



T.C.

SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİPLOLEPİS FRUCTUUM (RÜBSAAMEN, 1895)
(HYMENOPTERA: CYNİPİDAE)'NİN LARVASINDAN
LİPOLİTİK BİR FRAKSİYONUN SAFLAŞTIRILMASI VE
TEMEL KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mazen ALTHALJI
(20179245001)

Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Salih GÖRGÜN

SİVAS
HAZİRAN 2019

Mazen ALTHALJI'nin hazırladığı “*DİPLOLEPİS FRUCTUUM* (RÜBSAAMEN, 1895) (HYMENOPTERA: CYNİPİDAE)'NİN LARVASINDAN LİPOLİTİK BİR FRAKSİYONUN SAFLAŞTIRILMASI VE TEMEL KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOKİMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı **Doç. Dr. Salih GÖRGÜN**
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK**
Selçuk Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Hesna Nursevin ÖZTOP**
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. İsmail ÇELİK

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.



*Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-601** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Mazen ALTHALJI, 2019



Her zaman bana destek olan yol arkadaşıma ve aileme...

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

14.05.2019

Mazen ALTHALJI

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi sürecinde 2 yıl boyunca benden engin tecrübelerini ve değerli bilgilerini esirgemeyen, deneysel süreci gerçekleştirirken sabırlı ve hoşgörülü bir şekilde bana yardımcı olarak birçok şey kazandıran saygıdeğer danışman hocam sayın Doç. Dr. Salih GÖRGÜN'e, hayatımı geçirdiğim, ailemin sevdiğimim olduğu, eğitimlerimi tamamladığım hayatımı, çocukluğumu geçirdiğim özlediğim canım ülkem Suriye'ye, öğrendiğim birçok bilgiyi öğreten, Halep Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun olmamı sağlayan ülkemdeki bütün öğretmenlerime bana destek olan arkadaşlarıma, Türkiye'ye gelebilmemi sağlayan Türkiye Cumhuriyeti Devletine, Türkiye'de eğitim almamı sağlayan YTB (Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı) ve UNHCR (Birleşmiş Milletler Mülteciler Yüksek Komiserliği)'ye, örneklerin sağlanması ve teşhisinde yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Lütfiye GENÇER'e, tez çalışmamda benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Hilal KARAKAŞ'a, çalışmamı gerçekleştireceğim laboratuvar ortamı ve deneysel süreçte lazım olan kimyasalların teminini sağlayan Cumhuriyet Üniversitesine, Fen Fakültesine ve Fen Bilimleri Enstitüsüne, tez projem için gerekli maddi desteği sağlayan Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP)'e, yüksek lisans eğitimimde bilgi ve birikimleri ile destekçim olan Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü hocalarıma, yaşamım boyunca maddi ve manevi tüm desteklerini, sevgilerini benden esirgemeyen, ahlakın, sevmenin, dürüstlüğü, iyiliğin, fedakarlığın paradan eğitimden daha değerli olduğunu bana öğreten canım aileme ve her koşulda yanımda olan canım abim Mohamad ALTHALJI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

***DIPLOLEPIS FRUCTUUM* (RÜBSAAMEN, 1895) (HYMENOPTERA: CYNİPİDAE)'NİN LARVASINDAN LİPOLİTİK BİR FRAKSİYONUN SAFLAŞTIRILMASI VE TEMEL KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Mazen ALTHALJI

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Salih GÖRGÜN

2019, 62+xiii sayfa

Diplolepis fructuum (Rübsaamen, 1895) Rosaceae türlerinde zararlara yol açan en önemli böcek türlerinden birisidir. Biyokimyasal veri elde etmek için laboratuvarımızda 2018'de başlatılan bu çalışma ile *D. fructuum*'un larvasından bir esteraz (E.C.3.1.1.X) Q sefarozyon anyon değişim, fenil sefarozyon CL-4B ve sefakril S100-HR jel filtrasyon kromatografisini kullanarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim 6.94 U (mg protein)⁻¹ spesifik aktivite, 28.80 kat saflık ve % 8.80 verime sahiptir. Nativ-PAGE çalışmalarında sadece bir aktivite bandı gözlenmiştir. Nativ-PAGE ve SDS-PAGE tekniklerini kullanarak, esterazın mol kütlesi yaklaşık olarak 60 kDa olarak tahmin edilmiştir. Kinetik datadan, enzimin optimum sıcaklık ve pH'ı sırasıyla 40 °C ve 9.0 olarak belirlenmiştir. Enzim, 40 °C ve pH 8.0'da 4 saat kararlıdır. 4-nitrofenil bütirat (p-NPB) substrat olarak kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin 0.035 mM ve 1.41 µmol (mL dk)⁻¹ olduğu bulunmuştur. Enzim en yüksek aktivitesini p-NPB (% 100) ve 4-nitrofenil asetat (% 52) üzerinde sergilemiştir. Tüm bu veriler enzimin diğer böcek türlerinden bildirilen esterolitik enzimlerden farklı kinetik özellik ve mol kütlesi ile bir esteraz olabileceğini önermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Diplolepis fructuum*, larva, esteraz, saflaştırma, kolon kromatografisi.

ABSTRACT

PURIFICATION AND DETERMINATION OF BASIC KINETIC PROPERTIES OF A LIPOLYTIC FRACTION FROM THE LARVAE OF *DIPLOLEPIS FRUCTUUM* (RÜBSAAMEN, 1895) (HYMENOPTERA: CYNIPIDAE)

Mazen ALTHALJI

Master of Science Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Salih GÖRGÜN

2019, 62+xiii pages

Diplolepis fructuum (Rübsaamen, 1895) is one of the important insect species that causes damages on Rosaceae species. With this study launched in our laboratory in 2018 to get a biochemical data, an esterase (E.C.3.1.1.X) from the larvae of *D. fructuum* was purified using Q sepharose anion exchange, phenyl sepharose CL-4B, and sephacryl S100-HR gel filtration chromatography, respectively. The enzyme had $6.94 \text{ U (mg protein)}^{-1}$ specific activity, 28.80-fold purity, and 8.80 % yield. Only one activity band was observed in Native-PAGE studies. The molecular weight of the esterase was approximately estimated as 60 kDa using Native-PAGE and SDS-PAGE techniques. By the kinetic data, optimum temperature and pH for the enzyme was determined as 40 °C and 9.0, respectively. The enzyme was stable for 4 hours at 40 °C and pH 8.0. K_m and V_{max} values were found to be 0.035 mM and $1.41 \mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$, using 4-nitrophenyl butyrate (p-NPB) as substrate. The enzyme exhibited its highest activities on p-NPB (100 %) and 4-nitrophenyl acetate (52 %). All of these data suggest that the enzyme might be a typical esterase with different kinetic properties and molecular weight than esterolytic enzymes reported from other insect species.

Key Words: *Diplolepis fructuum*, larvae, esterase, purification, column chromatography.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Hidrolazlar ve Esterazlar	1
1.2 Esterazlar (EC 3.1.1.X) ve Lipazlar (EC 3.1.1.3)	2
1.3 Esterazların Sınıflandırılması	4
1.4 Esterazların Fonksiyonları.....	4
1.5 İnsektisit Direncinde Esterazlar	5
1.6 Böceklerde Lipolitik Enzimler İle İlgili Yapılan Çalışmalar	8
2. MATERYAL ve METOT	15
2.1 Kullanılan Kimyasallar	15
2.2 Kullanılan Çözeltiler	15
2.3 Kullanılan Cihazlar	16
2.4 Deney Materyalinin (<i>Diplolepis fructuum</i> Larva Örnekleri) Sağlanması	16
2.5 <i>D. fructuum</i> Larvası Esteraz Enzim Ekstraktının Hazırlanması.....	17
2.6 Kromatografik İşlemler	17
2.6.1 Q Sefaroz anyon değişim kromatografisi	17
2.6.2 Fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi	18
2.6.3 Sefakril S100-HR jel filtrasyon kromatografisi.....	18
2.7 Esteraz Enzim Aktivitesi Ölçülmesi	19
2.8 Protein Miktarı Ölçümleri	20
2.9 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazı Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	21
2.10 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazı Optimum pH'ın Belirlenmesi	21
2.11 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazı Üzerine Substrat (p-NPB) Konsantrasyonun Etkisi	22
2.12 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazı Üzerine Substrat Zincir Uzunluğunun Etkisi....	22
2.13 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazının Termal Karalığının Belirlenmesi.....	22
2.14 Elektroforetik Çalışmalar	22
2.14.1 Çözeltiler	23
2.14.1.1 % 30 Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi	23
2.14.1.2 4X Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8).....	23

2.14.1.3 % 10 SDS çözeltisi.....	23
2.14.1.4 % 10 Amonyum persülfat (APS)	23
2.14.1.5 SDS içermeyen 5X tank tamponu	23
2.14.1.6 % 1 SDS katkılı 5X tank tamponu	23
2.14.1.7 Örnek uygulama tamponu	23
2.14.2 Gümüş boyama	24
2.14.2.1 Fiksatif çözeltisi	24
2.14.2.2 Ön uygulama çözeltisi	24
2.14.2.3 Gümüş nitrat (2 g L ⁻¹) çözeltisi	24
2.14.2.4 Geliştirme çözeltisi.....	24
2.14.3 Nativ-Poliekarilamid Jel (Native-PAGE) uygulanışı.....	24
2.14.4 Denatüre Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) uygulanışı	25
2.15 İstatiksel Analiz.....	26
3. BULGULAR.....	27
3.1 Homojenat İle İlgili Sonuçlar	27
3.2 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazının Saflaştırılması	27
3.2.1 Q sefaroz iyon değişim kromatografisi saflaştırma sonuçları	27
3.2.2 Fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kolonu ile saflaştırma sonuçları.....	28
3.2.3 Sefakril S100-HR jel filtrasyon kolonu ile saflaştırma sonuçları	29
3.3 <i>D. fuructuum</i> Larval Esterazı Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi İle İlgili Bulgular	34
3.4 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazı Optimum pH'ın Belirlenmesi İle İlgili Bulgular	36
3.5 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazı Üzerine Substrat (p-NPB) Derişimin Etkisi İle İlgili Bulgular	38
3.6 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazı Üzerine Substrat Zincir Uzunluğunun Etkisi İle İlgili Bulgular	40
3.7 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazının Termal Karalığı İle İlgili Bulgular	41
3.8 <i>D. fructuum</i> Larval Esterazının Elektroforetik Çalışmaları İle İlgili Bulgular	43
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	50
KAYNAKÇA	57
ÖZGEÇMİŞ.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 α/β hirolaz katlanması (Nardini ve Dijkstra, 1999)	1
Şekil 1.2 <i>Candida rugosa</i> lipazı, mavi renkte açık yapısı, PDB 1CRL, ve gri renkte kapalı yapısı, PDB 1TRH (Casas-Godoy ve ark., 2018).....	2
Şekil 1.3 Lipolitik enzimlerin çalışması elektrostatik sapan modeli ile açıklanmaktadır (Petersen ve ark., 2001)	3
Şekil 1.4 Bazı insektisit ve esteraz substratlarının kimyasal yapıları (Montella ve ark., 2012)	7
Şekil 3.1 <i>D. fructuum</i> larval esterazının Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	31
Şekil 3.2 <i>D. fructuum</i> larval esterazının fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	32
Şekil 3.3 <i>D. fructuum</i> larval esterazının sefakril S100-HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram	33
Şekil 3.4 Sıcaklığın <i>D. fructuum</i> larval esteraz aktivitesi üzerine etkisi	35
Şekil 3.5 Sıcaklığın <i>D. fructuum</i> larval esteraz aktivitesi üzerine görelî etkisi	35
Şekil 3.6 pH'ın <i>D. fructuum</i> larval esteraz aktivitesi üzerine etkisi	37
Şekil 3.7 pH'ın <i>D. fructuum</i> larval esteraz aktivitesi üzerine görelî etkisi	37
Şekil 3.8 <i>D. fructuum</i> larval esterazının Linweaver-Burk grafiği	39
Şekil 3.9 <i>D. fructuum</i> larval esterazının Michaelis-Menten grafiği.....	39
Şekil 3.10 <i>D. fructuum</i> larval esterazı üzerine substrat zincir uzunluğunun etkisi....	41
Şekil 3.11 <i>D. fructuum</i> larval esterazının termal kararlılık grafiği	42
Şekil 3.12 Blue Plus IV Markır, bantlarına ait mol kütleleri	44
Şekil 3.13 Markır proteinlerin mol kütleleri- R_f grafiği	46
Şekil 3.14 \log_{10} (Mol kütleli)- R_f grafiği	46
Şekil 3.15 <i>D. fructuum</i> larvalarından esteraz saflaştırma aşamalarının elektroforetik analizleri.....	47
Şekil 3.16 Homojenat (1) ve sefakril S100-HR (2) kromatografisine ait Coomassie ile boyanmış Nativ-PAGE jel görüntüsü.....	48
Şekil 3.17 Nativ-PAGE jel görüntüsü.....	49

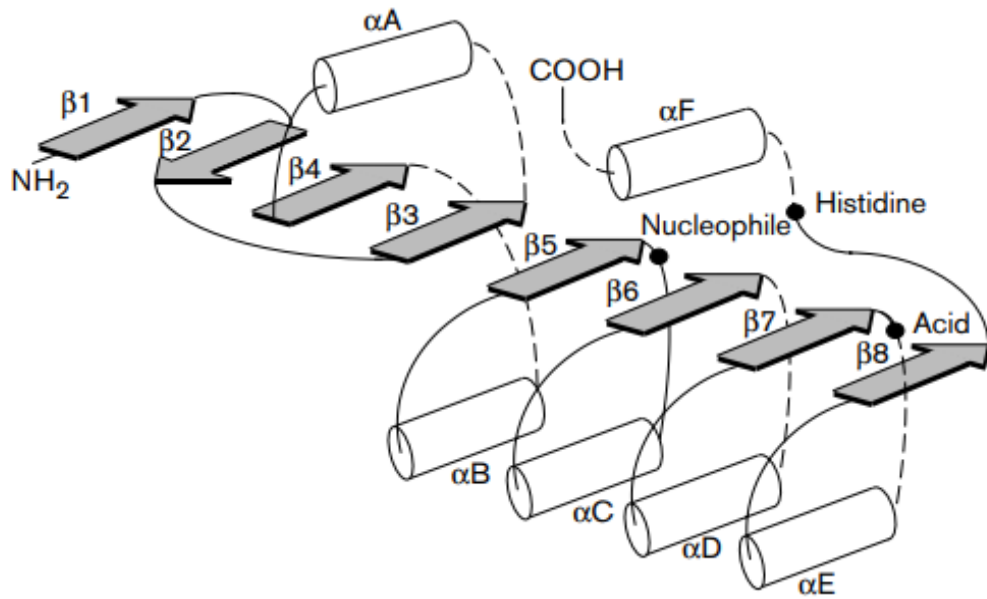
TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler	20
Tablo 2.2 Protein miktarı tayininde kullanılan standart çözeltilerin içeriği	21
Tablo 3.1 <i>D. fructuum</i> böcek esterazı saflaştırma basamakları	30
Tablo 3.2 <i>D. fructuum</i> larval esterazı üzerine farklı sıcaklık değerlerinin etkisi	34
Tablo 3.3 <i>D. fructuum</i> larval esterazı üzerine farklı pH değerlerinin etkisi	36
Tablo 3.4 <i>D. fructuum</i> larval esterazı üzerine substrat (p-NPB) derişimin etkisi	38
Tablo 3.5 <i>D. fructuum</i> larval esterazı üzerine substrat zincir uzunluğunun etkisi	40
Tablo 3.6 <i>D. fructuum</i> larval esterazının termal karalığı	42
Tablo 3.7 Blue Plus IV Markır bantlarına ait mol kütleleri ve R _f değerleri	45
Tablo 3.8 Homojenat ve sefakril S100-HR'ye ait R _f değerleri	45
Tablo 4.1 <i>D. fructuum</i> larval esterazı temel kinetik özellikleri	53

1. GİRİŞ

1.1 Hidrolazlar ve Esterazlar

Doğada en sık görülen protein katlanmalarından birisi, hidrolaz sınıfı enzimlerin de yer aldığı α/β domainlerdir (Şekil 1.1) (Nardini ve Dijkstra, 1999). Hidrolazlar geniş substrat özgüllüğü gösteren bir enzim sınıfıdır. Bu sınıfın enzimleri ester ve trigliseritlerle birlikte peptitler, halidler ve amidler gibi farklı bileşenlerin hidrolizini gerçekleştirebilmektedirler (Fojan ve ark., 2000). Bu olgu, farklı amino asit dizilimi ve farklı substrat kullanımına rağmen katalitik merkezlerini oluşturan amino asit düzenlenmelerinin benzerliğine işaret etmektedir. α/β hidrolaz ailesinin enzimlerinin aktif merkezini meydana getiren amino asitler “katalitik triad” yani katalitik üçlü olarak bilinip, “serin-aspartat-histidin” üçlüsünden meydana gelmektedir. Bazı enzimlerde ise aspartatın glutamat ile yer değiştirebildiği durumların mevcut olduğu belirlenmiştir (Ollis ve ark., 1992; Nardini ve Dijkstra, 1999). Bu bağlamda hidrolaz sınıfı enzimlerin en gözde olan iki grubunu, gerçek esterazlar olarak da adlandırılan karboksil ester hidrolazlar (EC. 3.1.1.1) ve lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolaz) oluşturmaktadır (Bornscheuer, 2002; Lopes ve ark., 2011). Bu iki enzim grubu çok geniş bir dizinde organizmadan tanımlanmış ve günümüzde bu organizmlardan bazılarında klonlama çalışmaları yerine getirilmiştir. Bu açıdan bakıldığında organizmadaki kritik fonksiyonları nedeniyle tüm yaşam formlarında buldukları bildirilmektedir (Fojan ve ark., 2000).

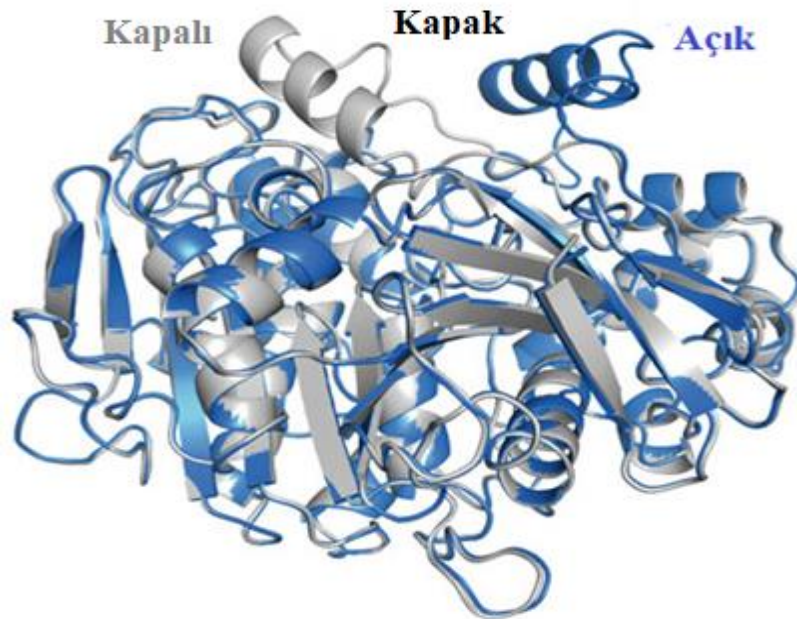


Şekil 1.1 α/β hidrolaz katlanması (Nardini ve Dijkstra, 1999)

1.2 Esterazlar (EC 3.1.1.X) ve Lipazlar (EC 3.1.1.3)

Saflaştırma çalışmalarında çoğu durumda saflatılmaya çalışılan lipolitik enzimin bir lipaz mı yoksa esteraz mı olduğu araştırmacılar tarafından yöneltilen bir sorudur. Bu olgu günümüzde hala karmaşıklığını sürdürmektedir. Buradan anlaşılacağı gibi her iki enzim grubunun benzer bir amino asit dizilimine sahip olmak kaydıyla ester bağlarının sadece hidrolizini değil, oluşumunu da katalizlediklerinin bilinmesine rağmen, aralarında farklılıkların bulunduğu bildirilmektedir (Gilham ve Lehner, 2005).

