)

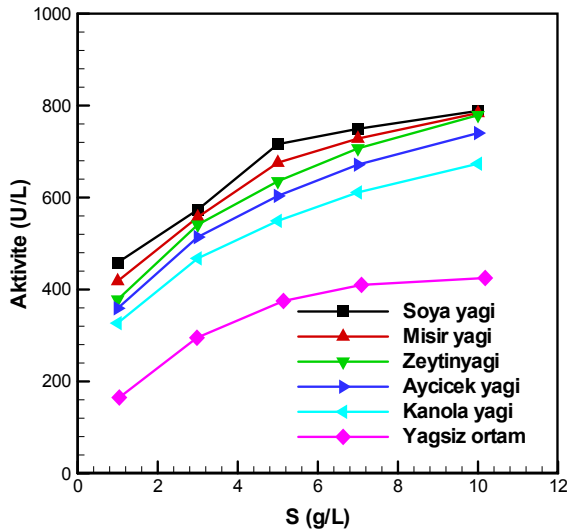
Candida utilis mayası ile lipaz enzimi aktivitesine farklı tür ve derişimlerde yağların etkisi araştırılmıştır. Besin ortamına enzim aktivitesini artırıcı olarak %0,25–1,25 oranında soya, mısır, zeytin, ayçiçek ve kanola yağları eklenmiş ve enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir.

Tablo 1' de ortamda 10 g/L sakkaroz ile %0,25 ve 1,25 oranlarında yağ varken bu yağların normal besin ortamına göre gösterdikleri enzim aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarının artış oranları görülmektedir. Tablo 1' den sabit sakkaroz derişiminde bütün yağlarda ortama eklenen yağ miktarı arttıkça enzim aktivitesinin, üreyen mikroorganizma özgül hızı ve mikroorganizma miktarının arttığı görülmektedir. En yüksek aktivite artışının ortama %1,25 soya yağı eklendiğinde 788,5 U/L olduğu en düşük aktivite artışının ise ortama %0,25 kanola yağı eklendiğinde 450,6 U/L olduğu görülmektedir. Buradan çok düşük derişimlerde dahi ortama eklenen yağların, yağsız ortama kıyasla aktiviteyi artırıcı etkilerinin olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Babu ve Rao (2007), *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 ile yaptıkları çalışmada zeytinyağı, ayçiçek yağı ve tribütürin enzim aktivitesine olan etkilerini incelemiş ve en yüksek aktiviteye ayçiçek yağı ile 2,5 U/mL olarak ulaştıklarını ifade etmişlerdir [2]. Açıkkel vd. (2011), *Rhizopus delemar* ile lipaz aktivitesine farklı aktivatörlerin etkilerini incelemiş ve en yüksek aktiviteyi ayçiçek yağı ile 93,07 U/L olarak bulduklarını ayrıca bu değer yağsız ortama göre aktivite artışının 19,7 kat daha fazla olduğunu savunmuşlardır [18]. Keklikcioğlu ve Açıkkel (2010), *Candida utilis* mayası ile yaptıkları çalışmada en yüksek aktivite artışına ortama %1,25 soya yağı eklendiğinde ulaşmışlardır [28].

Şekil 3' de aktivatör olarak yağların kullanıldığı besin ortamlarında başlangıç sakkaroz derişimi 1-10 g/L aralığında değiştirilerek yağ içeren ortamlarda sakkaroz derişiminin etkisi incelenmiştir. Burada tüm yağlarda artan sakkaroz derişimi ile enzim aktivitesinin arttığı ayrıca en yüksek aktivitenin ortamda hacimce %1,25 soya yağı varken 10 g/L sakkaroz derişiminde elde edilmiş olduğu görülmektedir.

Tablo 1. Farklı ortamlarda, lipaz aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve kuru mikroorganizma derişimlerinin artış oranı yüzdeleri (In different medium, percentage increase of lipase enzym activities, specific growth rate of microorganism and dried microorganism concentration)

Yağ Oranı	Yağ	Aktivite (U/L)	Aktivite Artış Oranı (%)	μ (1/sa)	Özgül Üreme Hızı Artış Oranı (%)	X (g/L)	Kuru Mikroorganizma Derişimi Artış Oranı (%)
%0	-	425,0	-	0,222	-	2.85	-
%0,25	Soya	585,6	37,8	0,281	26,6	3,18	11,6
	Mısır	556,3	30,9	0,274	23,4	3,15	10,5
	Zeytinyağı	527,0	24,0	0,268	20,7	3,12	9,4
	Ayçiçek	500,7	17,8	0,251	13,1	3,06	7,3
	Kanola	450,6	6,0	0,236	6,3	3,00	5,2
%1,25	Soya	788,5	85,5	0,380	71,2	3,45	21,0
	Mısır	783,9	84,4	0,371	67,1	3,41	19,6
	Zeytinyağı	779,2	83,3	0,362	63,0	3,38	18,6
	Ayçiçek	740,2	74,1	0,326	46,8	3,32	16,5
	Kanola	673,6	58,5	0,300	35,1	3,25	14,0