Esteraz ve lipazlar su ile etkileşebilen yüzey gruplarına sahip olmalarına karşın substratlarının suda çözünme davranışları aşağıda bu kısımda belirtildiği gibi görece olarak değişkendir. Bu olgu gereği, özellikle lipazlar substratlarını su-lipit ara yüzeyinde gerçekleştirmekte olup, bu olgu ara-yüzey (interfacial) aktivasyonu olarak adlandırılmaktadır (Beisson ve ark., 2000). Ara-yüzey aktivasyonu sadece lipazlara özgü olup, lipazları esterazlardan ayıran önemli bir özelliktir. Yapısal analizler ara-yüzey aktivasyonunun lipazların aktif merkezini kaplayan hidrofobik bir domain olan ve kapak bölgesi (lid region) olarak adlandırılan yapısal bir özellikten kaynaklandığını göstermiştir (Şekil 1.2). Sadece hidrofobik organik çözücüde substrat olarak trigliserit tarzındaki unsurların kapak bölgesinin açık konformasyonuna yol açtığı ve substratın katalizi için aktif merkezi ulaşılabilir kıldığı anlaşılmaktadır (Jaeger ve ark., 1999; Sharma ve ark., 2001; Ramnath ve ark., 2017; Casas-Godoy ve ark., 2018)

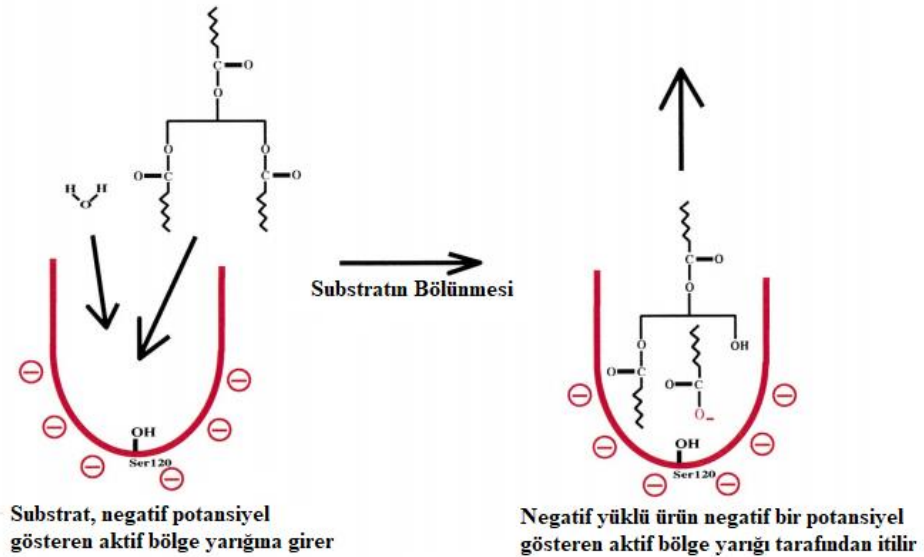


Şekil 1.2 *Candida rugosa* lipazı, mavi renkte açık yapısı, PDB 1CRL, ve gri renkte kapalı yapısı, PDB 1TRH (Casas-Godoy ve ark., 2018)

Bu bilgilerden, esterazlar kısa zincir uzunluğuna sahip ve suda çözünme yetenekleri görece olarak fazla olan yağ asitlerindeki ester bağlarının hidrolizini gerçekleştirirken, lipazların daha uzun zincir uzunluğuna sahip ve suda çözünmekten ziyade emülsiyon formunda bulunan unsurları kendisine substrat olarak kabul etmektedir. Yani lipaz aktivitesi, derişimden ziyade substratın toplam alanı ile alakalı olup, kümeleşmiş bileşenler üzerinde sergilenmektedir (Fojan ve ark., 2000).

Lipazlar ve esterazlar serin proteazlar ile aynı katalitik mekanizmayı paylaşmaktadırlar. Tüm katalitik süreç dört prosedürden oluşur ve iki tetrahedral ara bileşeni içermektedir (Kraut, 1977; Ji ve ark., 2010). Günümüzde esterazların (ve lipazların) kataliz mekanizması pH'nın bir fonksiyonu olarak protein yüzey elektrostatikliğinin hesaplanmasıyla aydınlatılmış olup, elektrostatik sapan modeli (the electrostatic catapult) olarak adlandırılmaktadır. Buna göre, substrat nötral veya bazik bir pH değerinde negatif bir potansiyel gösteren aktif merkez oluşuna girer ve ester bağının kırılmasını takiben negatif yük kazanan ürün negatif yüklü potansiyele sahip aktif merkez tarafından itilir (Petersen ve ark., 2001). Buna ait şekilsel bir sunum Şekil 1.3'te görülebilir.

Elektrostatik Sapan



Şekil 1.3 Lipolitik enzimlerin çalışması elektrostatik sapan modeli ile açıklanmaktadır (Petersen ve ark., 2001)

1.3 Esterazların Sınıflandırılması

Esterazların sınıflandırılması günümüzde hala kompleksliğini korumaktadır. Enzim sınıflandırma komitesi tarafından EC 3.1.1.1'den EC 3.1.1.98'e kadar sınıflandırılmış esteraz unsurundan enzim mevcuttur. Karboksil ester hidrolazlar ester bağlarını alkol ve karboksilik asitlere hidrolizini gerçekleştirirler. Bunlardan karboksil ester hidrolaz (EC 3.1.1.1), asetilkolinesterazlar (EC 3.1.1.7), butirikolin esterazlar (EC 3.1.1.8), aminoasit-tRNA hidrolazlar (EC 3.1.1.29) ve kokain esterazlar (EC 3.1.1.84) en fazla araştırılanlar arasındadır (Chen ve ark., 2016).

Bununla birlikte, ilk sınıflandırma çalışmalarının Aldridge (1953) tarafından esterazların paraokson gibi organofosfat (OP) bileşenleriyle etkileşimine göre yapıldığı görülmektedir. Bu sınıflandırmaya göre, esteraz A (Est-A) organofosfat bileşenlerini hidroliz etme yeteneğinde, esteraz B (Est-B) bu bileşenler ile inhibe olmakta, esteraz C (Est-C) ise organofosfatlarla etkileşmemektedir (Aldridge, 1953). İlerleyen süreçte 1978 yılında enzim komisyonu esterazlar için yeni bir sınıflandırma önermiştir. Buna göre, karboksil esterazlar (EC 3.1.1.1) aliesterazlar veya Est-B ya da karboksil ester hidrolazlar olarak bilinip, tercihen alifatik moleküller gibi açık zincirli organik moleküller üzerinde etki göstermektedirler. Est-A yada paraoksonaz olarak bilinen (EC 3.1.1.2) aril esterazlar tercihli olarak aromatik bileşenler üzerinde etki gösterip, triester organofosfatları hidroliz yetenekleri mevcuttur (Walker ve Mackness, 1983; Montella ve ark., 2012).

Günümüzde zararlı böcek popülasyonlarının kontrol altına alınmasında insektisitler yoğun bir şekilde kullanılmakta olup bu olguya ilerleyen kısımlarda değinilmiştir. Bu bağlamda, uygulanan insektisitlerin inhibisyon kriterini kullanmak esterazların sınıflandırılmasında güvenilir bir deneysel metod olarak görünmektedir. Buna göre, organofosfatlar, eserin sülfat ve sülfidril unsurlar sırasıyla karboksil esteraz, kolinesteraz ve arilesteraz aktivitelerini inhibe etmektedirler. Esterazların dördüncü bir sınıfı olan asetilesterazlar bu kimyasallar ile etkilenmemektedirler (Dahan-Moss ve Koekemoer, 2016).

1.4 Esterazların Fonksiyonları

Esterazlar, esterlerin asit yada alkole hidrolizini katalizini gerçekleştiren enzimler olmakla birlikte (Bornscheuer, 2002), kimyasal denge sentez reaksiyonunun yönüne

değiştirildiğinde sentez reaksiyonlarını da katalizini gerçekleştirebilmektedirler (Stamatis ve ark., 1998; Lopes ve ark., 2011).

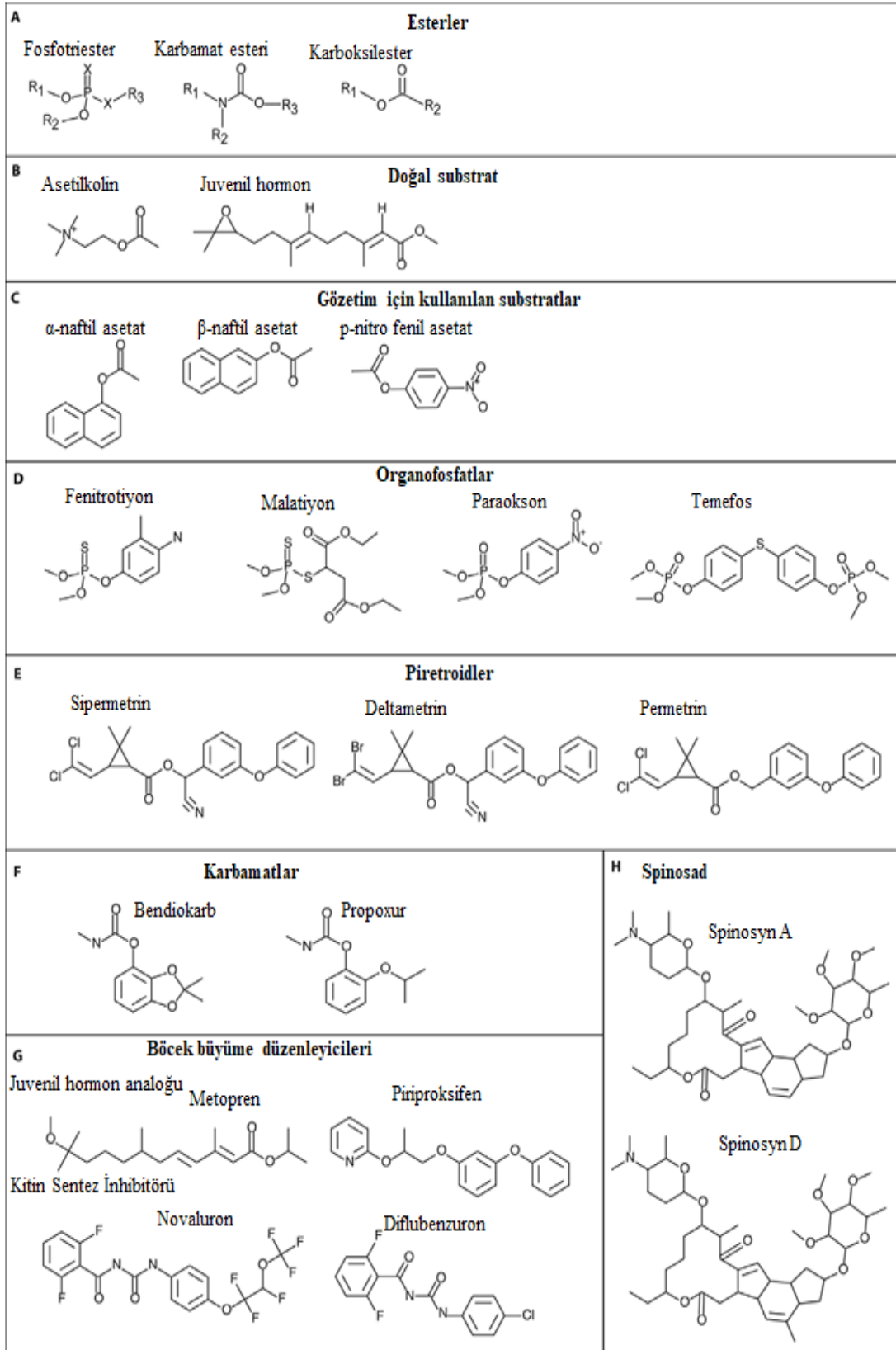
Günümüzde esterazların eksojen olarak organizmaya alınmış olan toksik bileşenlerin detoksifikasyon süreçlerinde etkili olduğu bilinmektedir (Satoh, 2005). Bu özellikleri nedeniyle uygulama alanı olarak, geniş dizinde ksenobiyotik ve endobiyotik degradasyonlar, biyokataliz ve ilaç metabolizmasında geniş bir şekilde kullanıma sahiptirler (Sood ve ark., 2016).

Esterazlar optik olarak aktif bileşenlerin elde edilmesinde kullanılan enzimlerdir. Bu şekilde elde edilen önemli bir bileşik steroid olmayan ve ağrı kesici özelliğe sahip olan ve yaygın olarak sadece bir optik formu kullanımda olan naproksendir. Esterazlar yiyecek endüstrisinde özellikle birçok mandıra ürününün aroma kazanması ve olgunlaştırılması gibi süreçlerde de sıklıkla kullanılan enzimlerdir. Bu enzimler *in vivo* koşullarda öncü ilaçları (prodrug) aktive etmek suretiyle etkili anti kanser unsurlarını üretebilmeleri nedeniyle kanser gen terapisinde kullanılabilirler. Plastik depolimerizasyonu ve geri dönüşümü günümüzün önemli problemlerinden birisini teşkil etmektedir. Bu bağlamda özellikle mikrobiyal esterazlar, polilaktik asit gibi bileşenlerin depolimerizasyonunda önemli roller oynadığı bildirilmiştir (Sood ve ark., 2016).

1.5 İsektisit Direncinde Esterazlar

Toplum sağlığını tehdit eden malarya, dang humması, ensefalitis, batı nil virüsü gibi birçok etken sivrisinekler tarafından bulaştırılmaktadır. Bu nedenle kimyasal insektisitlerin kullanımının böceklerden kaynaklanan hastalık risklerini azalttığı dünya sağlık organizasyonu (WHO) dahil birçok araştırmada bildirilmiştir. İsektisit kullanımına bağlı olarak, günümüzde birçok böcek grubunda bu kimyasallara karşı direnç geliştiği gözlenmektedir (Hemingway ve Ranson, 2000; Hemingway ve Bates 2003; Nauen, 2007). İsektisit direnci, zararlı böcek türüyle mücadele amacıyla, etiket tavsiyelerine göre art arda uygulandığında bir insektisit böcek popülasyonunun hassasiyetindeki kalıtılabilir bir değişim olarak adlandırılmaktadır (McCaffery ve Nauen, 2006; Nauen, 2007). Başka bir ifadeyle, aynı insektisit sık uygulanması, genetik olarak sabitlenmiş bir farklılık nedeniyle, tavsiye edilen oranlarda insektisit kullanımına bağlı olarak hayatta kalma yeteneğinde olan böcek bireylerin üretilmesidir (Nauen, 2007).

Sentetik veya doğal ksenobiyotiklerin etki mekanizmasına bakıldığında bu süreçten sorumlu olan endojen faktörlerin sadece esterazlar ile sınırlı olmadıkları anlaşılmaktadır. Glutasyon-S-transferaz ve sitokrom P450 sisteminin enzimleri de bu süreçlerde önemli roller üstlenen enzimlerdir. Genetik çeşitlilikleri, geniş substrat özgünlükleri ve katalitik çok yönlülükleri nedeniyle sitokrom P450 ve sitokrom P450 reduktaz sisteminin tüm insektisit sınıflarındaki direnç yol açabileceği bildirilmiştir (Li ve ark., 2007). İsektisit direncinde gereksinilen diğer önemli bir metabolik enzim grubu glutasyon-S-transferazlardır (GST). Bu enzimler organofosfat, organoklorin ve piretroidlere karşı direnç ara bulabilmektedirler. Günümüze kadar, gen çoğaltımı ya da aşırı ifadesi (overexpression) yoluyla insektisit direncinde rol alan 7 farklı GST geni tanımlanmıştır. İsektisit direncindeki üçüncü grup metabolik enzim ise esterazlar olup, sıklıkla organofosfatlar, karbamatlar ve piretroitlere karşı böceklerde direnç yol açıcıları belirlenmiştir. Esterazların insektisit direncinin mekanizmasına bakıldığında esteraz mutasyonları, esteraz gen amplifikasyonları, esteraz genlerinin upregulasyonu gibi süreçlere bağlı olarak açığa çıktığı bildirilmektedir (Li ve ark., 2007).



Şekil 1.4 Bazı insektisit ve esteraz substratlarının kimyasal yapıları (Montella ve ark., 2012)

1.6 Böceklerde Lipolitik Enzimler İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Nussbaumer ve ark. (2000) Juvenil hormon esterazının *Lymantria dispar* (Çingene Güvesi) hemolimfinden, afinite ve anyon değişim kromatografisiyle saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarını karşılaştırmışlardır. Enzim afinite kromatografisi kullanılarak % 95 verim ve 64 katlık bir saflaştırmayla elde edilirken, iyon değişim yöntemiyle verim ve saflaştırma katsayısı sırayla % 2 ve 44 kat olarak bulunmuştur. Her iki saflaştırma yöntemlerden elde edilen fraksiyon, SDS-PAGE jelinde yaklaşık 50 kDa bant göstermiştir. İzoelektrik fokuslama (IEF) jelleri, enzim aktivitesi analizleri ile birlikte kullanılarak hem afinite kromatografisi hem de anyon değişim kromatografisinden saflaştırılan enzim için aynı pI değerlerine (pH 5.1 ve 5.3) sahip iki izoelektrik formu gösterdiği bulunmuştur.

Haubruge ve ark. (2002) tarafından malatyona dirençli *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)'dan karboksilesteraz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. *Tribolium castaneum*'nun malatyona dirençli suşunun karboksilesterazı duyarlı suşundan 44 kat daha yüksek aktiviteye sahip olup, bu iki suşdan saflaştırılan enzimin yaklaşık 62 kDa'luk benzer bir mol kütleyle sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, izoelektrik fokuslama kullanılarak dirençli ve duyarlı böceklerden elde edilen esterazın izoelektrik noktaları sırayla 7.3 ve 6.6 olarak bulunmuştur. Her iki populasyondan saflaştırılmış esteraz için, malatyona hidrolizi ve α -naftil asetat için farklı K_m ve V_{max} değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kinetik analiz, dirençli böceklerin esterazının, malatyona, duyarlı böceklerden saflaştırılmış karboksilesterazdan daha hızlı hidrolize ettiğini ve bu enzimin, malatyona için naftil esterlerden daha fazla afiniteye sahip olduğunu göstermiştir.

Zera ve ark. (2002) *Gryllus assimilis* L. (Orthoptera: Gryllidae)'den hemolenf juvenil hormon esterazının saflaştırılmasına ve karakterize etmeye çalışmışlardır. Juvenil hormon esterazı (JHE) saflaştırmasında sırayla polietilen glikol (PEG) çöktürme, DEAE iyon değişim kromatografisi, fenil superose kromatografisi ve mono Q iyon değişim kromatografisi kullanmışlar ve saflaştırma sonucunda verim % 33 elde etmekle birlikte, saflaştırma katsayısını 960 kat olarak bulmuşlardır. Gümüş boyama ile gerçekleştirilen SDS-PAGE jeli ile enzime ait 52 kDa'luk tek bir bant tespit etmişlerdir. Jel filtrasyon ile bulunan enzim mol kütleleri 98 kDa olduğuna göre *Gryllus assimilis*'ten JHE'nin, aynı veya benzer alt birimlerin dimer olduğunu bildirmişlerdir. İzoelektrik fokuslama kullanarak izoelektrik noktası 4.7-4.9 arasında değişen 4

izoform bulmuşlardır. İzofomların N-terminal amino asit dizileri (11-20 amino asit), 1-4 pozisyonlarında birbirlerinden farklı olduğu için izofomların aynı veya benzer genlerin ürünleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)'de insektisit direncinden sorumlu faktörlerin belirlenmesi amacıyla Srinivas ve ark. (2004) tarafından bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada *Helicoverpa armigera*'nın larvaları beş insektisite (sipermetrin, fenvalerat, endosülfan, monokrotofos ve quinalphos) karşı direnç açısından test edilmiştir. Larvalar, duyarlı böceklerin % 99'unu öldürecek bir pestisit dozu kullanılarak dirençli suşların hayatta kalma yüzdesi belirlenmiştir. En yüksek mevsimsel ortalama hayatta kalma oranı fenvalerat (% 65.0) ve ardından sipermetrin (% 62.4) tarafından kaydedilmiştir. Dirençli larvaların asetilkolinesterazı, monokrotofos ve metil paraoksone karşı daha az hassastır. Dirençli larvalar duyarlı larvalara kıyasla daha yüksek esteraz, fosfataz ve metil paraokson hidrolaz aktiviteleri göstermiştir. Yüksek esteraz aktivitesinin varlığı, Nativ-PAGE'de ekstra esteraz bantlarının görünümü ile açıklanmıştır.