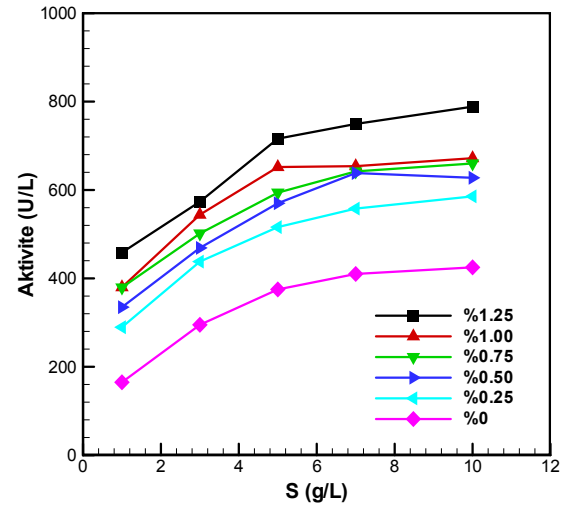


Şekil 3. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin, hacimce %1,25 oranında katılan farklı yağlar ile değişimi (Change of enzyme activities obtained at different initial sucrose concentration with containing 1,25% by volume different oils for *Candida utilis*)

Şekil 4' de farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı miktarlardaki soya yağı ile değişimi verilmiştir. Burada sabit sakkaroz derişiminde artan soya yağı miktarı ile aktivitenin açık bir şekilde arttığı görülmektedir. Yapılan bu çalışmaya benzer olarak Şengel vd. (2006) *Saccharomyces* sp.' nin aktif ve kararlı lipaz üretimine farklı yağların karbon kaynağı olarak kullanıldığı durumda en yüksek aktivitenin soya yağı ile elde edildiğini savunmuşlardır [26].

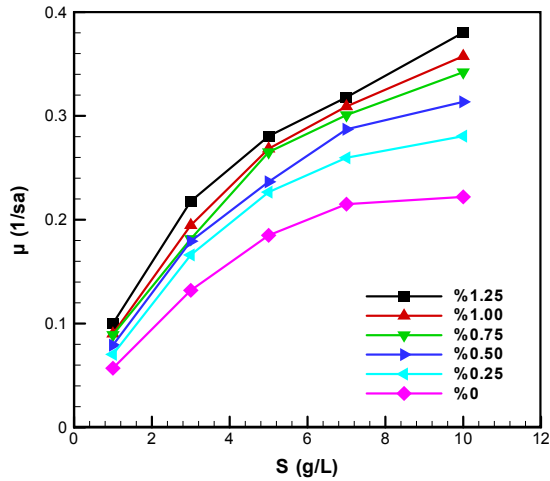
Soya yağı dünya çapında en çok kullanılan bitkisel yağdır ve oldukça fazla çoklu doymamış yağ içerir. Omega 3 yağ asidi bakımından zengindir ve bu

nedenlerden dolayı besin özellikleri yüksek kabul edilir [29]. Yapılan bu çalışmada soya yağı içeren ortamın yüksek aktivite vermesinin nedeni soya yağının protein ve aminoasit bakımından oldukça zengin oluşu, lezitin içermesi, linoleik ve linolenik yağ asitlerini içermesi ve çoklu doymamış yağ açısından oldukça zengin oluşu ile açıklanabilir.

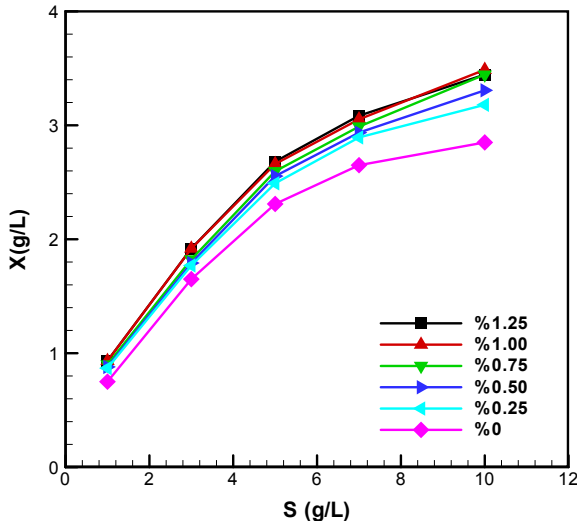


Şekil 4. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı oranlardaki soya yağı ile değişimi (Change of enzyme activities obtained at different initial sucrose concentration with different rates of soybean oil for *Candida utilis*)

Candida utilis için farklı miktarlarda soya yağı içeren ortamda başlangıç sakkaroz derişiminin özgül üreme hızı ve kuru mikroorganizma derişimi üzerindeki etkisi sırasıyla Şekil 5 ve 6' da verilmiştir. Artan başlangıç sakkaroz derişimi ile soya yağının farklı tüm miktarlarında özgül üreme hızı ve kuru mikroorganizma derişiminin arttığı görülmektedir.

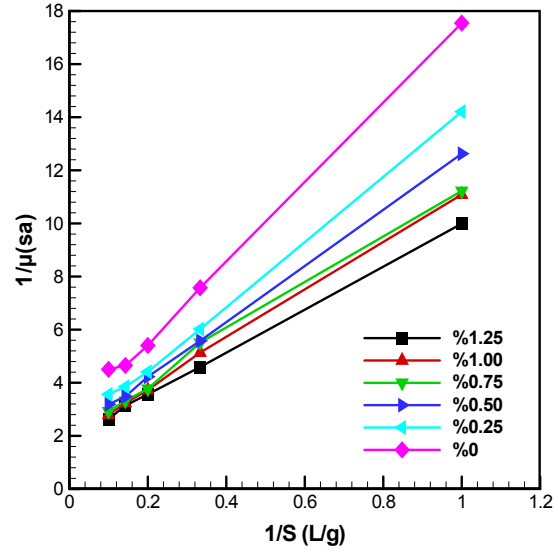


Şekil 5. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı oranlardaki soya yağı ile değişimi (Change of specific growth rate of microorganism obtained at different initial sucrose concentration with different rates of soybean oil for *Candida utilis*)



Şekil 6. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde kuru mikroorganizma derişiminin farklı oranlardaki soya yağı ile değişimi (Change of dried microorganism concentration obtained at different initial sucrose concentration with different rates of soybean oil for *Candida utilis*)

Candida utilis için farklı oranlarda soya yağı içeren ortamda $1/\mu-1/S$ değişimi etkisi Şekil 7' de verilmiştir. Burada artan başlangıç sakkaroz derişimi ile özgül üreme hızının arttığı görülmektedir. Şekil 7' ye göre Monod eşitliğinden maximum özgül üreme hızı ve doyunluk sabiti değerleri hesaplanmıştır ve bu değerler Tablo 2' de verilmiştir.



Şekil 7. *Candida utilis* için farklı oranlarda soya yağı içeren ortamda $1/\mu-1/S$ grafiği (Change of $1/\mu-1/S$ in the media different rates of soybean oil for *Candida utilis*)

Tablo 2' de ortamda 10 g/L sakkaroz ile, %0,25 ve 1,25 oranlarında yağ varken Monod eşitliğine göre çizilen izotermelere göre bulunan maksimum özgül üreme hızları ve doyunluk sabiti değerleri görülmektedir. Ortamda soya yağı yokken maximum özgül üreme hızı (μ_{max}) 0,417 1/sa ve doyunluk sabiti değeri (K_s) 6,283 g/L iken ortamda %0,25 ve 1,25 soya yağı varken maximum özgül üreme hızı (μ_{max}) sırasıyla 0,460 1/sa, 0,517 1/sa ve doyunluk sabiti değerleri (K_s) ise sırasıyla 5,463 g/L, 4,122 g/L'dir. Bu durumda ortamda soya yağı miktarının artışı ile maximum özgül üreme hızının arttığı, doyunluk sabiti değerinin ise azaldığı sonuçları ortaya çıkmıştır.

Tablo 2. Monod eşitliğine göre çizilen izotermelere göre bulunan maksimum özgül üreme hızları ve doyunluk sabiti değerleri (The maximum specific growth rate of microorganism and saturation constants obtained from isoterms accordingly governed by Monod Equation)

Yağ oranı	Yağ	μ_{max} (1/sa)	K_s (g/L)
%0	-	0,417	6,283
	Soya	0,460	5,463
%0,25	Mısır	0,443	5,424
	Zeytinyağı	0,425	5,373
	Ayçiçek	0,399	5,373
	Kanola	0,389	5,328
%1,25	Soya	0,517	4,122
	Mısır	0,509	4,163
	Zeytinyağı	0,501	4,205
	Ayçiçek	0,474	4,023
	Kanola	0,414	4,205

3.4 Lipaz Enzimi Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi (The Effect Of Metal Ions On Lipase Enzyme Activity)

Metal iyonlarının endüstriyel atık sulardan giderimi oldukça zor bir prostestir ve bu problemin giderilebilmesi için fiziksel ve kimyasal işlemler uygulanmaktadır. Ancak bu işlemlerin uygulanması birçok dezavantajı da beraberinde getirmiştir. Kirletici maddelerin (atık) derişimi 10–100 mg/L aralığında olduğunda, toksik sulu çamurların veya diğer atık ürünlerin üretimi genellikle çok pahalıdır [30]. Metal kaplama, madencilik işlemleri ve deri sanayi gibi birçok endüstride kullanılan metaller toksik etkiye sahiptir ve çok ciddi bir şekilde çevre kirliliğine yol açmaktadır. Kullanılan bu ağır metallerin atıksulardan uzaklaştırılması pahalı prosesler olduğundan günümüzde daha ucuz ve daha kolay yöntemler geliştirilmiştir.