Bir kınkanatlı türü olan *Prionus insularis*'in sindirim kanallarından izole edilen *Burkholderia* sp. HY-10'un hücre dışı bir lipazı karakterize edilmiştir. Lipaz, kültür süpernatantından adsorpsiyon-desorpsiyon prosedürü ile saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin SDS-PAGE tekniği ile 33.5 kDa mol kütleline sahip olduğu bulunmuştur. Saflaştırılmış lipaz, pH 8.5 ve 60 °C'da en yüksek aktivite göstermiştir. 4 ile 18 karbonlu p-nitrofenil esterler substratları, lipaz tarafından verimli bir şekilde hidrolize edilmiş ve en verimli substrat, p-nitrofenil kaproat (C6) olduğu tespit edilmiştir (Park ve ark., 2007).

Zibae ve ark. (2008), *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera, Pyralidae)'nin larvalarının orta bağırsak ve tükürük bezlerindeki lipaz ve invertaz enzimleri aktivitesini araştırmışlardır. Buna göre, orta bağırsak ve tükürük bezlerinde lipaz/invertaz aktiviteleri sırasıyla 0,49/0,27 ve 0,35/0,23 $\mu\text{mol (dk mg protein)}^{-1}$ olarak bulunmuş ve her iki enzim için optimum pH ve sıcaklık 10-11 ve 37-40 °C olarak belirlenmiştir. Enzimlerin aktivitelerinin, NaCl, KCl, MgCl₂, SDS, üre ve *Artemisia annua*'dan bitki özütleri ilave edilerek azalttığını bulmuşlardır. Tam tersine enzim aktivitesinin CaCl₂ eklenerek arttığı tespit etmişlerdir. Bu nedenle, böcek sindirim enzimlerinin karakterizasyonu, özellikle enzim aktivitesi üzerindeki

inhibisyon etkilerinin incelenmesi, haşere kontrolü için yeni stratejiler geliştirmede faydalı olabileceğini rapor etmişlerdir.

Mateus ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada Nativ-PAGE yöntemi kullanılarak *Drosophila* türlerinde esteraz izoenzimlerinin mol kütlelerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Buna göre, *Drosophila mojavensis* ve *D. arizonae* türlerinden iki esterazın mol kütlelerinin bulunması için farklı yüzdelerdeki Nativ-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmış ve bu enzimlerin (EST-4 ve EST-5) 81 ila 91 kDa arasındaki mol kütlelere sahip oldukları bulunmuştur. Bu yöntemin, saflaştırma yapmaksızın esteraz enzimlerinin mol kütlelerinin belirlenmesinde kullanışlı olabileceği rapor edilmiştir.

Abd El-Latif ve Subrahmanyam (2010) *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)'nin üç suşunda piretroid direnci ile esteraz aktivitesini incelemişlerdir. Deltametrin'e karşı yüksek derecede direnç gösteren tarla suşlarının (Nagpur suşu ve Delhi suşu) üçüncü ve beşinci instar larvaları, duyarlı bir laboratuvar suşuna kıyasla daha yüksek esteraz aktivitesine sahip olduğunu bulmuşlardır. Nagpur suşu ve Delhi suşunun üçüncü instar larvalarındaki dirençli böceklerin sıklığı sırasıyla % 29 ve % 23 olarak bulunurken, duyarlı suşta % 4 olduğunu tespit etmişlerdir. Beşinci instar larvalarında ise, Delhi suşu ve Nagpur suşunda sırasıyla % 63 ve % 90'lık bir frekans dağılımına sahipken, duyarlı suşta bireylerin sadece % 14'ünün yüksek esteraz aktivitesine sahip olduğunu bulmuşlardır. *H. armigera*'da piretroid direncinde esterazın rol oynadığını rapor etmişlerdir.

Min ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada asetilkolinesterazın (AChE, EC3.1.1.7) *Pardosa astrigera* (L. Koch) (Araneae: Lycosidae)'nin bazı dokularından saflaştırılmasına ve kısmi karakterizasyonunun belirlenmesine odaklanmışlardır. AChE'nin saflaştırılmasında, tuz çöktürme, DEAE-52 iyon değişim kromatografisi ve Superdex 200 jel filtrasyon kromatografisi kullanmışlar ve saflaştırma katsayısı 229.60 kat ve verim % 13.88 olarak bulmuşlardır. Saflaştırılmış AChE için, 30 °C, pH 7.5 ve 700 µmol L⁻¹ ATChI kullanıldığında en yüksek aktiviteyi gözlemlemişlerdir. SDS-PAGE tekniğiyle mol kütlesi 66.35 kDa olan tek bir bant görülmüştür. Bununla birlikte, Nativ-PAGE jel elektroforezi yöntemiyle üç bant bulmuşlar ve AChE'nin üç formunun var olduğunu tespit etmişlerdir. Hem homojenat hem de saflaştırılmış AChE için metomil, foksim, beta sipermetrin ve klorpirifos kullanarak IC50 hesaplamışlar ve saflaştırılmış AChE'nin homojenattan daha duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Low ve ark. (2013), *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)'deki potansiyel insektisit direncindeki olası biyokimyasal mekanizmalarını karakterize etmeye çalışmışlardır. Bu çalışma ile, Malezya'nın 14 bölgesinden toplanan *Culex quinquefasciatus*, farklı insektisit kullanarak insektisit direncini değerlendirmişlerdir. Enzim aktiviteleri araştırılmak suretiyle onüç popülasyonda α esteraz bantlarını yoğun bir şekilde bulurken, oniki popülasyonda ise β esteraz bandının daha yoğun bir şekilde ifade edildiğini bildirmişlerdir. Dokuz popülasyonda ise, karışık fonksiyonlu oksidaz ve glutatyon-S-transferaz seviyelerinin yükseldiğini tespit etmişlerdir.

Lipid metabolizmasında ve organofosfat (OP) böcek öldürücülerinin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan böcek karboksilesterazları (α E7) yapısı ve işlevi hakkında bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada Avustralya koyun sineği *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae)'nin α Esteraz7 geni, *Escherichia coli*'de klonlanıp, gen ürününün aşırı ifadesi gerçekleştirilmiştir. Kristal yapı, OP'lerin birincil hedef olan asetilkolinesteraza çok benzeyen bir α/β -hidrolaz (fold) katını ve benzersiz bir N-terminal α -sarmalını göstermiştir. Lc α E7 kristallerinin OP'lere sokulması, Lc α E7'nin fosforile edilmiş haliyle kristalografik bir görüntüsünün yakalanmasına yol açmış ve Lc α E7 asetilkolinesteraz ile karşılaştırmaya ve böcekleri OP'lerin etkilerine karşı koruma kabiliyetinin rasyonelleştirilmesine olanak sağlamıştır. Lc α E7 aktif bölgesinin incelenmesiyle, yağ asidi metil esterlerine uygun olan asimetric ve hidrofobik bir substrat bağlanma boşluğu olduğu rapor edilmiştir (Jackson ve ark., 2013).

Murthy ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada Hindistan'daki farklı şehirlerden toplanan *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae)'nin üzerine üç insektisit Spinosad % 45 SC, Indoxacarb % 14.5 SC ve Novoluron % 10 EC böcek direnci açısından değerlendirilmiş ve esteraz enzim motifleri belirlenmiştir. Haydarabad kaynaklı böceklerin diğer şehirlerden toplanan böceklere göre üç insektisite karşı daha dirençli olduklarıyla birlikte, Delhi'den toplanan böcek popülasyonunun çalışmadaki tüm insektisitlere karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Haydarabad, Pune, Tirupathi ve Varanasi'den toplanan dirençli parazitoidin popülasyonlarında artmış karboksil esteraz aktivitesi gözlenmiştir. Nativ-PAGE yöntemi ile ve α -naftil asetat boyama kullanılarak *Cotesia vestalis*'in çeşitli popülasyonlarında karboksilesteraz bantları tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak,

detoksifiye edici enzimlerin aktivitesinin, populasyonlardaki değişiklikler ve direnç derecesi sorumlu olduğu rapor edilmiştir.

Ectomyelois ceratoniae (Lepidoptera: Pyralidae) orta bağırsakta lipaz enziminin saflaştırmasına ve karakterize edilmesine dair bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürme, Sefakryl G-100 kromatografisi ve dietil amino etil (DEAE)-selüloz kromatografisi kullanılarak 0.4 U (mg protein)⁻¹'lik spesifik aktivite, % 29.62 verim, 28.57 kat saflaştırma ve 25 kDa mol kütlelerine sahip olan bir enzim preparatı elde edilmiştir. Saflaştırılmış lipaz, pH 7'de ve 30 °C'da en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Enzimin, 30 °C'da 3 saat boyunca stabil olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılmış lipazın olası inhibisyonunu bulmak için farklı konsantrasyonlarda fenil metil sülfonil florür (PMSF) ve etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) kullanılmıştır. Farklı EDTA konsantrasyonlarının inhibitör etkisi olmadığı, ancak artırılan PMSF (fenil metil sülfonil florür) konsantrasyonunun lipazın aktivitesini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Uzun zincirli doymamış yağ asitleri temel diyet bileşenleri olduğundan, sindirim lipazlarının inhibisyonunun, böceklerin büyümesinde ve gelişiminde ciddi bir azalmaya neden olabileceği rapor edilmiştir. Bu nedenle, böcek sindirim lipazlarının biyokimyasal özelliklerinin ve inhibisyonunun incelenmesi, bitki ıslah programlarında bütünleşik haşere yönetiminin bir bileşeni olarak gerekli olduğu bildirilmiştir (Ranjbar ve ark., 2015).

Bactrocera dorsalis (Hendel) (Diptera: Tephritidae)'de malatyon detoksifikasyonundan sorumlu olan bir α -esteraz geni (fonksiyonel) karakterize edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, organofosfat insektisitinin direnç mekanizmalarını incelemek için malatyon'a karşı 21 kat daha yüksek dirençli bir *B. dorsalis* malatyon-duyarsız suşu kullanılmıştır. Bu çalışmada, malatyon-duyarsız suşunda malatyon direncinin toksik olmayan karboksilesteraz (CarE) inhibitörü olan trifenil fosfat (TPP) ile birlikte malatyon tedavisinden sonra 8 kat daha etkili bir şekilde bastırıldığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, *B. dorsalis*'te malatyon direnç mekanizmalarının, karboksilesterazlar ile yakından ilişkili olduğunu güçlü bir şekilde göstermektedir. Moleküler çalışmalar ayrıca, *B. dorsalis*'te malatyon direncinin geliştirilmesinde gen upregülasyonu ile işlev görebilecek önceden karakterize edilmemiş bir α -esteraz geni olan BdCarE2'yi tanımlamış. BdCarE2'nin transkript seviyeleri ayrıca malatyon-duyarsız ve *B. dorsalis*'in bir malatyon-duyarlı suşu arasında da karşılaştırıldı ve

malasyon-duyarsız suşunda anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (Wang ve ark., 2016).

Yapılan başka bir çalışmada, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)'den izole edilen bağırsak mikroflorasının çeşitliliğini belirlemeye, esteraz aktivitesini ölçmeye ve indoxacarb'ın bozulmasındaki muhtemel rolünü açıklamaya çalışmıştır. Larvalardan (n = 13) ve erişkinlerden (n = 12) böcek bireyinden 25 bakteri izolatu elde edilmiştir. 19 adet bağırsak bakteriyel izolatından esteraz aktivitesi, 0.072 ila 2.32 pmol (dk mg protein)⁻¹ arasında bildirilmiştir. Nativ-PAGE yöntemi kullanılarak, bulunan dört farklı esterazdan üç tanesi, inhibitör olarak profenofos kullanılmak suretiyle karboksilesteraz olarak tanımlanmıştır. Minimal medya çalışması *Bacillus cereus*'un indoxacarb'ı % 20'ye kadar degrade edebileceğini göstermiş ve böylece *B.cereus*'un indoxacarb'ı metabolizma ve büyüme için kullanabileceği tespit edilmiştir. Böcek esterazlarının yanı sıra, bakteriyel karboksilesteraz, *P. xylostella*'daki insektisitlerin degrade edilemesinde yardımcı olabileceği rapor edilmiştir (Ramya ve ark., 2016).

Dahan-Moss ve Koekemoer (2016) tarafından yapılan bir çalışmada yetişkin *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae)'in yaşam süresi boyunca farklı yaşlarda esteraz aktivite düzeylerini analiz edilmiştir. Laboratuvarda kolonize edilen *A. funestus* yetişkinleri ekosyondan sonraki 2 saat ila 30 gün arasında yaşlandıkları ve yabanıl *A. funestus* yetişkinleri ekosyondan 2 saat ila 15 gün sonra yaşlandıkları çalışmanın materyali olarak kullanılmış ve izoenzim elektroforezi (IEE) jellerinin densitometri analizi ile esteraz aktiviteleri ölçülmüştür. Dokuz esteraz IEE profili, hem laboratuvarda yetiştirilmiş hem de yabanıl *A. funestus* yetişkinlerinde bulunmuş ve esterazlar, aktivite inhibisyonlarına göre organofosfatlar, eserine sülfat ve sülfiril reaktifleri ile asetil esterazlara, arilesterazlara, karboksilerazlara ve asetilkolinesteraza sınıflandırılmıştır. Bu çalışmadaki önemli sonuçlardan birisi olarak, bazı spesifik esterazların aktivite seviyesinin öncelikle yaş ve/veya cinsiyetten etkilendiğini bildirilmiştir.

Shin ve Smartt (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, insektisit direncinin gelişimini daha iyi anlamak için tarla sivrisineklerinde (*Culex nigripalpus*)'ta böcek ilacı direncinde bulunan Temsha est-1 (TE-1) geninin ekspresyon seviyesi test edilmiştir. TE-1'in ekspresyon seviyesinin organofosfat insektisite maruz kalma sıklığına bağlı olarak değiştiği bulunmuştur. TE-1 cDNA'sının tamamen sekanslanmış ve diğer

sivrisinek türlerinin B esteraz genleri ile % 96'ya kadar nükleotit sekans özdeşliği bulunmuştur. TE-1'in tolerans/direnç oluşumunun bir göstergesi olarak kullanabileceği ve en hassas olan böcek popülasyonlarına insektisit hedefe yönelik uygulanmasına imkan vererek sivrisinek kontrol çabalarını büyük ölçüde artırabileceği rapor edilmiştir.

Dai ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada çin beyaz çam böceği (*Dendroctonus armandi*)'den karboksilesteraz genleri izole edilmeye ve bunların terpenoidlerine karşı tepkisi bulunmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada *D. armandi*'nin sekiz yeni karboksilesteraz geni belirlenmiş ve elde edilen tam uzunlukta amino asit dizileri üzerinde biyoinformatik analiz yapılmıştır. Karboksilesteraz genlerinin transkripsiyon seviyeleri, ev sahibi ağaçlar (host trees) tarafından salınan terpenoidlerinin detoksifikasyonunda ilgili olduğunu göstermiştir. Böceğin esterazının fonksiyonlarının, esas olarak konukçunun kimyasal savunmasını zayıflatmakta ve konukçu seçimi ve kolonizasyonu sırasında koku veren moleküllerin parçalanmasında rol oynamakta olduğu bildirilmiştir.

Diplolepis fructuum (Rübsaamen, 1895) ekonomik önem arz eden Rosaceae bitki türlerinin zararlılarının en önemlileri arasında yer almaktadır. Türün biyokimyası ile ilgili literatürde bir bilgi birikimi bulunmamakla birlikte, gelişim evrelerindeki yağ asidi bileşimi ile ilgili sadece bir çalışma bulunmaktadır (Akpınar ve ark., 2017). Özellikle, böceklerde esteraz gen mutasyonları ya da esteraz genlerinin aşırı ifadesi gibi nedenlerden dolayı aynı insektisit art arda uygulamalarıyla böcek popülasyonlarında bu insektisite karşı direnç gelişmektedir. Organizmadaki asıl fonksiyonunun eksojen olarak alınan yağ türünden ya da hücrel olarak sentezlenen yağ tarzındaki bileşenlerin dönüşümünün katalizlenmesi gibi görünen esterazların, Dubey ve ark. (2000)'de belirttiği gibi asıl substratlarının tam olarak bilinmemekle birlikte, eksojen olarak karşılaşılan ve suda çözünmeyen ya da zayıf çözünürlüğe sahip, yağ benzeri ester bileşenlerini de substrat olarak kabul ettikleri görülmektedir. Bu olgunun, karasal yaşama en iyi uyum yapan organizmalar olmakla meşhur olan insekta grubunun üyelerine bir avantaj daha kazandırdığı yadsız bir gerçektir. Bu nedenlerden dolayı, mevcut yüksek lisans tez çalışmasında, *D. fructuum*'un larval evresinde ifade edilen bir esterolitik fraksiyonun saflaştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, N,N,N',N'-tetrametiletilediainin (TEMED, C₆H₁₆N₂), etilendiainin tetraasetik asit (EDTA, C₁₀H₁₆N₂O₈), α-naftil asetat (α-NA, C₁₂H₁₀O₂), Fast Blue RR Salt (C₁₅H₁₄ClN₃O₃·0.5ZnCl₂), 1,4-ditiyotreitil (DTT, C₄H₁₀O₂S₂), Bradford Reagent, Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris, C₄H₁₁NO₃), glisin (C₂H₅NO₂), 4-nitrofenil asetat (p-NPA, C₈H₇NO₄), 4-nitrofenil bütirat (p-NPB, C₁₀H₁₁NO₄), 4-nitrofenil dekanolat (p-NPD, C₁₆H₂₃NO₄), 4-nitrofenil palmitat (p-NPP, C₂₂H₃₅NO₄), sığır serum albümini (BSA), amonyum persülfat (APS, (NH₄)₂S₂O₈), D-Mannitol (C₆H₁₄O₆), izoproponal (C₃H₈O), asetonitril (C₂H₃N), aseton (C₃H₆O), hidroklorik asit (HCl), asetik asit (CH₃COOH), formaldehit (CH₂O) kimyasalları Sigma ticari marka elde edilmiştir. Akrilamid (C₃H₅NO), bis-akrilamid (C₇H₁₀N₂O₂), sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄), Bromophenol mavisi (C₁₉H₁₀Br₄O₅S), gümüş nitrat (AgNO₃), sodyum tiyosülfat (Na₂S₂O₃), sodyum karbonat (Na₂CO₃), potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), di-potasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), 2-merkaptotanol (C₂H₆OS), metanol (CH₄O), etanol (C₂H₅OH) kimyasalları ise Merck ticari marka olarak elde edilmiştir. Araştırmada kullanılan kimyasalların hepsi moleküler biyolojik saflıkta kullanılmıştır.

2.2 Kullanılan Çözeltiler

Yapılan çalışma boyunca kullanılan tüm kimyasal çözeltiler ve içerikleri aşağıda gösterilmiştir.

1. Homojenat Tamponu: 50 mM Tris-HCl pH: 7.40 (5 mM (0.9108 g L⁻¹) D-Mannitol, 1 mM (0.292 g L⁻¹) EDTA, 1 mM (0.154 g L⁻¹) DTT katkılı)
2. Kolon Denge Tamponu 1: 20 mM Tris-HCl pH: 7.80 (Q Sefaroz iyon değişim kromatografisi ve Sefakril S100-HR jel filtrasyon kromatografisi kolon dengelenmesinde kullanılan tampon)
3. Kolon Denge Tamponu 2: 20 mM Tris-HCl pH: 7.80 (100 mM Amonyum sülfat katkılı) (Fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi kolon dengelenmesinde kullanılan tampon)
4. Aktivite Tamponu: 50 mM Tris-HCl pH: 8.0 (% 4 Etanol katkılı)
5. Elektforez Aktivite Tamponu: 50 mM Tris-HCl pH: 8.3
6. Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (29.2 g + 0.8 g)

7. 4X Ayırıcı Jel: 1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)
8. 4X Yükleme Jeli: 0.5 M Tris-HCl (pH: 6.8)
9. 5X Tank Tamponu: 0.125 M Tris, 0.96 M Glisin (pH: 8.3) (nativ-PAGE uygulaması için)
10. 5X Tank Tamponu: 0.125 M Tris, 0.96 M Glisin (pH: 8.3) (0.1 % SDS katkılı) (SDS-PAGE uygulaması için)
11. Substrat Çözeltisi: 50 mM p-NPB (p-nitrofenil bütiratın saf asetonitrilde çözünmesi sağlanmıştır)
12. Organik Çözücüler: Aseton, izopropanol, asetonitril, metanol, etanol

2.3 Kullanılan Cihazlar

Hesas Terazi (Axis AGN220C)

Homojenizatör (Janke & Kunkel Ultra-Turrax T 25)

Ultrasantrifüj (Sanyo MSE MS 60)

Santrifüj (Sigma 6k15)

Vorteks (Velp Scientifica)

Manyetik karıştırıcı ısıtıcı (Jeio Tech)

pH metre (SevenCompact pH/Ion S220)

Peristaltik pompa (J.P. SELECTA, s.a.)