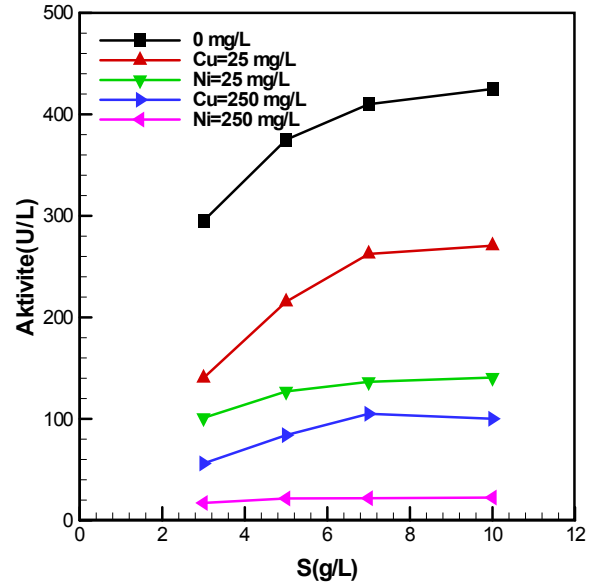
Bu amaçla kullanılan mikroorganizmalar, ağır metallerin aktif veya pasif mekanizma ile taşınmasını sağlayan etkili çevresel iyileştiricilerdir [24].

Bu çalışmada besin ortamına Cu (II) ve Ni (II) iyonları 25–250 mg/L aralığında eklenerek metal iyonlarının lipaz enzimi aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Ortama 25–250 mg/L derişim aralığında Cu (II) ve Ni (II) iyonu eklenirken başlangıç sakkaroz derişimi de 3–10 g/L aralığında değiştirilmiş, Cu (II) ve Ni (II) iyonları ve sakkarozun lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve kuru mikroorganizma derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. 25–250 mg/L derişim aralığında Cu (II) ve Ni (II) içeren ortamlarda değişen başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizmanın gösterdiği lipaz aktivitesi Şekil 8, mikroorganizma özgül üreme hızı Şekil 9 ve kuru mikroorganizma derişimi ise Şekil 10’ da verilmiştir.

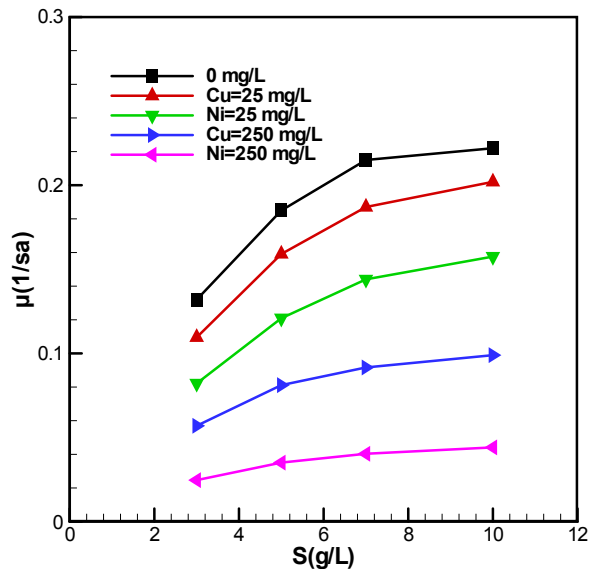
Şekillerden ortamdaki başlangıç sakkaroz derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesini, mikroorganizma özgül üreme hızını ve kuru mikroorganizma miktarını artırdığı görülmektedir. Herhangi bir metal iyonu varlığında artan sakkaroz derişimi ile özgül üreme hızının arttığı görülmektedir.

Örneğin Şekil 9’ da Ni (II) iyonu derişimi 25 mg/L olduğunda ve sakkaroz derişimi 3g/L’ den 10 g/L’ ye çıkarıldığı durumda özgül üreme hızı 0,08217 1/sa’ den 0,157576 1/sa’ e çıkarken kuru mikroorganizma miktarı da 1,4025 g/L’ den 2,5935 g/L’ ye çıkmıştır. Ancak ortamdaki Cu (II) ve Ni (II) iyonları derişimi artışının lipaz enzimi aktivitesi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve üreyen mikroorganizma miktarını önemli oranda azalttığı görülmektedir. Ni (II) iyonu derişim 250 mg/L olduğu durumda aktivitenin neredeyse sıfır değerinde olduğu Şekil 8’ den açıkça görülmektedir. Enzim aktivitesindeki Cu (II) ve Ni

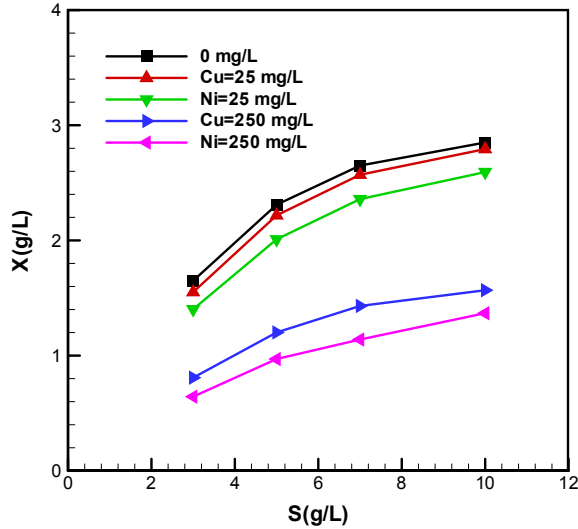
(II) iyonları varlığıyla azalışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi azaldıkça üreyen mikroorganizmaların daha az enzim ürettiği anlaşılmaktadır. Metal iyon derişimi arttıkça özgül üreme hızının büyük oranda azaldığı Şekil 9’ dan görülmektedir. Bu durumda metal iyonu varlığında mikroorganizmaların özgül üreme hızının inhibisyona uğradığı açıkça ortadadır.



Şekil 8. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde enzim aktivitesinin farklı derişimlerdeki Cu (II) ve Ni (II) ile değişimi (Change of enzyme activities obtained at different initial sucrose concentration with different concentrations of Cu (II) and Ni (II) for *Candida utilis*)



Şekil 9. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızının farklı derişimlerdeki Cu (II) ve Ni (II) ile değişimi (Change of specific growth rate of microorganism obtained at different initial sucrose concentration with different concentrations of Cu (II) and Ni (II) for *Candida utilis*)

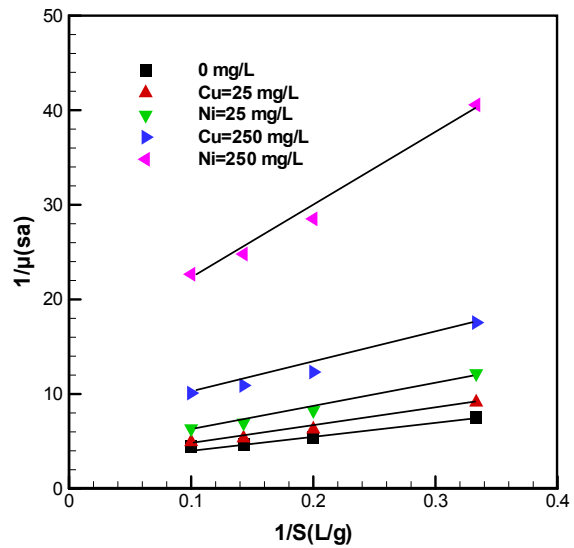


Şekil 10. *Candida utilis* için farklı başlangıç sakkaroz derişimlerinde kuru mikroorganizma derişiminin farklı derişimlerdeki Cu (II) ve Ni (II) ile değişimi (Change of dried microorganism concentration obtained at different initial sucrose concentration with different concentrations of Cu (II) and Ni (II) for *Candida utilis*)

Tekli olarak ortama eklenen Cu (II) ve Ni (II) iyonlarının başlangıç derişimleri arttıkça enzim aktivitesinin, mikroorganizma özgül üreme hızının ve üreyen mikroorganizma derişiminin önemli oranda azaldığı, Ni (II) iyonlarının bu azaltıcı etkisinin Cu (II) iyonlarına göre daha fazla olduğu Tablo 3' den açıkça görülmektedir. Burada en yüksek aktivite düşüş oranı yüzdesi 10 g/L sabit sakkaroz derişiminde ortamda 250 mg/L Ni (II) varken %94,7' dir. Dursun vd. (2003) *Rhizopus arrhizus* ve *Aspergillus niger* ile yaptıkları çalışmada Cu (II) ve Cd (II) iyonlarının tüm derişimlerinde mikroorganizma büyümesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini ayrıca metal iyon birikiminin seviyesinin başlangıç pH ve metal iyon derişimine bağlı olduğunu savunmuşlardır [31]. Preetha ve Viruthagiri *Rhizopus arrhizus* ile yapmış oldukları çalışmada ortamda krom, bakır ve nikel iyonları varlığında artan metal iyon derişimi ile özgül üreme hızının azaldığını ifade etmişlerdir [24]. Muter vd. (2001) *Candida utilis* mayası ile Cr (IV) varlığında inhibisyon etkisini incelemişler ve ortamda

metal iyon derişimi 50–100 mg/L olduğunda güçlü oranda inhibisyon olduğu ayrıca 100 mg/L metal iyonu varlığında metal iyon içermeyen ortama göre mikroorganizma büyümesinin 3 kat azaldığı ve hatta ortamda metal iyon derişimi 400–500 mg/L olduğunda mikroorganizma büyümesinin durmuş olduğunu ifade etmişlerdir [32]. Keklikcioğlu ve Açıklak.(2011), lipaz enzimi aktivitesine Cu (II) ve Ni (II) iyonlarının etkisini araştırmış ve Ni (II)' nin enzim aktivitesini azaltıcı etkisinin daha fazla olduğu sonucunu ortaya koymuşlardır [33].

Farklı derişimlerde Cu (II) içeren ortamda Monod eşitliğine göre çizilen $1/\mu-1/S$ (Şekil 11) izotermlerden bulunan kinetik sabitler olan maksimum özgül üreme hızı ve doyunluk sabiti değerleri Tablo 4' de sunulmuştur.