Sıcaklık ayarlamalı su banyosu (Grant LTD 60)

UV-Vis Spektrofotometre (Thermo Scientific Evolution 201)

Protein elektroforezi (Consort EV202)

2.4 Deney Materyalinin (*Diplolepis fructuum* Larva Örnekleri) Sağlanması

Bu çalışmada *Diplolepis fructuum* larvaları kullanılmıştır. Örnekler Sivas (Türkiye) ilindeki farklı yörelerde dağılmış olan *Rosa canina* (kuşburnu) bitkisi üzerindeki gallerden toplanmıştır. *R. canina* galeri, Gürün, Şarkışla, Gemerek, Kangal, Divriği, Zara, Suşehri ve Koyulhisar gibi farklı yerlerden toplanmıştır. Gal örnekleri laboratuvara taşınmış ve *D. fructuum*'un larvalarını, embriyolojik büyüme aşamalarının ardışık formasyon sırasına göre elde etmek için kullanılmıştır. Embriyolojik gelişim sürecine göre elde edilen *D. fructuum*'un larvalarının deney maddesi olarak kullanılması için -20 °C'da bir dondurucuda depo edilmiştir.

2.5 *D. fructuum* Larvası Esteraz Enzim Ekstraktının Hazırlanması

3 g kütle olacak şekilde hassas terazi yardımıyla tartılan *D. fructuum* larva örneklerinin üzerine soğuk olarak 15 mL pH 7.4, 50 mM Tris-HCl (5 mM D-Mannitol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) homojenat tamponu eklenmiştir. Janke & Kunkel markalı homojenizatörde 22.000 devir dk^{-1} hızda buz ile homojenat ortamını soğutmak kaydıyla 5 dakika süresince homojenize edilmiştir. Örnek 10.000xg'de 4 °C'da ve 15 dakika süresince santrifüj edilerek süpernatant kısmı elde edilmiştir. Örneğin yeteri derecede homojenizasyonunu sağlayabilmek amacıyla santrifüjleme sonucu elde edilen dipteki tortu kısmına tekrar 15 mL homojenat tamponu ilave edilmiş ve 22,000 devir dk^{-1} hızda 4-5 dakika süresince homojenize işlemi tekrar gerçekleştirilmiştir. Bu fraksiyon tekrar santrifüj edilerek elde edilen süpernatant kısımları birleştirilerek, 31 mL hacime sahip *D. fructuum* larva ham doku homojenatı elde edilmiştir. Kromatografik işlemler esnasında örneği uygulayabilmek için MWCO (Molecular Weight Cut Off) değeri 10 kDa olan ultrafiltratör yardımıyla santrifüjlenerek konsantre edilmiştir. Bu işlemi takiben, hem üst sıvı hem de filtratörün alt kısmında kalan filtratta enzim aktivitesi araştırılmıştır.

2.6 Kromatografik İşlemler

D. fructuum larval esteraz enzimini saflaştırmak üzere 3 farklı kolon kromatografik yöntemi kullanılmıştır. Sırası ile ilk önce Q Sefaroz (anyon değişim kromatografisi), ikinci saflaştırma basamağında fenil sefaroz CL-4B (hidrofobik etkileşim kromatografisi) ve en son saflaştırma basamağı olarak sefakril S100-HR (jel filtrasyon kromatografisi) kullanılmıştır.

2.6.1 Q Sefaroz anyon değişim kromatografisi

Saflaştırmanın birinci aşamasında anyon değişim tekniği kullanılmış ve bunun için ticari olarak sağlanan ve % 20'lik etanol içerisinde doğrudan kullanıma hazır bulunan Q sefaroz kolon dolgu maddesi kullanılmıştır. Bu süspansiyondan alınarak 1×20 cm'lik kolona 20 mL'lik çökelek elde edilecek şekilde doldurulmuştur. İlk önce kolon su ile yıkanarak etanol uzaklaştırılmış ve daha sonra pH 7.8, 20 mM Tris-HCl tamponu ile yıkanarak dengelenmiştir. Kolon dengelendikten sonra örnek kolona uygulanmış ve kolona tutulmayan seriler toplanmak üzere pH 7.8, 20 mM Tris-HCl tamponuyla yıkanmıştır. Peristaltik pompa kullanılarak, elüsyon serileri 3 mL dk^{-1} akış hızında olacak şekilde 4'er mL halinde tüplerde toplanmıştır. Kolona bağlanan proteinlerin

elde edilmesi için, 20 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak (100-1000 mM) NaCl içeren tuz serileri hazırlanmış ve kolondan geçirilmiştir.

Toplanan tüplerin 280 nm'deki absorbanlarına ve 405 nm'de enzim aktivitesine bakılmıştır. Esteraz aktivitesi gösteren fraksiyonların protein miktarı Bradford yöntemi ile değerlendirilmiş ve spesifik aktivite hesaplanmıştır. Yüksek spesifik aktivite gösteren fraksiyonlar bir araya toplanmış ve bir sonraki kromatografide kullanılmak üzere -20 °C'da muhafaza edilmiştir.

2.6.2 Fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi

D. fructuum larval esterazının saflaştırılması işleminin ikinci adımı olarak hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmış ve bu maksatla durgun faz olarak fenil sefaroz CL-4B kullanılmıştır. Bunun için % 20'lik etanol içerisinde kullanıma hazır sağlanan fenil sefaroz kolon dolgu maddesinden alınarak yine 1×20 cm'lik kolona doldurulmuştur. Kolondan distile su geçirilerek etanol uzaklaştırılmıştır. Kolonun dengelenmesi için 100 mM amonyum sülfat katkılı pH 7.8 kolon denge tamponu kullanılmıştır. Bir önceki saflaştırma kolonundan alınan yüksek aktiviteli fraksiyonun kolona uygulanmasını takiben, kolon 40 mL aynı tampon kullanılarak kolona bağlanmayan fraksiyonları elde etmek için yıkanmıştır. Kolona bağlanmış olan fraksiyonların elde edilmesi için kolon öncelikle 40 mL amonyum sülfat içermeyen kolon denge tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra ise kolon 40'er mL % 10, % 20, % 50 izopropanol konsntrasyonuna sahip kolon denge tamponu ile yıkanarak kolona bağlanmış protein fraksiyonları elde edilmiştir. Peristaltik pompa kullanılarak kolonun akış hızı 2 mL dk⁻¹ olacak şekilde ayarlanmış ve elüsyonlar 4'er mL olacak şekilde tüplere toplanmıştır.

Toplanan elüsyonların protein miktarı belirlemek amacıyla 280 nm'de absorbanı bakılırken, esteraz enzim aktivitesi araştırılmak üzere 405 nm'de aktivitesi araştırılmıştır. Aktivite gösteren tüpler için Bradford yöntemi kullanılarak protein miktarı belirlenmiş ve spesifik aktivite bulunmuştur. Yüksek spesifik aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak bir sonraki saflaştırma adımı için saklanmıştır.

2.6.3 Sefakril S100-HR jel filtrasyon kromatografisi

Bu çalışmanın son saflaştırma aşamasında jel filtrasyon tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla 1×30 cm'lik kolona % 20'lik etanol içerisinde tedarik edilen Sefakril S100-HR'den alınarak kolona doldurulmuştur. Daha sonra pH 7.8, 20 mM Tris-HCl

tamponu ile kolon dengelenmiştir. Bir önceki fenil sefaroz CL-4B kolonundan toplanan ve yüksek esteraz aktivitesine sahip olan fraksiyonlar hacminin azaltması için örnekler ultrafiltratör yardımıyla 1 mL'lik hacime kadar konsantre edilmiş ve örnek Sefakril S 100-HR kolonuna uygulanmıştır. Daha sonra pH 7.8, 20 mM Tris-HCl tamponu ile kolon yıkanmak suretiyle 2.5 mL hacimde olacak şekilde tüplere toplanmıştır. Kolon 280 nm'de absorbans sıfıra yaklaşıncaya kadar kolon dengelenecek şekilde yıkanmıştır.

Elde edilen tüpler için hem 280 nm'de protein miktarı hem de esterolitik aktivitesi ölçülmüştür. Aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve elektroforez ve kinetik analiz çalışmalarında kullanılmak için -20 °C'da saklanmıştır.

2.7 Esteraz Enzim Aktivitesi Ölçülmesi

Esteraz aktivitesi Bülow ve Mosbach (1987) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Enzim aktivitesi, p-nitrofenil bütirat (p-NPB) substrat olarak kullanılarak 405 nm dalga boyunda köre karşı 3 dakika boyunca takip edilerek araştırılmıştır.

Aktivite tamponu olarak pH 8.0, 50 mM Tris-HCl ve % 4 etanol katkılı tampon kullanılırken substrat olarak 50 mM p-NPB saf asetonitrildeki çözelti kullanılmıştır. Örnek tüpü 1 mL olacak şekilde 970 µL aktivite tamponu, 20 µL substrat ve 10 µL örnek'ten (ya homojenat ya da kolon örnekleri) alınarak kuvartz küvete eklenerek hazırlanırken, kör tüpü için 980 µL aktivite tamponuna 20 µL substrat ilave edilerek hazırlanmıştır (Tablo 2.1). Enzim aktivitesi 30 °C'da ölçülmüş ve ısı inkübatörü olarak sıcaklık ayarlamalı Grant LTD 60 markalı su banyosu kullanılmıştır. Spektrofotometre olarak Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible cihazı kullanılmıştır. Bir enzim ünitesi 1 dakika içerisinde reaksiyon koşulları altında p-NPB'nin p-NP'e dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$\text{Ünite aktivite} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A / \Delta t \quad (\mu\text{mol (mL dk)}^{-1})$$

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot c_{\text{protein}}} \cdot \Delta A / \Delta t \quad (\text{U (mg protein)}^{-1})$$

V; toplam hacim

ϵ ; molar absorpsiyon katsayısı (11500 M⁻¹ cm⁻¹)

d; ışın yolu (1 cm)

v ; kullanılan örnek hacmi
 c ; protein derişimi (mg mL^{-1})

Tablo 2.1 Enzim aktivitesi tayininde kullanılan çözeltiler

Tepkime Bileşenleri	Kör tüpü (μL)	Örnek tüpü (μL)
Aktivite Tamponu	980	970
Substrat (p-NPB)	20	20
Enzim Çözeltilisi	-	10
Toplam tepkime hacmi	1000	1000

2.8 Protein Miktarı Ölçümleri

Protein miktarını belirlemek için kromatografik çalışmalardan toplanan elüatların 280 nm’de absorbansı araştırılmıştır. Hem kolondan toplanan ve yüksek aktivite gösteren tüpler için hem de homojenat için protein miktarı tayin edilmek üzere Bradford protein metodu esaslı olan ve Bollag ve ark. (1996) tarafından geliştirilen yöntem uygulanmıştır. Bunun için Coomassie Brilliant Blue G-250 içeren ve kullanıma hazır haldeki Bradford Reagent boya olarak kullanılmıştır. Standart Protein çözeltisi hazırlamak için 1 mg mL^{-1} derişimdeki sığır serum albümini (BSA) çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 9 adet ependorf tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 20.0, 30.0 μL 1 mg mL^{-1} derişimindeki BSA çözeltisinden konulmuştur. Homojenat ve kolon örnekleri için farklı hacimde alınarak yeni ependorflara eklenmiştir. Her tüp içeriğinin hacmi distile su ile 100 μL ’ye tamamlanmıştır. Daha sonra 1 mL kullanıma hazır bulunan Bradford Reagent tüm tüplere ilave edilmiş ve vorteks ile karıştırma işlemi yapılmıştır. 20 dakika karanlıkta beklendikten sonra köre karşı absorbans değerleri 595 nm’de okunmuştur.

Protein miktarı standart serilerin absorbans değerlerine karşı kullanılarak çizilen BSA standart eğri grafiğinden faydalanılmış ve örneklerin absorbans değerleri alınarak protein miktarları belirlenmiştir.

Tablo 2.2 Protein miktarı tayininde kullanılan standart çözeltilerin içeriği

BSA (1 mg mL⁻¹) (µL)	Distile su (µL)	Bradford-Reagent (µL)
0	100	1000
2.5	97.5	1000
5	95	1000
7.5	92.5	1000
10	90	1000
12.5	87.5	1000
15	85	1000
20	80	1000
30	70	1000

2.9 *D. fructuum* Larval Esterazı Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Saflaştırılan esteraza sıcaklığın etkisi araştırılmak üzere 7 farklı sıcaklık değerinde (4, 10, 20, 30, 40, 60 °C) standart aktivite ölçüm metodu kullanılmıştır. Bu amaç için, saf örnekten 10 µL alınarak 970 µL aktivite tamponu (50 mM Tris-HCl pH: 8) içeren epandorflara eklenmiş ve her bir ilgili sıcaklıkta 15 dakika süresince inkübe edilmiştir. Süre bitikten sonra epandorfların içeriği kuvartz küvete alınmış ve 50 mM p-NPB çözeltilisinden 20 µL ilave edilerek aktivitesine bakılmış ve her bir sıcaklık için üç tekrar olacak şekilde aktivite değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak aktivite-sıcaklık grafiği çizilmiştir.

2.10 *D. fructuum* Larval Esterazı Optimum pH'ın Belirlenmesi

Saflaştırılan esteraz aktivitesine pH'ın etkisinin değerlendirilmesi için 7 farklı pH değerinde (5.77, 6, 6.5, 6.9, 8, 9, 10.8) standart aktivite ölçüm metodu kullanılmıştır. Bu amaçla pH'sı (5.77 – 6.9) aralığı ve pH'sı (8 - 10.8) aralığında sırasıyla 50 mM

fosfat tamponu ve 50 mM Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Bunun için 10 µL saflaştırılan enzim alınarak ve her bir pH noktası için 15 dakika 30 °C'da inkübe edilmiştir. Daha sonra 20 µL 50 mM p-NPB substrat eklenip enzim aktivitesi ölçülmüştür. Her bir pH noktası için üç tekrar yapılmış ve elde edilen aktivite değerleri kullanılarak aktivite-pH grafiği oluşturulmuştur.

2.11 *D. fructuum* Larval Esterazı Üzerine Substrat (p-NPB) Konsantrasyonun Etkisi

D. fructuum larval esterazının V_{max} ve K_m parametrelerini hesaplamak amacıyla 8 farklı p-NPB (0.025-1.25 mM) derişimi ve aktivite tamponu (50 mM Tris-HCl pH: 8) kullanılarak 30 °C'da enzim aktivite değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Linweaver-Burk grafiği haline getirilmiş ve enzimin V_{max} ve K_m değerleri belirlenmiştir. Tüm ölçümler üç tekrarlı olacak şekilde yerine getirilmiştir.

2.12 *D. fructuum* Larval Esterazı Üzerine Substrat Zincir Uzunluğunun Etkisi

Farklı zincir uzunluklarına sahip olan substratlar p-NPA (4-Nitrophenyl asetat, $C_8H_7NO_4$), p-NPB (4-Nitrophenyl bütirat, $C_{10}H_{11}NO_4$), p-NPD (4-Nitrophenyl dekanat, $C_{16}H_{23}NO_4$), p-NPP (4-Nitrophenyl palmitat, $C_{22}H_{35}NO_4$) kullanılarak *D. fructuum* larval esteraze substrat zinciri uzunluğunun aktiviteye olan etkisi belirlenmiştir. Bunun için substrat değiştirilerek enzim aktivite tayininde kullanılan yöntem (30 °C, pH: 8) uygulanmış ve bütün ölçümler üç kez tekrar edilmiştir.

2.13 *D. fructuum* Larval Esterazının Termal Kararlılığının Belirlenmesi

D. fructuum larvasından saflaştırılan esterazın termal kararlılığının belirlenmesi için maksimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta (40 °C) 0.5, 1, 2, 3, 4 saat süresince inkübe edilmiştir. Bu amaçla 10 µL saf enzim ve 970 µL aktivite tamponu (50 mM Tris-HCl pH: 8) ependorflara eklenerek bekletilmiştir. Her bir süre için üç deney yapılmış ve süre bittikten sonra tüplere 50 mM p-NPB substratından 20 µL ilave edilerek esteraz aktivite değerleri elde edilmiştir.

2.14 Elektroforetik Çalışmalar

Elektroforetik çalışmalar Nativ-PAGE ve SDS-PAGE olmak üzere iki kısımda yerine getirilmiştir. Esteraz enzim aktivitesinin incelenmesi için denatüre olmayan yani nativ-poliakrilamid jel elektroforez (Native-PAGE) yöntemi kullanılırken, saflaştırılan örneğin içeriğinde bulunan tüm proteinleri belirleyebilmek amacıyla denatüre Sodyum

Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. İki yöntemde kullanılan tüm çözeltilerin içeriği ve hazırlama yöntemi aşağıda belirtilmiştir.

2.14.1 Çözeltiler

2.14.1.1 % 30 Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi

29.2 g akrilamid ve 0.8 g bis-akrilamid alınarak distile su ile çözdürülmüş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2.14.1.2 4X Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

18.15 g Tris alınarak distile su ile çözdürülmüş ve konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8.8'e ayarlanmıştır. Tampon hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2.14.1.3 % 10 SDS çözeltisi

5 g SDS alınarak distile su ile 50 mL'ye tamamlanmış ve çözülmesi sağlanmıştır.

2.14.1.4 % 10 Amonyum persülfat (APS)

5 mL distile su içerisinde 0.5 g APS çözdürülerek hazırlanmıştır. Bu çözeltinin kullanılmadan önce taze olarak hazırlanmasına dikkat edilmiştir.

2.14.1.5 SDS içermeyen 5X tank tamponu

15 g Tris, 72 g glisin tartılarak distile su ile çözdürülmüştür. Konsantre HCl ile pH'sı 8.3'te ayarlanmış ve distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. (Kullanılmadan önce 5 Kat seyreltilmiştir.)

2.14.1.6 % 1 SDS katkılı 5X tank tamponu

Bu çözelti hazırlanmak için 15 g Tris, 72 g glisin 950 mL distile su ile çözdürülmüştür. 10 g SDS Çözeltiye ekledikten sonra pH'sı 8.3'e ayarlanmış ve distile su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

2.14.1.7 Örnek uygulama tamponu

Bir falkona 4 mL % 10'luk SDS çözeltisi, 2 mL gliserol, 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8) ve 1 mL β -merkaptoetanol alınarak üstüne 0,01 g Bromophenol mavisi eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Çözeltiye distile su ilave edilerek hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.14.2 Gümüş boyama

SDS-PAGE jeli boyama işleminde saflaştırılan örnek içerisinde bulunan protein bantlarının belirlenmesi amacıyla coomasie brilliant blue R250 ile çalışmalar yapılmakla birlikte gümüş boyama tekniğinin daha duyarlı olması nedeniyle gümüş boyama yöntemi esas olarak kullanılmıştır. Bu yöntemde kullanılan çözeltilerin tümü aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

2.14.2.1 Fiksatif çözeltisi

50 mL metanol, 12 mL asetik asit ve 0.5 mL % 37'lik formaldehit alınarak distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2.14.2.2 Ön uygulama çözeltisi

0.2 g Sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) tartıldıktan sonra distile su ile çözünmesi sağlanmış ve hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Boyama işlemi gerçekleştirilirken taze olarak hazırlanmıştır.

2.14.2.3 Gümüş nitrat (2 g L^{-1}) çözeltisi

Jel boya çözeltisinin hazırlanması için 2 g gümüş nitrat (AgNO_3) distile su ile çözdürülmüş ve hacmi 0.75 mL % 37'lik formaldehit eklenerek 1 L'ye tamamlanmıştır. Taze olmasını sağlamak amacıyla kullanılmadan önce hazırlanmasına dikkat edilmiştir.