Şekil 11. *Candida utilis* için Cu (II) ve Ni (II) içeren ortamda $1/\mu-1/S$ grafiği (Change of $1/\mu-1/S$ in the media containing Cu (II) and Ni (II) for *Candida utilis*)

Tablo 4' den başlangıç Cu (II) ve Ni (II) ve sakkaroz derişimindeki artışla her iki metal iyonu varlığında mikroorganizma maksimum özgül üreme hızının önemli oranda azaldığı, doyunluk sabiti değerlerinin ise değişkenlik gösterdiği görülmektedir.

Tablo 3. Lipaz aktivitesinin, mikroorganizma özgül üreme hızı ve kuru mikroorganizma miktarının farklı miktarlarda metal iyonu içeren ortamlarda karşılaştırılması (Comparison of the lipase activity, specific growth rate of microorganism and dried microorganism concentration at the medium of containing different amounts of metal ions)

Metal İyonu Derişimi (mg/L)	Metal İyonu	Aktivite (U/L)	Aktivite Değişim Oranı (%)	μ (1/sa)	Özgül Üreme Hızı Değişim Oranı (%)	X (g/L)	Kuru Mikroorganizma Miktarı Değişim Oranı (%)
0	-	425,0	-	0,222	-	2,85	-
25	Cu (II)	270,6	-36,3	0,202	-9,0	2,79	-2,1
	Ni (II)	140,7	-66,9	0,157	-29,3	2,59	-9,1
250	Cu (II)	100,1	-76,4	0,098	-55,9	1,56	-45,3
	Ni (II)	22,5	-94,7	0,044	-80,2	1,37	-51,9

Tablo 4. Farklı derişimlerde Cu (II) ve Ni (II) iyonu içeren ortamlarda Monod eşitliğine göre bulunan maksimum özgül üreme hızı ve doygunluk sabiti değerleri (Maximum specific growth rate and saturation constants obtained from governed by Monod Equation at different concentration of Cu (II) ve Ni (II) ions)

Cu (II) (mg/L)	μ_{max} (1/sa)	K_s (g/L)	Ni (II) (mg/L)	μ_{max} (1/sa)	K_s (g/L)
0,00	0,417	6,282	0,00	0,417	6,283
25,0	0,323	5,495	25,0	0,264	6,224
50,0	0,307	6,771	50,0	0,242	8,776
75,0	0,260	5,839	75,0	0,181	6,689
100,0	0,235	6,297	100,0	0,157	7,593
150,0	0,181	5,286	150,0	0,119	7,362
250,0	0,151	4,672	250,0	0,069	5,096

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Yapılan bu çalışmada bir maya türü olan *Candida utilis* mikroorganizması tarafından lipaz enzimi aktivitesi, kesikli düzende çalışan karıştırmalı kapta başlangıç pH' sının, başlangıç melas sakkarozu derişiminin, ortama eklenen aktivite artırıcı yağların ve metal iyonu derişiminin fonksiyonu olarak incelenmiştir. Lipaz enzimi aktivite deneylerinde optimum sıcaklık 25°C olarak tayin edilmiştir.

Deneysel çalışmaların ilk kısmında aktivite artırıcı yağlar ile lipaz enzimi aktivitesi deneyleri yapılmış ve sonuçlar lipaz enzimi aktivitesi, v (U/L), mikroorganizma özgül üreme hızı, μ (1/sa) ve kuru mikroorganizma derişimi, X (g/L) cinsinden hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır.

Deneysel çalışmaların ilk kısmında enzim üretimi için ortam optimum pH' sının ve başlangıç sakaroz derişiminin etkileri araştırılmış enzim üretimi ve mikroorganizma üremesi için kinetik sabitler tayin edilmiştir. Başlangıç pH' sının ve mikroorganizmanın ana karbon kaynağı olan sakkarozun enzim üretimi ve mikroorganizma üremesini doğrudan etkileyen bir parametre olduğu görülmektedir. pH 4 değerinde maksimum lipaz aktivitesi gözlenirken, başlangıç sakkaroz derişiminin de artmasıyla aktivitenin arttığı bulunmuştur.

Mikroorganizma besin ortamına enzim aktivitesini artırıcı olarak katılan bazı ticari yağların kullanılmasıyla enzim aktivitesini önemli oranda arttığı bulunmuştur. Aktivatör olarak soya, mısır, zeytin, ayçiçek ve kanola yağları kullanılmıştır. Ortama %0,25-1,25 oranında eklenen yağların tümünün enzim aktivitesini belli oranda artırdığı gözlenirken en yüksek aktivite artışı ortama %1,25 oranında soya yağı eklendiğinde, en düşük aktivite artışı ise %0,25 oranında kanola yağı eklendiğinde bulunmuştur.