2.14.2.4 Geliştirme çözeltisi

60 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) tartılarak distile su ile çözdürülmüştür. Elde edilen çözeltilere 20 mL ön uygulama çözeltisi ve 0.5 mL % 37'lik formaldehit ilave edilerek hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

2.14.3 Nativ-Poliakrilamid Jel (Native-PAGE) uygulaması

Jelin hazırlanması için elektroforez camları önce distile su ile iyice temizlenmiş sonra alkol ile silinmiştir. Elektroforez plakaları alkol ile silindikten sonra elektroforez sistemine yerleştirilmiş ve % 10'luk ayırıcı jel dökülmüştür. 30 mL ayırıcı jel hazırlamak için temiz erlene 11.9 mL distile su, 10.0 mL % 30 akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi, 7.5 mL 4X ayırma jeli tamponu ve 0.3 mL % 10 APS çözeltisi alınarak iyice karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti dökülmeden hemen önce polimerleşmesini sağlamak için 12 μL TEMED eklenerek hızlıca karıştırılmış ve damlalık kullanılarak

elektroforez camları arasında dökülmüştür. Kuyucuklar oluşturmak amacıyla dökülen jelin üzerine tarak konulmuş ve hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilmiştir. Jel polimerleşmesinin tamamlanması ve tamamen jelin donması için beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve elektroforez ünitesine yerleştirilmiştir. 200 mL 5X tank tamponu (SDS içermeyen) alınarak distile su ile seyreltilmiş ve elektroforez tankına dökülmüştür. Sonra mikroinjektör kullanılarak markır yüklenmiş daha sonrasında hem homojenat hem de kolondan elde edilen örnekler eşit protein miktarlarında olacak şekilde ile kuyucuklara yüklenmiştir. Tankın kapağını kapatılmış ve güç kaynağına bağlanarak örnekler 300 V, 100 mA elektrik akımında 1 saat 20 dakika yürütülmüştür. Markır izlenerek markır jelden çıkmasına 0.3 cm kaldığında elektrik akımı durdurulmuştur. Jel elektroforez plakalar arasından dikkatlice alınmış ve uygun bir kaba konularak üzerine pH 8.3, 50 mM Tris-HCl elektroforez aktivite tamponu ve 1 mL asetonda çözündürülen 40 mg α -naftil asetat substrat olarak ilave edilmiştir. Jel substrat ile iyice karıştırıldıktan sonra 180 mg fast blue RR salt alınıp 100 mL elektroforez aktivite tamponu ile çözdürülmüş ve jelin içeriği kaba ilave edilmiştir. Oluşan aktivite bantları belirlendikten sonra sabitlenmesi için jele fiksatif çözeltisi (% 40 metanol, % 60 asetik asit) eklenerek 20 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra jelin fazla boyası çıkarmak üzere destain çözeltisi (80 mL distile, 8 mL metanol, 12 mL asitik asit) jele eklenerek bekletilmiştir. Markır yardımıyla esteraz enziminin R_f değeri belirlenerek mol kütlesi hesaplanmaya çalışılmıştır.

2.14.4 Denatüre Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) uygulaması

SDS-PAGE deneyleri Temizkan ve Arda (1999)'a göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için SDS içeren % 10'luk jel çözeltisi hazırlanmış ve hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilerek temiz elektroforez camlarının arasına doldurulmuştur. Daha sonra tarak yerleştirilmiş ve jelin katılaşması beklenmiştir. Markır yüklemesini takiben, hem homojenat hem de kolon eluatlarından eşit miktarda protein olacak şekilde farklı miktarlarda örnekler ependorflara eklenmiş ve üstüne 5 μ L örnek uygulama tamponu ilave edilerek vortekslenmiştir. Örnekler denatüre edilmesi için sıcak su banyosunda inkübe edilmiş ve tarağın çıkarılmasında oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir. SDS katkılı 5X tank tamponundan 200 mL alınarak distile su ile seyreltilmiş ve elektroforez aparatına dökülmüştür. Güç kaynağı vasıtasıyla jel 300 V, 100 mA elektrik akımında

1 saat 20 dakika süresince yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra camlar arasından çıkarılan jel kaba alınmış ve jelin fikse edilmesi amacıyla formaldehit içeren fiksatif çözeltisinde (% 50 metanol, % 12 asetik asit, % 0,5 formaldehit) 20 dakika karıştırılarak inkübe edilmiştir. 20 dakika bitikten sonra fiksatif çözeltisi dökülmüş ve jel % 50 etanol ile 3 defa 5 dakika olacak şekilde yıkanmıştır. Jel etanol ile yıkandıktan sonra Ön uygulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için jelin üzerine 0.2 g L^{-1} sodyum tiosülfat çözeltisi eklenerek 1 dakika çalkalanmıştır. Ön uygulama işleminden sonra jel 20 saniye distile su ile yıkanmış ve bu işlem üç kez tekrar edilmiştir. Gümüş nitrat çözeltisi ile 10 dakika çalkalanarak muamele edilmiştir. Daha sonra boya çözeltisi uzaklaştırılmış ve jel 20'şer saniye 3 defa olacak şekilde iyice distile su ile yıkanmıştır. Bant oluşturmak için jele 200 mL geliştirme çözeltisi (60 g L^{-1} sodyum karbonat, 0.004 g L^{-1} sodyum tiosülfat) ilave edilerek bantlar oluşana kadar çalkalanmıştır. Bant oluşumundan hemen sonra ve hiç beklemeden sodyum karbonat dökülerek jele bol distile su ile 2 dakika 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra boya giderme çözeltisi (% 50 metanol, % 12 asetik asit) jele dökülmüş ve 10 dakika karıştırılmıştır. Süre bitince jel % 50 metanol ile yıkama yapılmıştır.

2.15 İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiki değerlendirilmesinde “SPSS 22.0 for Windows” programı kullanılmıştır. Yapılan tüm tekrarlar için ortalamaları ve standart hatası hesaplanmış ve Multiple Range Test'i kullanılarak elde edilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 olasılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Homojenat İle İlgili Sonuçlar

Bu çalışmada Sivas ilindeki farklı bölgelerden toplanan *Diplolepis fructuum*'un larvaları, esteraz enziminin saflaştırılması amacıyla deney materyali olarak kullanılmıştır. Yapılan santrifüjleme işlemlerinde en yüksek aktivitenin süpernatant kısmında olduğu belirlenmiştir. Materyal ve metot kısmında bahsedildiği üzere, ilk santrifüjlemeyi takiben elde edilen tortu kısmında bulunan aktiviteyi kaybetmemek amacıyla tekrar santrifüjleme yapılarak yine elde edilen süpernatant kısımları birleştirilmiştir. Homojenat aktivitesi $1.32 \mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$ bulunurken protein miktarı 5.374 mg mL^{-1} olarak ölçülmüştür. Homojenat hacmi 31 mL bulunduğuna göre, toplam protein miktarı ve toplam aktivite sırasıyla 166.61 mg ve $40.93 \mu\text{mol dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Spesifik aktivite ise $0.246 \text{ U (mg protein)}^{-1}$ olarak hesaplanmış ve bu adımda saflaştırma katsayısı 1 ve verim % 100 olarak alınmıştır.

3.2 *D. fructuum* Larval Esterazının Saflaştırılması

Saflaştırma işleminde üç farklı kolon kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. *D. fructuum* larval esterazının kromatografik saflaştırma adımlarına ait veriler Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

3.2.1 Q sefaroz iyon değişim kromatografisi saflaştırma sonuçları

Santrifüj işlemin sonucunda elde edilen süpernatant alınmış ve konsantre edilerek kolon denge tamponu ile dengelenmiş olan Q sefaroz kolonuna 3 mL dk^{-1} akış hızında kolona uygulanmış ve 4'er mL olacak şekilde tüplerde toplanmıştır. Örnek, kolona tutulmayan protein fraksiyonlarının toplamak amacıyla pH 7.8, 20 mM Tris-HCl kolon denge tamponu ile yıkanarak 9 tüpte toplanmıştır. Bu basamakta 3 ile 9 numaralı tüplerin bulunduğu fraksiyonu kapsayan tüplerde protein içeren ancak esteraz aktivitesinden yoksun bir fraksiyon bulunmuştur. Kolona bağlanmış olan fraksiyonların elde edilmesi için artan derişimde NaCl konsantrasyonu içeren kolon denge tamponu serileri kullanılmıştır. 100 mM NaCl yıkaması sonrasında 10-18 nolu tüpler arasında yine aktiviteden yoksun olan bir protein fraksiyonuna rastlanmıştır. 200 mM NaCl yıkama sonucunda 19 ile 28. tüpler arasındaki fraksiyonda esteraz aktivitesinin varlığı belirlenmiştir. 21 ve 27 numaralı tüplerde aktivite değerleri düşük bulunurken aktivitenin daha çok 22 ile 26. tüpler arasında yoğunlaştığı belirlenmiştir. 400 mM NaCl katkılı tampon ile yıkama sonucunda 31 ve 38 numaralı tüplerin

arasında bir başka protein piki tanımlanmış ve 32 ve 33. tüplerde çok az esteraz aktivitesinin var olduğu tespit edilmiştir. Son olarak, 1000 mM NaCl içeren kolon denge tamponu yıkamasıyla 40 ve 50 nolu tüpler arasında gerçekleştirilmiş olup, 42 ile 45 numaralı tüpler arasında yine aktiviteden yoksun bir protein pikinin varlığı tespit edilmiştir. Q sefaroz kromatografisi ile ilgili sonuçları kullanılarak çizilen kromatograma ait Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Bu kromatografik yöntem sonucunda dört protein piki ve birisinin yoğun aktiviteyi içerdiği bir diğerinin ise önemsiz bir aktiviteye sahip olan iki aktivite pikinin varlığı belirlenmiştir. Yüksek aktiviteye sahip olan (22,23,24,25 ve 26) nolu fraksiyonlar bir araya toplanarak sonraki saflaştırma adımında kullanılmak üzere -20 °C'da muhafaza edilmiştir.

Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen saflaştırma parametrelerinin 14.74 mg toplam protein, 24.89 $\mu\text{mol dk}^{-1}$ toplam aktivite, 1.450 U (mg protein)⁻¹ spesifik aktivite olarak hesaplanmıştır. Saflaştırma katsayısı ve verim sırasıyla 5.90 kat ve % 60.81 olarak hesaplanmıştır.

3.2.2 Fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kolonu ile saflaştırma sonuçları

Q sefaroz iyon değişim kromatografisinin sonucunda aktivite içeren tüplerdeki örnekler birleştirilerek materyal ve metod bölümünde anlatıldığı gibi 100 mM amonyum sülfat katkılı kolon denge tamponu ile dengelenmiş olan fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kolonuna uygulanmıştır. 2 mL dk^{-1} akış hızında örnekler 4'er mL olacak şekilde toplanmıştır. 280 nm'de protein miktarı ve 405 nm'de aktivite değerleri belirlenmiştir. Bu kromatografik adımda elde edilen veriler Şekil 3.2'de özetlenmiştir. İlk olarak 100 mM amonyum sülfat katkılı kolon denge tamponu uygulamasıyla birlikte 4 ve 8 numaralı tüplerin arasında kalan kısımda protein absorbansının yüksek olduğu ancak aktivite içermeyen bir protein piki belirlenmiştir. Amonyum sülfat içermeyen kolon denge tamponu ile yıkama ile 11 ile 20 numaralı tüpler toplanmış ve bu aralıkta esteraz enzim aktivitesi gösteren bir protein piki gelmiştir. 21-29 nolu tüplerin toplanmasında % 10 izopropanol katkılı kolon denge tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve 25 ile 27 arasındaki tüplerde bir protein piki tespit edilmiştir ve aktiviteden yoksundur. Daha sonra izopropanol oranı % 20 ve % 50 olarak artırılarak kolon yıkama işlemleri gerçekleştirildiğinde aktiviteye rastlanmamakla birlikte, sadece % 50 izopropanol yıkamasında 46 ve 49. tüpler arasında kayda değer bir protein pikinin varlığı izlenmiştir. Bradford yöntemi ile bulunan protein miktarı kullanılarak spesifik aktivite hesaplanmış, yüksek spesifik

aktivite gösteren tüpler 12 mL hacim olarak (15,16,17) birleştirilmiş ve bir sonraki kromatografik adıma kadar -20 °C'da saklanmıştır.

Bu saflaştırma basamağı sonucunda toplam aktivite 6.31 $\mu\text{mol dk}^{-1}$, toplam protein miktarı 3.72 mg mL⁻¹, spesifik aktivite 1.697 U (mg protein)⁻¹ olarak belirlenirken, saflaştırma katsayısı 6.91, verim ise % 15.42 olarak hesaplanmıştır.

3.2.3 Sefakril S100-HR jel filtrasyon kolonu ile saflaştırma sonuçları

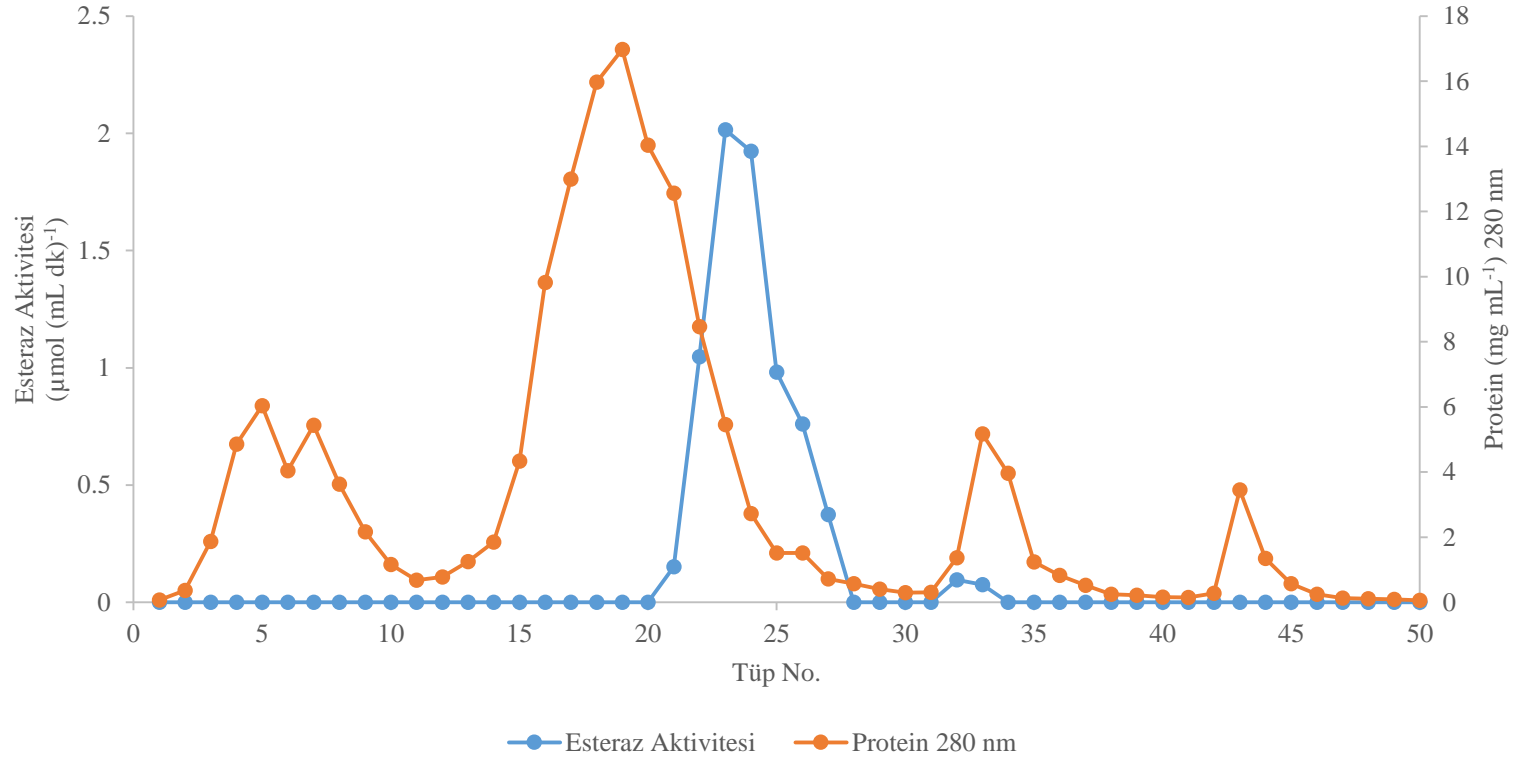
Materyal ve metod kısmında anlatıldığı gibi fenil sefaroza CL-4B hidrofobik etkileşim kolonundan elde edilen örnekler konsantre edilip Sefakril S100-HR jel filtrasyon kolonuna uygulanmıştır. Kolon 20 mM Tris-HCl ile 1 mL.dk⁻¹ akış hızında yıkanarak kolondan çıkan örnekler 2.5'er mL olacak şekilde 57 tüpe toplanmış ve daha önceki gerçekleştirilmiş olan kolon kromatografisi uygulamalarında olduğu gibi tüm tüplerin protein miktarı (280 nm) ve esterez aktivitesi (405 nm) belirlenmiştir. Bu kromatografik yaklaşım sonucunda Şekil 3.3'ten izlenebileceği gibi, sadece bir protein pikinin (ilk 5 tüpe kadar olan kısımda) olduğu belirlenmiş ve en yüksek aktivite gösteren 4 numaralı tüp kinetik analizlerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Jel filtrasyon kromatografisi yoluyla *D. fructuum* larvasından toplam protein miktarının 0.52 mg ve toplam aktivitenin 3.60 $\mu\text{mol dk}^{-1}$ ve 6.949 U (mg protein)⁻¹ spesifik aktiviteye sahip bir enzim fraksiyonu saflatırılmıştır. Bu saflaştırma adımının saflaştırma katsayısı ve verimi ise sırasıyla 28.30 kat ve % 8.80 olarak hesaplanmıştır.

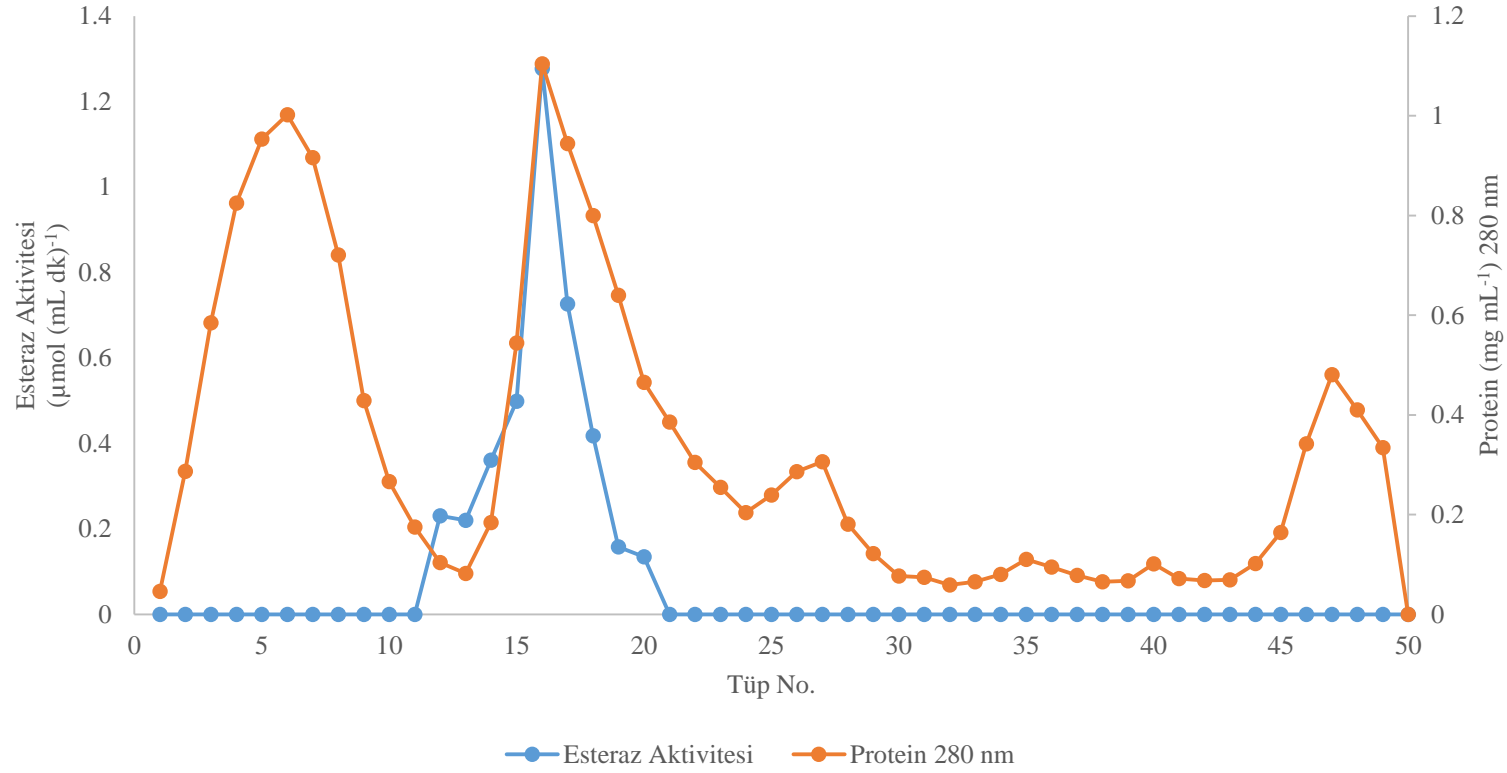
Tablo 3.1 *D. fructuum* böcek esterazı saflaştırma basamakları*

Basamak	Σ Hacim (mL)	Σ Protein (mg) Ort ± S.H	Σ Aktivite (μmol dk⁻¹) Ort ± S.H	Spesifik Aktivite (U (mg protein)⁻¹) Ort ± S.H	Saflaştırma (Kat)	Verim (%)
Homojenat	31	166.61 ± 0.28	40.93 ± 1.03	0.246 ± 0.06	1.00	100.00
Q Sefaroz	20	14.74 ± 2.42	24.89 ± 0.63	1.450 ± 0.04	5.90	60.81
Fenil Sefaroz CL-4B	12	3.72 ± 0.75	6.31 ± 0.13	1.697 ± 0.04	6.91	15.42
Sefakril S 100-HR	2.5	0.52 ± 0.03	3.60 ± 0.04	6.94 ± 0.08	28.30	8.80

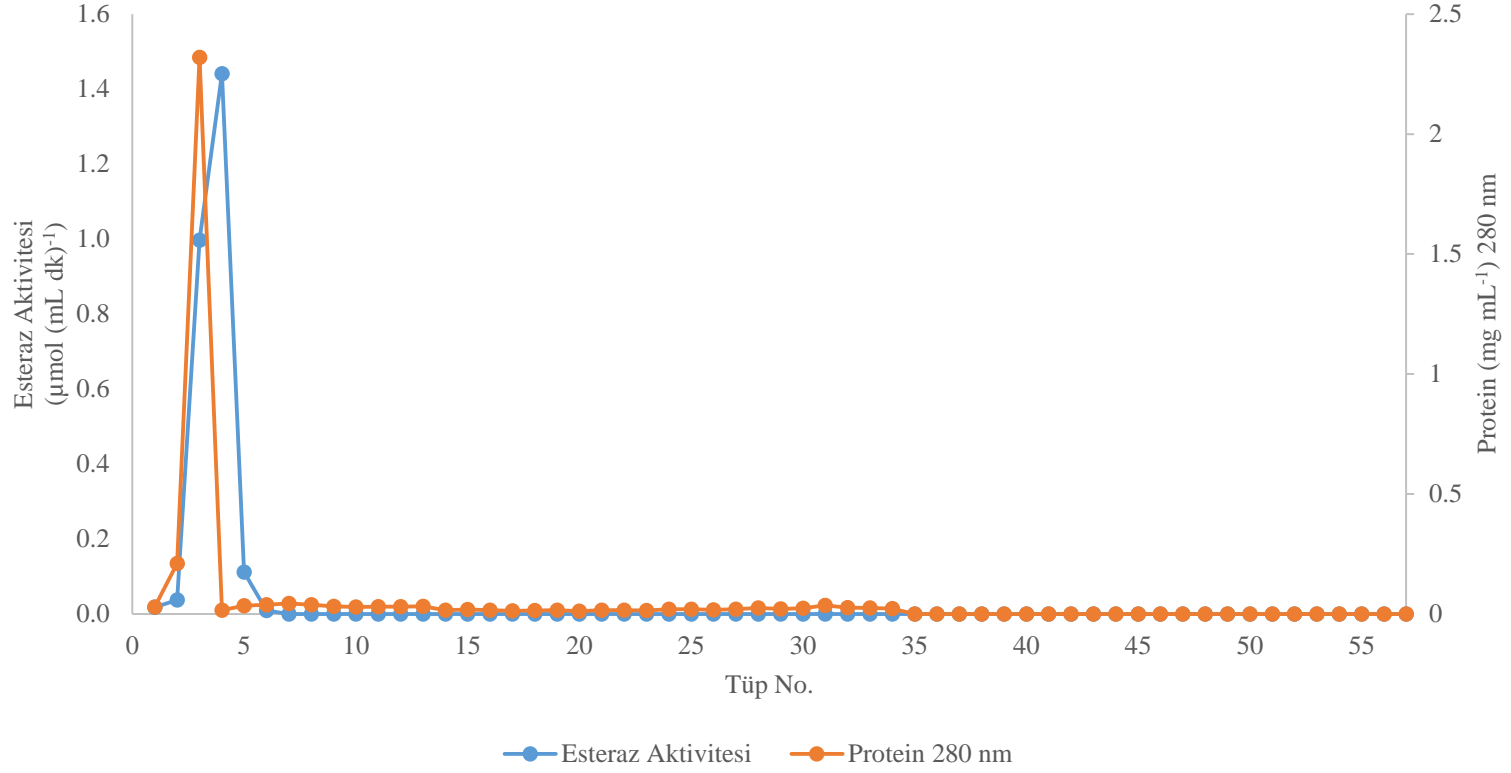
*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Ort. ± S.H. = Ortalama ± Standart Hata



Şekil 3.1 *D. fructuum* larval esterazının Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram



Şekil 3.2 *D. fructuum* larval esterazının fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram



Şekil 3.3 *D. fructuum* larval esterazının sefakril S100-HR jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen aktivite ve protein miktarlarını gösteren kromatogram

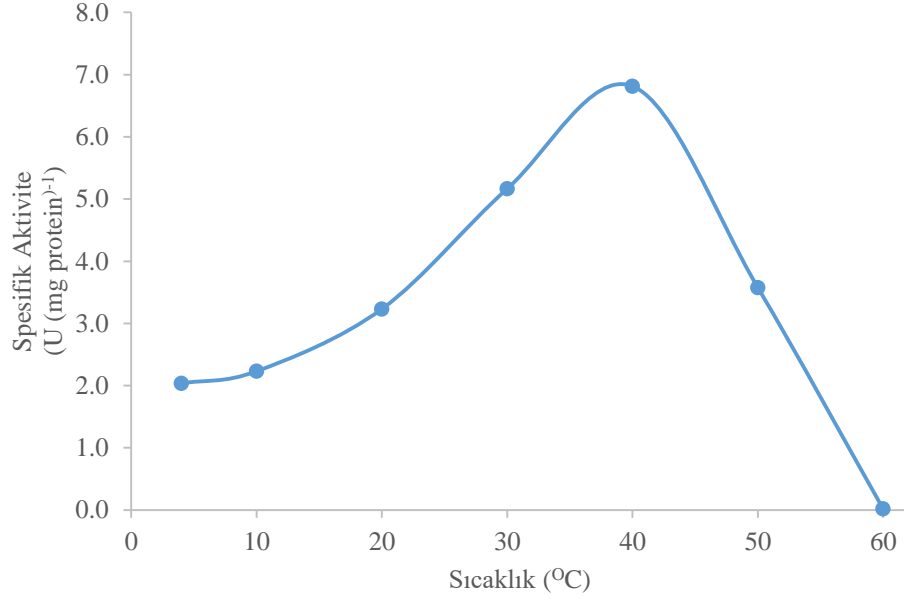
3.3 *D. fructuum* Larval Esterazı Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi İle İlgili Bulgular

Saflaştırılan esteraz üzerine sıcaklığın etkisinin incelenmesi ve optimum sıcaklığın tayin edilmesi amacıyla 4 °C ile 60 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde 15 dakika inkübasyona maruz bırakılan örneklerin esteraz aktivite değerleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 3.2’de verilmek ile birlikte, Şekil 3.4 ve 3.5’te sırasıyla spesifik aktivite-sıcaklık ve görelî aktivite-sıcaklık diyagramları şeklinde sunulmuştur. Elde edilen verilerden aktivite 4 ve 10 °C arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur ve görelî aktivite sırasıyla % 29.89 ve % 32.74 olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık 20 °C’ a artırıldığında aktivite yükselmeye başlamış ve spesifik aktivite 3.232 U (mg protein)⁻¹ olarak tespit edilirken, görelî aktivite % 47.44 olarak hesaplanmıştır. 30 °C’da aktivite artmaya devam etmiş ve % 75.80 görelî aktivite bulunurken, *D. fructuum* larval esterazı için belirlenen 6.814 U (mg protein)⁻¹ spesifik aktivite değeri en yüksek aktivite olup, optimum sıcaklığın 40 °C olduğu belirlenmiştir. Aktivite değerleri 40 °C’ dan sonra azalmaya başlamış ve 50 °C’ da aktivitenin neredeyse yarısının yitirildiği gözlenmiştir ve görelî aktiviteden % 52 kalmıştır. 60 °C’ da ise görelî aktivite % 0.27 olarak bulunmuş olup, aktivite yoktur.

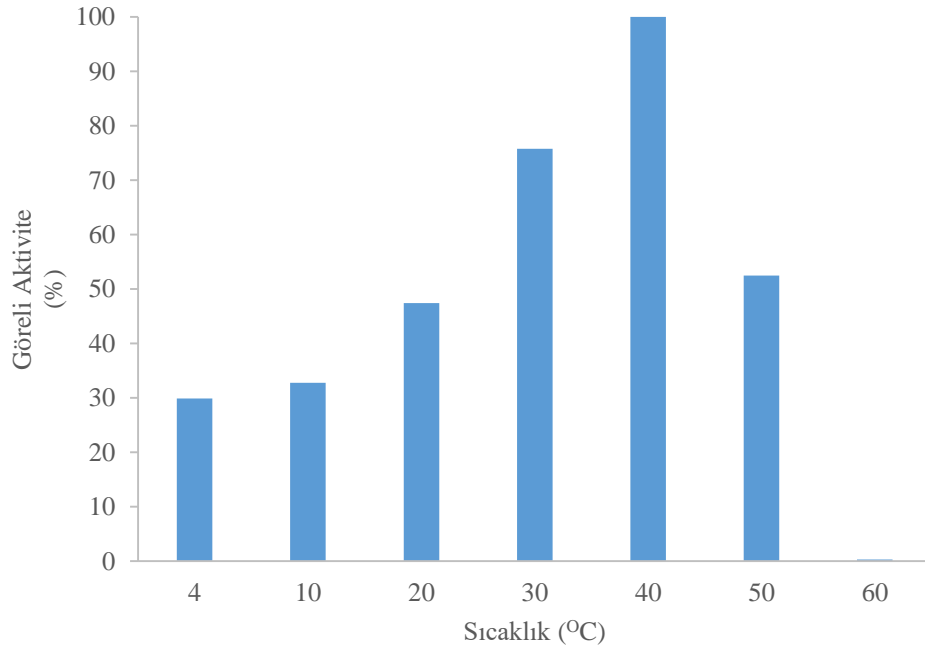
Tablo 3.2 *D. fructuum* larval esterazı üzerine farklı sıcaklık değerlerinin etkisi*

Sıcaklık (°C)	Ünite Aktivite (µmol (mL dk) ⁻¹) Ort ± S.H.	Spesifik Aktivite (U (mg protein) ⁻¹) Ort ± S.H	Görelî Aktivite (%)
4	0.422 ± 0.03 ^a	2.037 ± 0.128 ^a	29.89
10	0.462 ± 0.06 ^a	2.23 1± 0.024 ^a	32.74
20	0.670 ± 0.20 ^b	3.232 ± 0.133 ^b	47.44
30	1.070 ± 0.38 ^c	5.165 ± 0.182 ^c	75.80
40	1.412 ± 0.035 ^d	6.814 ± 0.170 ^d	100.00
50	0.741 ± 0.11 ^b	3.577 ± 0.548 ^b	52.49
60	0.004 ± 0.04 ^e	0.018 ± 0.018 ^e	0.27

*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Ort ± S.H.: Ortalama ± Standart Hata.



Şekil 3.4 Sıcaklığın *D. fructuum* larval esteraz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 3.5 Sıcaklığın *D. fructuum* larval esteraz aktivitesi üzerine görelî etkisi

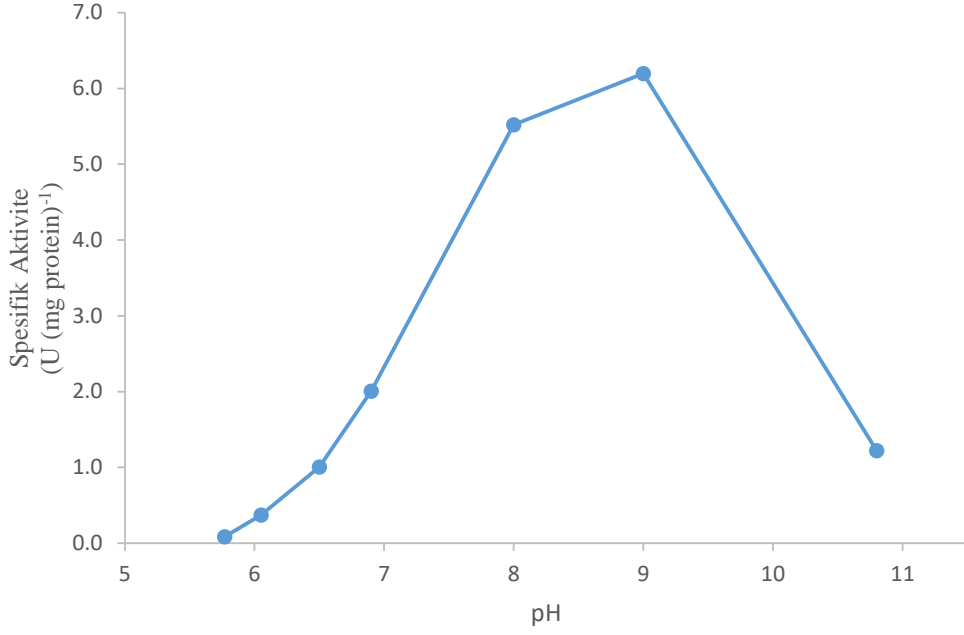
3.4 *D. fructuum* Larval Esterazı Optimum pH'ın Belirlenmesi İle İlgili Bulgular

Saflaştırılan örnek farklı pH değerlerinde inkübe edilmek suretiyle esteraz aktivite değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.3, Şekil 3.6 ve 3.7'de sergilenmektedir. Bulgulara göre; pH 5.77 ve 6.05 noktalarda esteraz aktivitesinin çok az ve istatistiksel olarak aralarındaki farkın önemsiz olduğu görülmektedir. pH'ın 6.5'e çıkmasını takiben aktivite yükselmiş ve spesifik aktivite $1.007 \text{ U (mg protein)}^{-1}$ bulunurken, pH 6.9'da aktivite 2 kat artarak, % 32.36'lık bir görelî aktivite yüzdesine sahiptir. pH 8'de de aktivitede belli bir artış görülmüş ve % 89.09'lık bir görelî aktivite hesaplanmıştır. *D. fructuum* larval esterazının en yüksek aktivite değeri ($6.197 \text{ U (mg protein)}^{-1}$) pH 9'da olduğu belirlenmiş ve optimum pH değeri olarak tespit edilmiştir. Larval esterazın pH 10.8'de optimum aktivitenin % 19.71'ine sahip olması önemli bulgular arasındadır.

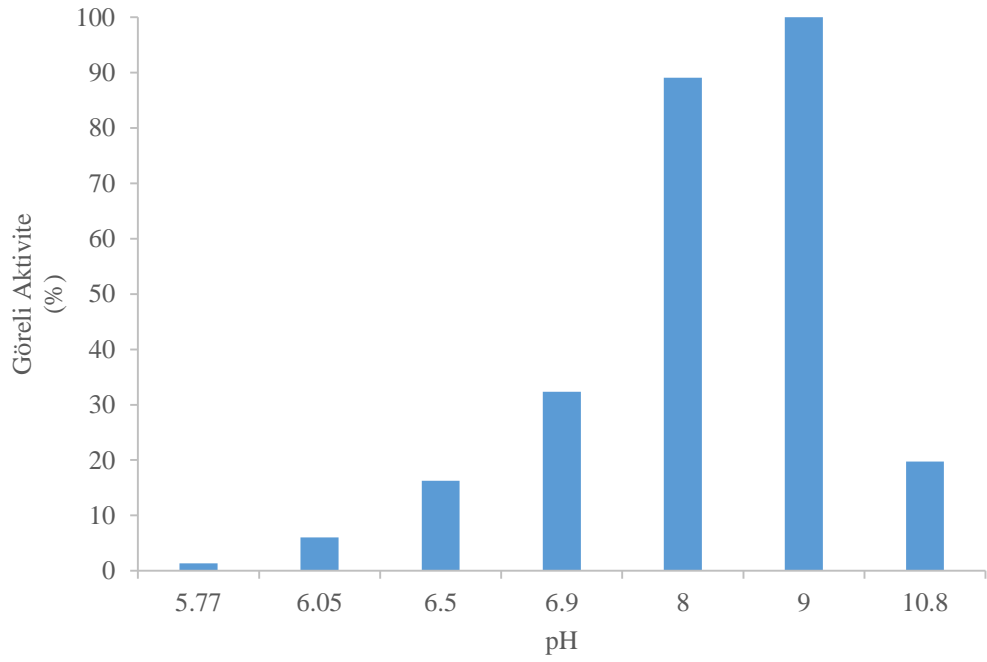
Tablo 3.3 *D. fructuum* larval esterazı üzerine farklı pH değerlerinin etkisi*

Tampon	pH	Ünite Aktivite ($\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$) Ort \pm S.H.	Spesifik Aktivite ($\text{U (mg protein)}^{-1}$) Ort \pm S.H.	Görelî Aktivite (%)
KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄	5.77	0.017 \pm 0.008 ^a	0.084 \pm 0.040 ^a	1.35
	6.05	0.077 \pm 0.005 ^a	0.373 \pm 0.025 ^a	6.02
	6.5	0.209 \pm 0.003 ^b	1.007 \pm 0.016 ^b	16.25
	6.9	0.415 \pm 0.004 ^c	2.005 \pm 0.0190 ^c	32.36
Tris-HCl	8	1.144 \pm 0.025 ^d	5.521 \pm 0.122 ^d	89.09
	9	1.284 \pm 0.008 ^e	6.197 \pm 0.040 ^e	100.00
	10.8	0.253 \pm 0.069 ^b	1.222 \pm 0.331 ^b	19.71

*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Ort \pm S.H.: Ortalama \pm Standart Hata.



Şekil 3.6 pH'ın *D. fructuum* larval esteraz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 3.7 pH'ın *D. fructuum* larval esteraz aktivitesi üzerine görelü etkisi

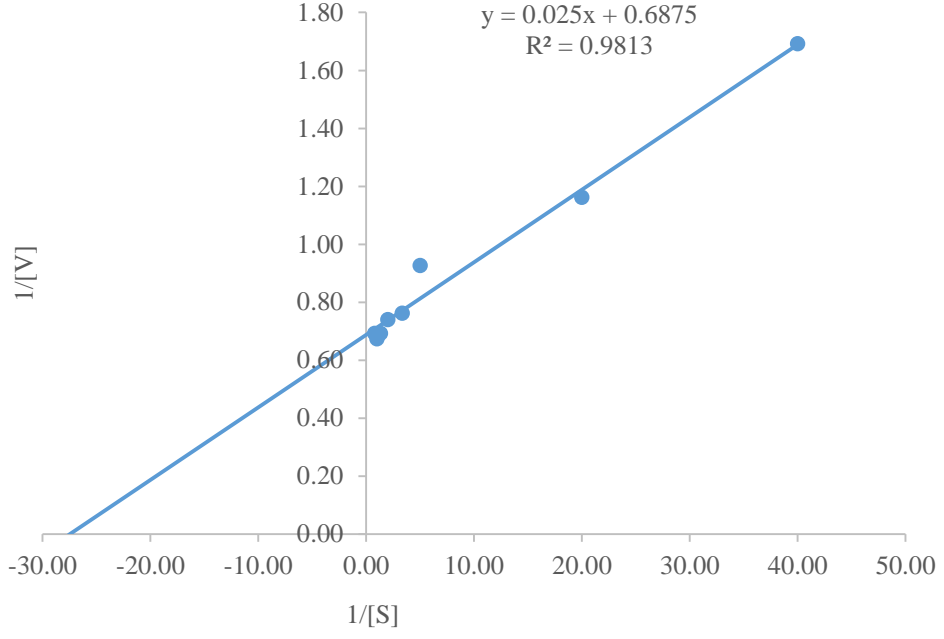
3.5 *D. fructuum* Larval Esterazı Üzerine Substrat (p-NPB) Derişimin Etkisi İle İlgili Bulgular

Larval esterazın kinetik parametrelerin belirlenmesinde 0.025 mM ile 1.25 mM p-NPB substrat derişimlerinin aralığında aktivite değerleri üç tekrarlı olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilmiş ölçümlerden substrat derişimi 0.025 mM'dan ile 0.05 mM'a çıkarıldığında aktivitenin değeri 0.591 $\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$ 'den 0.861 $\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$ 'ye arttığı gözlenmiştir. Tablo 3.4'te gösterildiği gibi, 0.2 mM ile 0.75 mM aralığındaki derişimlerde substrat miktarının artmasıyla birlikte aktivitede de artışlar görülmüştür. Larval esteraz 0.75 mM ile 1.25 mM p-NPB uygulamalarının olduğu substrat değerlerin maksimum hıza ulaşarak sabit bir hızda seyretmiş ve bu aralıklarda yapılan aktivite denemelerine ait hızlar istatistiki açıdan önemsizdir. Elde edilen bulgular kullanılarak çizilen Linweaver-Burk grafiğinden V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 1.41 $\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$ ve 0.035 mM olarak hesaplanmıştır.