Genel olarak bütün yağların mikroorganizma üremesini de artırdığı deneysel sonuçlardan gözükmektedir. Mikroorganizma bu yağları besin olarak da tüketmektedir çünkü protein bakımından

çok zengin olan bu yağlar genelde doymuş yağ oranı düşük yağlardır, dolayısıyla daha fazla üreyen mikroorganizma daha fazla enzim üretmektedir. Ayrıca faydalı asitler diyebileceğimiz ve yapılarında bol miktarda bulunan oleik, linoleik, linolenik asitler, gliseridler ve lipidler enzim üretimini indüklemekte (tetiklemede) yani artırmaktadır. Enzim aktivitesi artırıcı olarak kullanılan yağların enzim aktivitesini artırıcı etkisi yanında mikroorganizma üremesini, mikroorganizma özgül üreme hızı ve mikroorganizmanın maksimum üreyen derişimini de artırdığı görülmüştür.

Bu sonuçlar genel olarak kullanılan yağların hepsinin mikroorganizmanın lipaz enzimi aktivitesini ve mikroorganizma büyüme değerlerini soya> mısır> zeytin> ayçiçek> kanola sırasında artırdığını göstermektedir. Ayrıca Monod eşitliğine göre çizilen izotermelere göre bulunan maksimum özgül üreme hızları da aktivatör yağların kullanıldığı ortamlarda daha yüksek bulunmuştur.

Enzim aktivitesini artırıcı ortam deneyleri yapıldığı gibi deneysel çalışmaların ikinci kısmında mikroorganizma üremesini inhibe ettiği bilinen Cu (II) ve Ni (II) iyonlarının enzim aktivitesi ve mikroorganizma üremesine etkileri de incelenmiştir. Tekli olarak 25-250 mg/L aralığında ortama eklenen Cu (II) ve Ni (II) iyonlarının başlangıç derişimi arttıkça lipaz enzimi aktivitesinin önemli oranda düştüğü bulunmuştur. Metal iyonlarının en bilinen özelliği mikroorganizma üremesini inhibe etmesidir. Başlangıç metal iyon derişimi arttıkça enzim aktivitesindeki azalma yanında mikroorganizma özgül üreme hızı ve mikroorganizmanın maksimum üreyen derişimi de azalmıştır. Bu sonuçlar ortamdaki Cu (II) ve Ni (II) iyonlarının lipaz enzimi aktivitesi ve mikroorganizma büyüme değerlerini önemli oranda düşürdüğünü, Ni (II)' nin etkisinin ise daha fazla olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmadan çıkan sonuca göre genel olarak *Candida utilis* mayası kullanılarak ortam şartları uygun belirlenirse yüksek oranda lipaz enzimi aktivitesi elde etmek mümkündür.

SEMBOLLER (SYMBOLS)

Cu (II)	Bakır (II)
Ni (II)	Nikel (II)
μ	Özgül üreme hızı (sa^{-1})
X	Kuru mikroorganizma derişimi (g/L)
t	Zaman (sa)
μ_m	Maksimum özgül üreme hızı (sa^{-1})
K_S	Doygunluk sabiti (g/L)
S	Başlangıç sakkaroz derişimi (g/L)

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Yazarlar M-345 nolu proje ile bu çalışmaya verdiği destekten dolayı CÜBAP' a teşekkür ederler.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C., "Production, purification, characterization, and applications of lipases", **Biotechnology Advances**, Cilt 19, 627-662, 2001.
- Babu, I.S. ve Rao, G.H., "Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589", **Research Journal of Microbiology**, Cilt 2, No 1, 88-93, 2007.
- Jaeger, K.E. ve Reetz, M.T., "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology", **Trends in biotechnology**, Cilt 16, No 9, 396-403, 1998.
- Couto, S.R. ve Sanroman, M.A., "Application of solid-state fermentation to food industry - A review", **Journal of Food Engineering**, Cilt 76, No 3, 291- 302, 2006.
- Dharmstithi, S. ve Kuhasuntisuk, B., "Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment", **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Cilt 21, No 1-2, 75-80, 1998.
- Asses, N., Ayed, L. ve Bouallagui, H., Ben Rejeb I, Gargouri M. ve Hamdi M. "Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture", **Bioresource Technol.**, Cilt 100, No 7, 2182-2188, 2009.
- Gotor-Fernandez, V., Brieva, R. ve Gotor, V., "Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Cilt 40, No 3-4, 111-120, 2006.
- Hasan, F., Shah, A.A. ve Hameed, A., "Industrial applications of microbial lipases", **Enzyme and Microbial Technology**, Cilt 39, No 2, 235-251, 2006.
- Burkert, J.F.M., Maugeri, F. ve Rodrigues, M.I., "Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design", **Bioresource Technology**, Cilt 91, No 1, 77-84, 2004.
- Davranov, K. "Microbial lipases in biotechnology (Review)", **Appl. Biochem. Microbiol.**, Cilt 30, No 4-5, 427-432, 1994.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S. ve Gupta, R., "Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3", **Protein Expression and Purification**, Cilt 41, No 1, 38-44, 2005.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Kriger, N. ve Soccol, V.T., "The realm of microbial lipases in biotechnology", **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Cilt 29, No 2, 119-131, 1999.
- Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R., "A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation", **Process Biochemistry**, Cilt 37, No 2, 187-192, 2001.
- Van Den Broek, P.J.A., Van Gompel, A.E., Luttik, M.A.H., Pronk, J.T. ve Van Leeuwen, C.C.M., "Mechanism of glucose and maltose transport in plasma-membrane vesicles from the yeast *Candida utilis*", **Biochem. J.**, Cilt 321, No 2, 487-495, 1997.
- De Deken, R.H., "The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast ", **J . gen. Microbiol.**, Cilt 44, 149-156, 1966.
- Bekatorou, A., Psarianos, C. ve Koutinas, A.A., "Production of Food Grade Yeasts", **Food Technol. Biotechnol.**, Cilt 44, No 3, 407-415, 2006.
- Moftah O.A., Grbavčić, S., Zuža, M., Luković, N., Bezbradica, D. Ve Knežević-Jugović, Z., "Adding Value to the Oil Cake as a Waste from Oil Processing Industry: Production of Lipase and Protease by *Candida utilis* in Solid State Fermentation", **Appl Biochem Biotechnol**, Cilt 166, No 2, 348-364, 2012.
- Açıklak, Ü., Erşan, M., Sağ Açıklak, Y., "The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. Delemar*", **Turkish Journal of Biology**, Cilt 35, 35-44, 2011.
- Wonderwülbecke, T., Kieslich, K. ve Erdman, H., "Comparison of lipases by different assays", **Enzyme and Microbial Technology**, Cilt 14, No 8, 631-639, 1992.
- Forouchi, E., ve Gunn, D. J., "Some effects on metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media", **Biotechnology and Bioengineering**, Cilt 25, No 7, 1905-1911, 1983.
- Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H. ve Wu, W.T., "Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Cilt 26, No 1-2, 69-78, 2003.
- Schauer, F. ve Hanschke, R., "Taxonomy and ecology of the genus *Candida*", **Mycoses**, Cilt 42, No 1, 12-21, 1999.