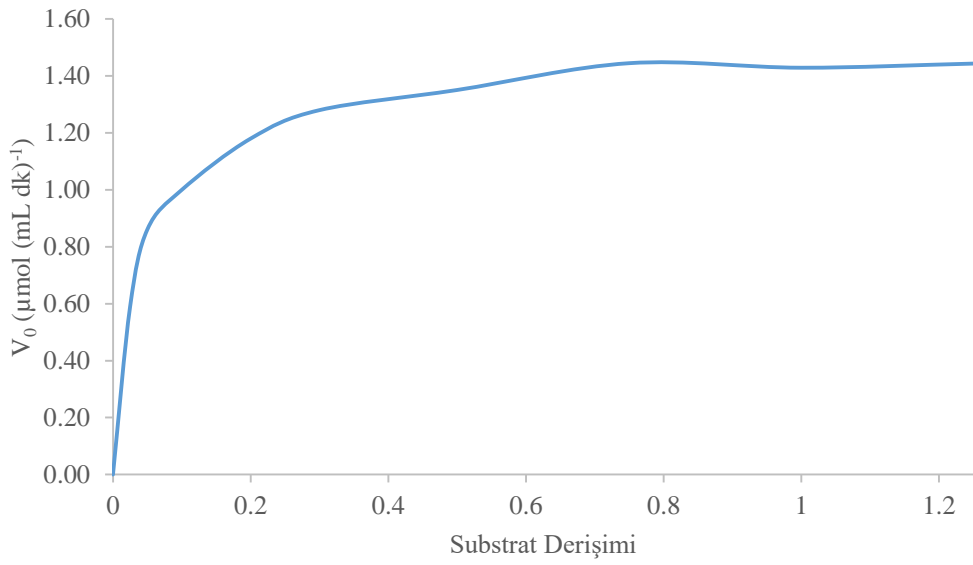
Tablo 3.4 *D. fructuum* larval esterazı üzerine substrat (p-NPB) derişimin etkisi*

[S] (mM)	V ($\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$)	1/[V]	1/[S]
	Ort \pm S.H.		
0.025	0.591 \pm 0.020 ^a	1.6912	40.00
0.05	0.861 \pm 0.011 ^b	1.1616	20.00
0.2	1.079 \pm 0.031 ^c	0.9266	5.00
0.3	1.313 \pm 0.028 ^d	0.7616	3.33
0.5	1.351 \pm 0.013 ^d	0.7403	2.00
0.75	1.445 \pm 0.175 ^d	0.6921	1.33
1	1.429 \pm 0.029 ^d	0.6998	1.00
1.25	1.443 \pm 0.097 ^d	0.6928	0.80

*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Ort \pm S.H.: Ortalama \pm Standart Hata.



Şekil 3.8 *D. fructuum* larval esterazının Linweaver-Burk grafiği



Şekil 3.9 *D. fructuum* larval esterazının Michaelis-Menten grafiği

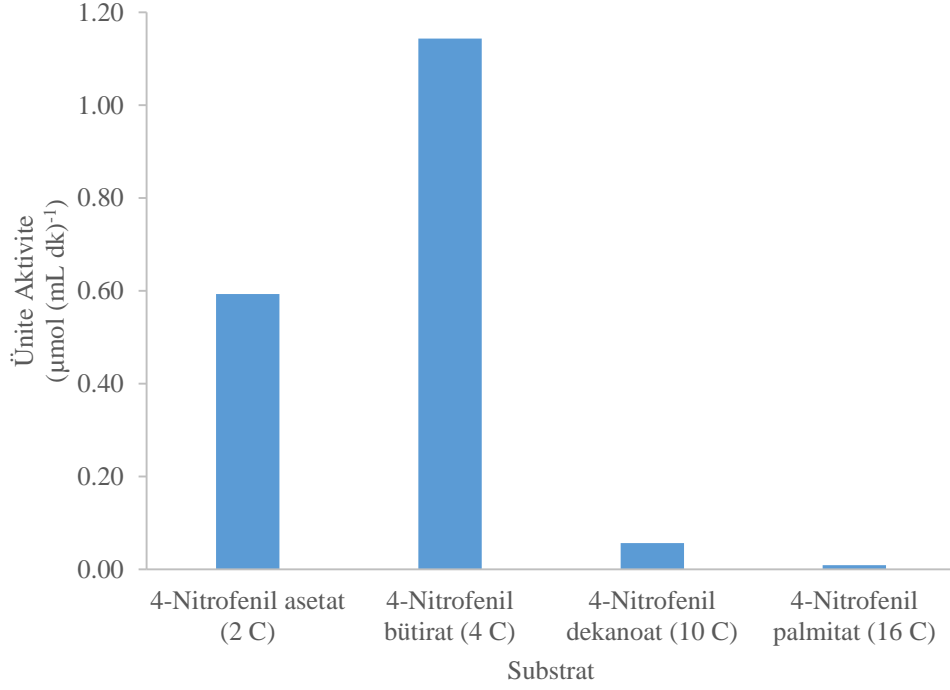
3.6 *D. fructuum* Larval Esterazı Üzerine Substrat Zincir Uzunluğunun Etkisi İle İlgili Bulgular

Materyal ve metod bölümünde açıklandığı gibi bu aşamada farklı karbon zincir uzunluğuna sahip olan 4 farklı substrat kullanılmıştır. Substratlar zincir uzunluğu kıtsadan uzuna doğru sırasıyla p-NPA (2 C), p-NPB (4 C), p-NPD (10 C), p-NPP (16 C) kullanılarak enzim aktiviteleri ölçülmüş ve tüm deneyler üç defa tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçların ortalamaları hesaplanmış ve Tablo 3.5 ve Şekil 3.10'da özetlenmiştir. p-NPB substratı ile esteraz enzimi en yüksek aktivite gösterirken, p-NPA ile esteraz enziminin % 51.86 görelî aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş ve $0.593 \mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$ aktivite elde edilmiştir. p-NPD ve p-NPP substratlarıyla elde edilen aktivitelerin oldukça düşük ve sırasıyla 0.057 ve $0.009 \mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$ 'lik aktiviteler ile temsil edildikleri belirlenmiştir.

Tablo 3.5 *D. fructuum* larval esterazı üzerine substrat zincir uzunluğunun etkisi*

Substrat	Ünite Aktivite ($\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$) Ort \pm S.H.	Spesifik Aktivite (U (mg protein) $^{-1}$) Ort \pm S.H.	Görelî Aktivite (%)
p-NPA (4-Nitrofenil asetat)	0.593 ± 0.016^a	2.863 ± 0.079^a	51.86
p-NPB (4-Nitrofenil bütirat)	1.144 ± 0.025^b	5.521 ± 0.122^b	100.00
p-NPD (4-Nitrofenil dekanoat)	0.057 ± 0.005^c	0.273 ± 0.021^c	4.94
p-NPP (4-Nitrofenil palmitat)	0.009 ± 0.006^c	0.042 ± 0.029^c	0.76

*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Ort \pm S.H.: Ortalama \pm Standart Hata.



Şekil 3.10 *D. fructuum* larval esterazı üzerine substrat zincir uzunluğunun etkisi

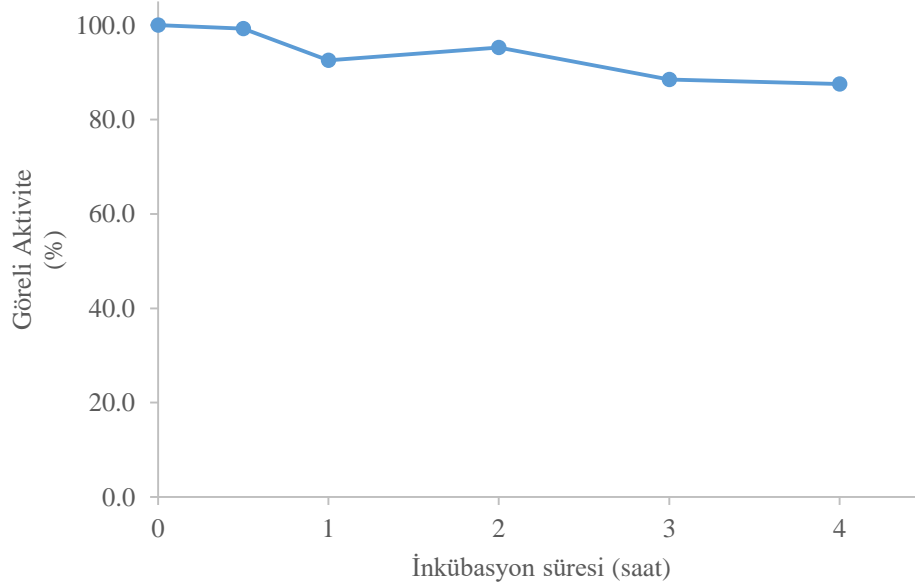
3.7 *D. fructuum* Larval Esterazının Termal Kararlığı İle İlgili Bulgular

D. fructuum larvasından saflaştırılan esteraz, optimum sıcaklıkta (40 °C) değişken sürelerde inkübe edilerek aktivitesi değerlendirilmiştir (Tablo 3.6). Termal kararlılık denemelerine başlamadan önce enzimin aktivitesi ölçülmüş ve spesifik aktivitesinin $4.614 \text{ U (mg protein)}^{-1}$ olduğu belirlenmiştir. Diğer denemelerde elde edilen aktivite değerleri buna göre kıyaslanmıştır. Enzim yarım saat 40 °C’da inkübe edildiğinde neredeyse hiç aktivite kaybına uğramamışken, bir saat sonrasında yaklaşık % 7 aktivite kaybı görülmüştür. Dört saatlik inkübasyon sonucunda enzimin % 87.53’lük aktivitesinin korunduğu bulunmuştur (Şekil 3.11).

Tablo 3.6 *D. fructuum* larval esterazının termal karalığı*

İnkübasyon süresi (saat)	Ünite Aktivite ($\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$) Ort \pm S.H	Spesifik aktivite (U (mg protein) $^{-1}$) Ort \pm S.H	Görelü Aktivite (%)
0	0.955 \pm 0.007 ^a	4.614 \pm 0.035 ^a	100.00
0,5	0.948 \pm 0.006 ^a	4.579 \pm 0.029 ^a	99.24
1	0.884 \pm 0.010 ^b	4.271 \pm 0.049 ^b	92.56
2	0.910 \pm 0.003 ^{ab}	4.396 \pm 0.016 ^{ab}	95.28
3	0.845 \pm 0.045 ^b	4.082 \pm 0.217 ^b	88.47
4	0.836 \pm 0.005 ^b	4.039 \pm 0.021 ^b	87.53

*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Ort \pm S.H.: Ortalama \pm Standart Hata.



Şekil 3.11 *D. fructuum* larval esterazının termal kararlılık grafiği

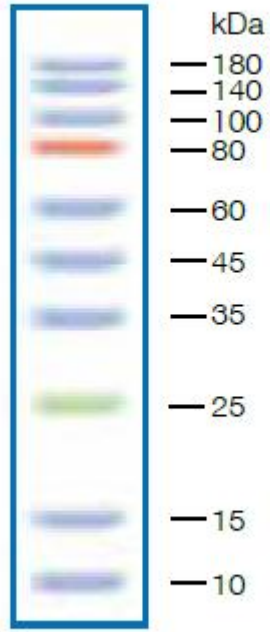
3.8 *D. fructuum* Larval Esterazının Elektroforetik Çalışmaları İle İlgili Bulgular

Saflaştırma işleminin ne kadar başarılı olduğunun belirlenmesi amacıyla Nativ-PAGE ve SDS-PAGE çalışmaları materyal ve metot kısmında belirtildiği şekilde yerine getirilmiştir.

Nativ-PAGE tekniği kullanılarak homojenat dahil tüm saflaştırma serilerinde sadece bir protein bandının esteraz aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Saflaştırılan esterazın mol kütlesi belirlenmesinde mol kütleleri bilenen markır (Blue Plus IV) standart olarak kullanılmıştır. Markır jele yüklenmiş ve elektroforetik işlemin sonunda 8 bant olmak üzere gözlenmiştir. Bantlara ait mol kütleleri sırasıyla 180, 140, 100, 80, 60, 45, 35, 25 kDa olduğu, ticari olarak elde edilen markırın kullanım kılavuzunda belirtilmektedir (Şekil 3.12). Tüm jel boyu 7.1 cm olarak tespit edilmiş ve markır bantların yürüme mesafesi ölçülerek her bir mol kütleli markır bandına ait R_f değerleri hesaplanmıştır (Tablo 3.7). Markırdaki proteinlerin mol kütleleri ve bunlara ait R_f değerleri kullanılarak R_f -mol kütlesi ve R_f - \log_{10} (Mol Kütlesi) grafikleri çizilerek sırasıyla Şekil 3.13 ve 3.14'te gösterilmiştir. Esteraz bandının yürüme mesafesi 3.1 cm bulunurken R_f değeri 0.479, yaklaşık mol kütlesi ise 62 kDa olarak hesaplanmıştır. Aktivite bandının yerini markır kullanarak belirledikten sonra, aynı jel, bant sayısını takip etmek için coomassie ve gümüş boyama ile de boyanmış ve yaklaşık 80-100 kDa'luk markır bantlarından 80 kDa, daha yakın bir mol kütleyle sahip ancak aktiviteden yoksun kontaminant bir protein bandının varlığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmaların tümü, Nativ-PAGE çalışmaları için belirtilen koşullar altında denature SDS-PAGE çalışmaları ile tekrarlanmış ve SDS-PAGE işlemin sonunda gümüş boyama gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.15'te görüldüğü gibi, homojenatta yoğun protein bantları tespit edilirken, saf örnekte sadece iki protein bandı görüntülenmiş ve Nativ-PAGE işlemlerinden bu iki banttan yaklaşık 60-62 kDa'luk protein bandının esteraz enzimi olduğu tespit edilmiştir. İkinci bant ise kontaminant bir proteine aittir ve markıra kıyasla mol kütlesi 80 kDa'ya yakın olduğu belirlenmiştir. Nativ-PAGE çalışmasında, eşit protein miktarı içeren homojenat ve sefakril S100-HR kolonundan elde edilen saflaştırılmış örnek elektroforetik olarak değerlendirildiğinde sefakril S100-HR kolonundan elde edilen saf örneğin daha koyu bir bant sergilediği gözlenmiştir (Şekil 3.15 ve 3.17).

Blue Plus[®] IV Protein Marker
(10-180 kDa)



12% Tris-glycine SDS gel (5 μ l/well)

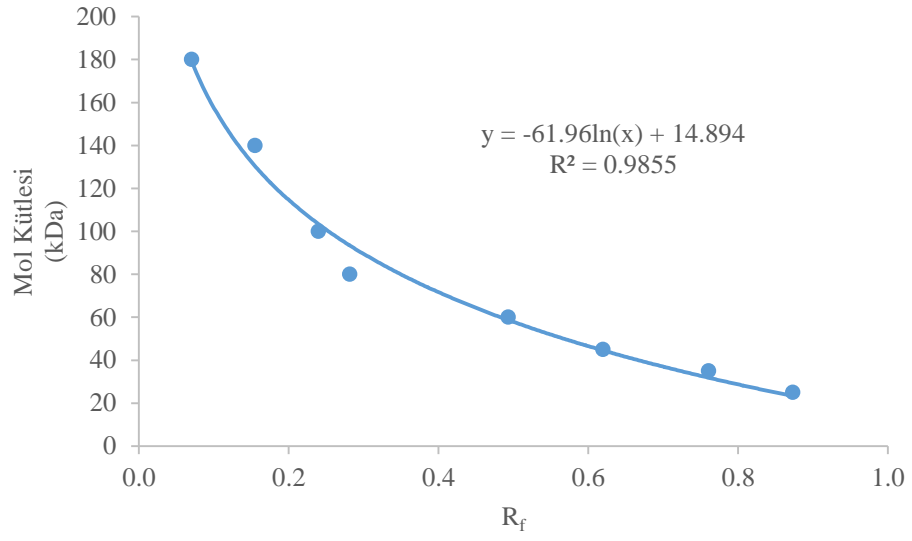
Şekil 3.12 Blue Plus IV Markır, bantlarına ait mol kütleleri

Tablo 3.7 Blue Plus IV Markır bantlarına ait mol kütleleri ve R_f değerleri

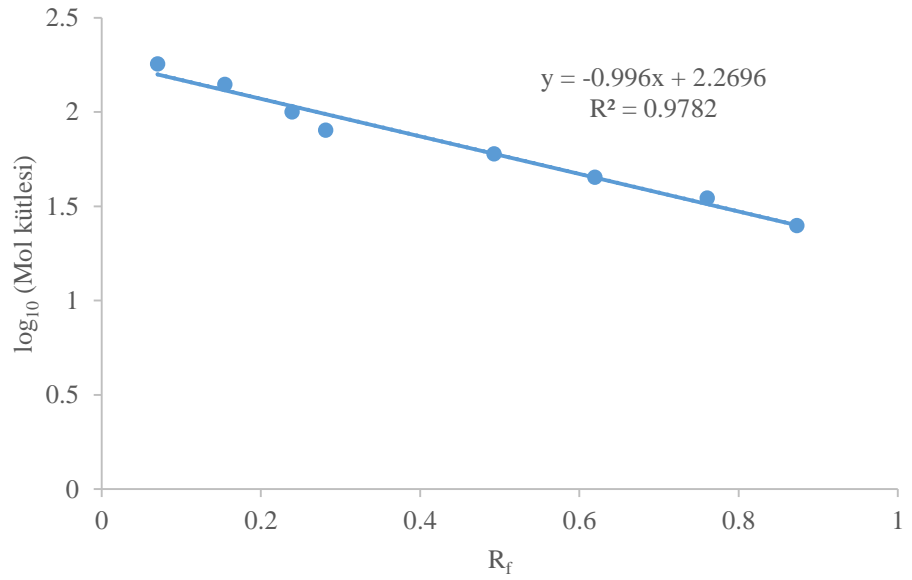
Markır (Blue Plus IV)	Mol Kütleleri (kDa)	R_f
1	180	0.070
2	140	0.155
3	100	0.239
4 (Kırmızı)	80	0.282
5	60	0.493
6	45	0.620
7	35	0.761
8 (Yeşil)	25	0.873

Tablo 3.8 Homojenat ve sefakril S100-HR'ye ait R_f değerleri

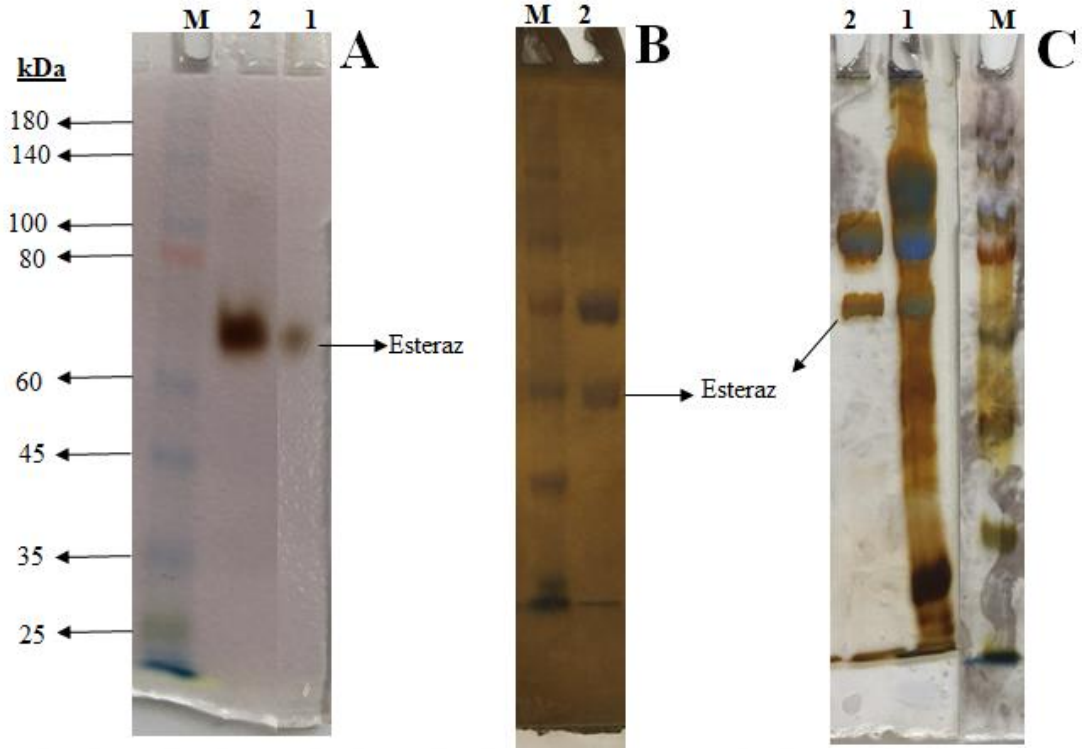
Materyal	R_f
Homojenat	0.479
Saf örnek	0.479