23. Han, K., Levenspeil, O., “Extended Monod kinetics for substrate, product and cell inhibition”, **Biotechnology and Bioengineering**, Cilt 32, No 4, 430–437, 1988.
24. Preetha, B. ve Viruthagiri, T., “Bioaccumulation of chromium(VI), copper(II) and nickel(II) ions by growing *Rhizopus arrhizus*”, **Biochemical Engineering Journal**, Cilt 34, No 2, 131–135, 2007.
25. Ertuğrul, S., Dönmez G. ve Takaç S., “Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity”, **Journal of Hazardous Materials**, Cilt 149, No 3, 720–724, 2007.
26. Şengel B. Ş., Takaç S. ve Dönmez, G., “Mikrobiyal kaynaklı lipaz üretimine karbon kaynağı olarak bitkisel yağların ve glukozun etkisi”, **Yedinci Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 5-8 Eylül 2006.
27. Sağ Açık, Y., Erşan, M., Açık, Ü., “R.Delema’ ın Üremesi Ve Lipaz Üretimi Üzerine Karıştırma Ve Havalandırma Hızlarının Etkisinin Glukoz Veya Melas Sakkarozu Ve Pfr İçeren Ortamlarda Araştırılması”, **Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University**, Cilt 28, No 4, 811-818,2013.
28. Keklikcioğlu N., Açık Ü., “Candida utilis’ in Lipaz Enzimi Aktivitesine Başlangıç Sakkaroz Derişiminin ve Aktivatör Yağların Etkisi”, **9. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, Ankara, 22-25 Haziran 2010.
29. Rodrigues, N., Malheiro, R., Casal, S., Asensio-S-Manzanera, M.C., Bento A. ve Pereira, J.A., “Influence of spike lavender (*Lavandula latifolia* Med.) essential oil in the quality, stability and composition of soybean oil during microwave heating”, **Food Chemical Toxicology**, Cilt 50, No 8, 2894–2901, 2012.
30. Sağ, Y. ve Kutsal, T. “Copper(II) and nickel(II) adsorption by *Rhizopus arrhizus* in batch stirred reactors in series” **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal** , Cilt 58, No 3, 265–273,1995.
31. Dursun, A.Y., Uslu, G., Tepe, O., Cuci, Y. ve Ekiz, H.İ., “A comparative investigation on the bioaccumulation of heavy metal ions by growing *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillus niger*”, **Biochemical Engineering Journal**, Cilt 15, No 2, 87–92, 2003
32. Muter, O., Patmalnieks, A. ve Rapoport, A. “Interrelations of the yeast *Candida utilis* and Cr(VI): metal reduction and its distribution in the cell and medium”, **Process Biochemistry**, Cilt 36, No 10, 963–970, 2001.
33. Keklikcioğlu N., Açık Ü., “Lipaz Enzimi Aktivitesine Başlangıç Sakkaroz Derişiminin ve Ortamda Bulunan Bakır (II) ve Nikel (II) İyonlarının Etkisi” **25. Ulusal Kimya Kongresi**, Erzurum, 27 Haziran- 25 Temmuz 2011.