Şekil 3.13 Markır proteinlerin mol kütleleri-R_f grafiği



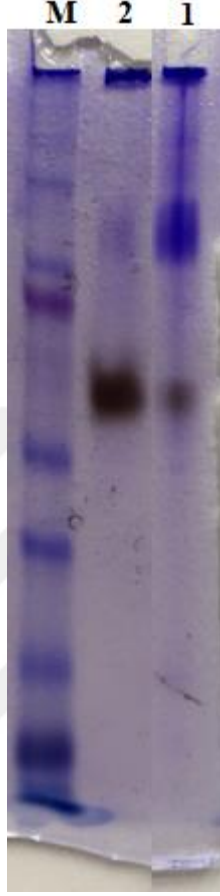
Şekil 3.14 Log₁₀ (Mol kütleleri)-R_f grafiği



Şekil 3.15 *D. fructuum* larvalarından esteraz saflaştırma aşamalarının elektroforetik analizleri

(**A**) Nativ-PAGE jel görüntüsü (hem homojenat hem de saflaştırılmış örnek için 25 μ g protein kullanılmıştır), (**B**) Nativ-PAGE jelin gümüşle boyanması, (**C**) Coomassie ve gümüş boyama kullanarak SDS-PAGE homojenat elektroforetik deseni (20 μ g protein) ve saflaştırılmış fraksiyon (20 μ g protein)

(M: Markır, 1: Homojenat, 2: Saflatırılmış fraksiyon)



Şekil 3.16 Homojenat (1) ve sefakril S100-HR (2) kromatografisine ait Coomassie ile boyanmış Nativ-PAGE jel görüntüsü



Şekil 3.17 Nativ-PAGE jel görüntüsü

(M: Markır, 1: Homojenat, 2: Saflatırılmış fraksiyon)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Diplolepis fructuum (Rübsaamen, 1895) ülkemizde geniş yayılış gösteren ve ekonomik öneme sahip olan *Rosa canina* (Kuşburnu) bitkisinin meyveleri üzerinde gal oluşturmak suretiyle ürün kayıplarına neden olan bir böcek türüdür. Giriş bölümünde de ele alındığı üzere, popülasyonlarını kontrol altına almak amacıyla zararlı böcek türleri ile kimyasal mücadelede kullanılan insektisit gibi unsurlara karşı direncin kazanılmasından sorumlu bir enzim grubu olarak esterazlar karşımıza çıkmaktadır.

Bu nedenle, mevcut yüksek lisans tez çalışmasında *D. fructuum*'un larval evresinden esteraz aktivitesine sahip olan bir fraksiyon saflaştırılmıştır. Bu amaç için, sırasıyla Q sefaroze anyon değişimi, fenil sefaroze CL-4B hidrofobik etkileşim kromatografisi ve sefakril S100-HR jel filtrasyon kromatografisi art arda uygulanmıştır. Bu çalışmalara ait tüm sonuçlar, tezin bulgular kısmındaki Tablo 3.1'de verilmektedir.

D. fructuum larvasının homojenatındaki esteraz aktivitesinin $0,246 \text{ U (mg protein)}^{-1}$ 'lik bir spesifik aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bu bağlamda, Lee ve ark. (2000) koleopter ordosundan bir böcek türü olan *Oryzaephilus surinamensis*'in fenitrothion direncini değerlendirmek için esteraz enzimini saflaştırmışlar ve homojenat aktivitesini substrat olarak p-NPA kullanarak $0.144 \text{ U (mg protein)}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada, Haubruge ve ark. (2002) yine bir koleopter türü olan *Tribolium castaneum*'dan saflaştırdıkları esterazın ham doku homojenatındaki aktivitesinin $0.07 \text{ nmol (dk mg protein)}^{-1}$ olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlardan, genellikle böceklerle ilgili yapılan esteraz saflaştırma çalışmalarında homojenattaki esteraz aktivitesinin oldukça düşük miktarlarda ifade edilmekle birlikte, yukarıdaki cümlelerde değinilen aynı böcek gruplarındaki farklı türlerde dahi aktivitenin farklı miktarlarda ifade edildiği görülmektedir. Bu olgunun, kullanılan substratların farklı olmalarının yanı sıra, böceğin türünün fizyolojisi, farklı gelişim evresinde olması ya da milyonlarca yıllık adaptasyonunun ürünü nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz.

İyon değişim kromatografisi protein saflaştırma laboratuvarlarının sıklıkla kullanıldığı ve saflaştırılması düşünülen protein örneğinin homojenat içerisinde alıkonularak (Bollag ve ark., 1996) saflaştırılacak örneğin kolonda yakalama ihtimali yüksek olan kromatografi türlerinden birisidir. Görgün ve Akpınar (2012), bir balık türü olan *Cyprinus carpio*'nun karaciğer lipazını saflaştırdıkları bir çalışmada, enzimi iyon değişim kromatografisi yoluyla konsantre bir tarzda elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Mevcut tez çalışmasında ilk saflaştırma basamağı olarak Q sefaroz iyon değişim kolon kromatografisi kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada örneğin uygulanmasıyla birlikte, materyal ve metot kısmında belirtilen koşullar altında örneğin kolona etkin bir şekilde bağlandığı görülmüştür. Kolon denge tamponu ve 100 mM NaCl yıkamasıyla protein pikleri elde edilmesine rağmen, bu piklerde aktiviteye rastlanmamıştır. 200 mM NaCl yıkaması ile yüksek aktiviteli bir esteraz piki elde edilmiştir. 400 mM NaCl yıkamasıyla birlikte çok düşük bir esteraz aktivitesine sahip bir protein piki tanımlanmasına karşın, önemsiz bir spesifik aktivite içermesi nedeniyle çalışmalara dahil edilmemiştir. Çalışmamızda Q sefaroz iyon değişim kromatografisi ile elde edilen saflaştırma parameterleri değerlendirilecek olursa; saflaştırma katsayısı 5.90, verim ise % 60.81'dir. Elde edilen esteraz fraksiyonunun spesifik aktivitesi ise 1.450 U (mg protein)⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Literatürde bulgularımız ile benzer veya farklı sonuçlar görmek mümkündür. Örneğin, Fahmy ve ark. (2004) *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae)'nin embriyogenezi esnasındaki esterazlarını saflaştırmak amacıyla ilk saflaştırma basamağında DEAE-sellüloz anyon değişim kromatografisini kullanmışlardır. Kolonun 0-1 M NaCl arasında değişen tuz ile yıkama sonucunda 6 adet esteraz formu tanımlamışlar ve bunları E1 ile E6 olarak belirtmişlerdir. Bu bantlar arasında E3 olarak etiketledikleri esterazın 0.2 M NaCl yıkamasıyla elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu kromatografik yaklaşım ile çalışmamızdakine benzer olarak yaklaşık 5 kat saflık ve % 5.23 verim elde etmişlerdir. El-Sheikh (2015) iki böcek türünün *Spodoptera littoralis* ve *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) juvenil hormon esterazının kinetiklerini karşılaştırdıkları bir çalışmada Q sefaroz iyon değişim kromatografisi ile *S. littoralis*'te 5.4 kat, *S. frugiperda*'da ise 2.1 katlık bir saflaştırma elde ettiklerini bildirmiştir.

Proteinler zayıf kimyasal etkileşimlere bağlı olarak üç boyutlu yapılarını kazanmaktadırlar. Birçok proteinde her ne kadar hidrofobik amino asit kısımlarının sudan kaçma eğilimine bağlı olarak proteinin daha iç kısımlarında lokalize olmaları beklenmesine rağmen, yüzey kısımlarında da % 40'a varan oranlarda hidrofobik karakterde olabildiği bildirilmektedir. Yüzey kısımlarında hidrofobisite açısından farklılıklar bulunan protein karışımları hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanmak suretiyle fraksiyonlanabilmektedirler (Queiroz ve ark., 2001). Bu bağlamda, hidrofobik etkileşim kromatografisinin tüm canlı gruplarında ifadesi gerçekleştirilen lipaz ya da esteraz gibi lipolitik enzimlerin saflaştırılmasında oldukça

kullanışlı olduğu bildirilmektedir (Bompensieri ve ark., 1996; Queiroz ve ark., 2001; Bhardwaj ve ark., 2001; Görgün ve Akpınar, 2012). Bununla birlikte, tez çalışmamızda, fenil sefaroz CL-4B hidrofobik etkileşim kolonu kullanılarak, 1.69 U (mg protein)⁻¹ spesifik aktivite ve 6.91 kat saflaştırılıktaki bir enzim preparatı elde edilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde bir önceki saflaştırma basamağı olan Q sefaroz kolonundaki sonuçlardan çok farklı olmadığı, yani saflaştırma parameterelerine bir katkı sağlamadığı anlaşılmaktadır. Bu kromatografi sonucunda üç protein pikine rastlanmış ve bu piklerden sadece bir tanesinde aktivitenin olduğu görülmüştür. Bu bulgu, çalışmamızda kullanılan fenil sefaroz CL-4B kolonunu proteinlerin fraksiyonlanmalarına olanak sağladığını belirtmekle birlikte, kolonda aktivite kaybımızın olduğunu düşünmemize yol açmıştır. Önemli bir çalışma olarak, Arrese ve Wells (1994), beş farklı kromatografik aşama kullanılarak *Manduca sexta*'nın böcek yağ dokusudan bir triaçilgliserol lipazını saflaştırma işlemi gerçekleştirirken üçüncü aşamada fenil sefaroz kolon kromatografisi kullanmışlar ve enzimin 939 kat saflaştırılmasıyla sonuçlanmışlardır. Daha sonra, aynı yazar bu enzimin aktif bir fosfolipaz olduğunu ortaya koymuştur (Arrese ve ark., 2006).

Yerine getirmiş olduğumuz bu yüksek lisans tez çalışmasının son saflaştırma basamağı olan sefakril S100-HR jel filtrasyon kromatografisi ile 6.94 U (mg protein)⁻¹ spesifik aktivite, % 8.80 verim ve 28 kat saflıkta olan bir esteraz enzim preparatı elde edilmiştir. Araştırmacıların farklı kromatografik teknikleri kullanılarak, farklı böcek türleri veya farklı gelişim evresine sahip böceklerden değişen saflaştırma parameterelerine sahip esteraz fraksiyonlarını elde ettikleri anlaşılmaktadır. Örneğin yukarıdaki paragraflarda Q sefaroz iyon değişim kromatografisi kısmında bahsedilen Fahmy ve ark. (2004)'ün çalışmalarında iyon değişim kromatografisi sonrasında jel filtrasyon (sefaroz 6B) kolon kromatografisi sonucunda *H. dromedarii* esterazı 19 kat saflaştırılabilmektedir. İki farklı araştırma sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, sepharil G 100 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisini kullanmak suretiyle farklı saflaştırma parametrelerine sahip lipaz preparatları elde etmişlerdir. Bu çalışmalardan ilki *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) larvasının orta bağırsak lipazının saflaştırıldığı bir çalışma olup, 42 kat saflıktaki enzimin 39.9 U (mg protein)⁻¹ spesifik aktivite, % 18.1 verim ile elde edildiğini bildirmiştir (Zibae, 2012). Bir diğer çalışma ise 5.60 U (mg protein)⁻¹ spesifik aktivite ve % 8.21 verim ile ifade edilen 12.28 kat saflıktaki *Naranga aenescens* (Lepidoptera:

Noctuidae) larvasının orta bağırsağından elde edilen lipazdır (Zibae ve Fazeli-Dinan, 2012). Buradan anlaşılacağı üzere, aynı kromatografik tekniklerin farklı böcek türleri üzerinde uygulanmasıyla birlikte, farklı saflaştırma parametrelerinde lipolitik enzimlerin elde edilmesidir. Bir başka çalışma ise *Dendrolimus superans* (Lepidoptera: Lasiocampidae) böcek türünde yerine getirilmiştir. Bu çalışmada 0.376 U (mg proetin)⁻¹ spesifik aktiviteye sahip homojenattan, amonyum sülfat çöktürmesi, sefadeks G25 jel filtrasyon kromatografisi (9.48 kat saflık sağlamıştır), DEAE 52 iyon değişim kromatografisi (18.56 kat saflık sağlamıştır) ve hidroksiapatit kromatografisi bile birlikte 138 kat saflıkta bir esterazın saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enzimin spesifik aktivitesinin yaklaşık 52 U (mg protein)⁻¹ olduğu belirlenmiştir (Zou ve ark., 2014).

Tez çalışmamızda elde edilen enzim preparatının kinetik parametreleri değerlendirildiğinde, optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 40 °C ve 9.0 olarak belirlenmiştir. Saflaştırılmış enzim, 40 °C’da 4 saat inkübe edildikten sonra aktivitenin % 88’ini korumuştur. Substrat zincir uzunluğuna bağlı olarak, *D. fructuum* larval esterazı en yüksek aktiviteyi (% 100) p-NPB üzerinde sergilenmiştir. p-NPA substrat olarak kullanıldığında görece aktivitenin p-NPB ile karşılaştırıldığında % 52 olduğu belirlenmiştir. p-NPD (% 5) ve p-NPP (% 1) ile yapılan denemelerdeki aktivite değerlerini oldukça düşük olduğu görülmektedir. p-NPB substrat olarak kullanıldığında, *D. fructuum* larval esterazının K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.035 mM ve 1.41 $\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 *D. fructuum* larval esterazı temel kinetik özellikleri

Optimum sıcaklık	40 °C
Optimum pH	9.0
K_m	0.035 mM
V_{max}	1.41 $\mu\text{mol (mL dk)}^{-1}$

Çalışmamızda elde edilen kinetik veriler literatürde bildirilenler ile karşılaştırıldığında Valles ve ark. (2001), *Reticulitermes flavipes*’ten mikrosomal esterazın 3 izoenziminin olduğunu belirlemişlerdir. Enzimlerin geniş bir sıcaklık aralığında aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. ME1 ve ME2 olarak etiketledikleri esterazların en yüksek spesifik

aktiviteleri 35 °C’da bulunurken ME3 olarak bildirdikleri enzimin 45 °C’da en yüksek aktiviteyi sergilediğini bildirmişlerdir. Yang ve Zhang, (2013) tarafından yapılan çalışmada *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) karboksilesterazı *E.coli*’de klonlanıp karakterize edilmiştir ve enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 25 °C ve 7.0 olarak olduğu bulunmuştur. α -naftil asetat substrat olarak kullanılarak K_m ve V_{max} 13.4 μ M ve 12.9 μ mol (dk mg protein)⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Bazı böceklerden elde edilen lipolitik enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerlerine bakıldığında, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae)’de 30 °C ve pH 7 (Ranjbar ve ark., 2015), *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae)’de 37 °C ve pH 6.5 (Santana ve ark., 2017) ve *Chilo suppressalis* (Lepidoptera, Pyralidae)’de 37 ila 40 °C arasında ve pH 10 da olduğu (Zibae ve ark., 2008) görülmektedir. Bunlara ek olarak, Ranjbar ve ark. (2015) saflaştırdıkları enzimin 30 °C’da üç saat süresince aktif olduğunu rapor etmişlerdir. Literatürde yüksek pH değerlerinde aktif olan lipolitik enzimlerin varlığı da rapor edilmiştir. Bunlar arasında, optimum pH’ın 11 olduğu *P. brassicae* lipazı (Zibae, 2012) ve pH 11’de en yüksek aktiviteyi sergileyen *N. aenescens* lipazı (Zibae ve Fazeli-Dinan, 2012) yer almaktadır. Yaptığımız çalışmada yan zinciri 2 ile 6 karbonlu olan dört kimyasal substrat olarak kullanılarak saflaştırılan enzim, zincir uzunluğu 4 karbonlu olan p-NPB ile en yüksek aktivite göstermiştir. Bu sonuca göre, saflaştırılan enzimin kısa zincirli substratları tercih ettiğini ve muhtemelen bir esteraz olabileceğini söyleyebiliriz (Fojan ve ark., 2000). Literatürde substrat spesifiteleri ile ilgili olarak, Santana ve ark. (2017) 10 (p-NPD) ile 16 (p-NPP) karbon zincir uzunluğu arasında değişen substratların *R. palmarum*’dan saflatılan lipolitik enzim aktivitesine etkisini değerlendirdiklerinde en yüksek aktivitenin en uzun zincirli substrat olan p-NPP’te belirlemişler ve enzimin bir lipaz olduğunu önermişlerdir. *H. dromedarii*’den elde edilen esterazın 1.43 mM p-NPA değeri ile en yüksek aktiviteyi kısa zincirli substrat olan p-NPA karşı sergilediği rapor edilmiştir (Fahmy ve ark., 2004). *P. brassicae*’den saflatılan lipazın V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 30.30 U (mg protein)⁻¹ ve 2.72 mM p-NPB olarak bulunmuştur (Zibae, 2012). Kinetik parametreler ile ilgili olarak elde edilen bu sonuçlardan, literatürde kinetik parametreler ile benzer ya da farklı verilerin elde edildiğini görmek mümkün olmakla birlikte, bunun nedeninin araştırılan böcek türü, doku, gelişim

evresi, uygulanan saflaştırma adımları ya da saflatılan enzimin lipaz mı yoksa esteraz mı olduğuna bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini düşünmekteyiz.

Tez çalışmada, saflaştırma deneylerinin sonunda, (1-naftil asetat) substrat olarak kullanılmak suretiyle hem homojenatta hem de saflaştırma serilerinde esteraz aktivitelerini gözlemlemek için Nativ-PAGE çalışmaları yapılmıştır. Tüm örneklerde sadece yaklaşık olarak 62 kDa mol kütleli bir esteraz aktivite bandı bulunmuştur. SDS-PAGE tekniği uygulanarak saflaştırılmış fraksiyonun, mol kütlelerinin yaklaşık 60 kDa ve 80 kDa olduğu gözlenen iki protein bandından oluştuğu görülmektedir. 80 kDa'luk protein bandının esteraz aktivitesi göstermeyen kontaminant bir bant olduğu elektroforetik çalışmalar sonucunda açığa çıkmıştır.

Literatürde farklı böcek türlerinde yapılan çalışmalardan elde edilen lipolitik enzimlerin mol kütlelerine bakıldığında, *R. flavipes*'te 63 kDa (Valles ve ark., 2001), *T. castaneum*'da 62 kDa (Haubruge ve ark., 2002), *S. littoralis* ve *S. frugiperda*'da 65 kDa (El-Seikh, 2015), *M. sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) yağ dokusunda 76 kDa (Arrese ve Wells, 1994; Arrese ve ark., 2016), *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae)'de 71 kDa (Rossiter ve ark., 2001), *H. dromedarii*'de 45 kDa (Fahmy ve ark., 2004), *Drosophila mojavensis* ve *D. arizonae* (Diptera: Drosophilidae)'de 81 ile 91 kDa arasında (Mateus ve ark., 2009), *P. brassica* bağırsağında 72.3 kDa (Zibae, 2012), *D. superans* larvasında 84.78 kDa (Zou ve ark., 2014) ve *E. ceratoniae*'nin orta bağırsağında 25 kDa (Ranjbar ve ark., 2015) olarak rapor edilmiştir.

Esterazlar, canlı sistemlerde hem endojen substratları hem de eksojen ksenobiyotikleri hidroliz etmekte önemli enzimlerdir. Bu çalışma, ekonomik öneme sahip olan *R. canina*'da gall oluşturan *D. fructuum* larvalarından bir esterazın saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu üzerine ilk rapordur. *D. fructuum* larval esterazı literatürde bildirilen lipolitik enzimler ile kinetik açıdan benzer fakat farklı mol kütleli bir enzim olduğu görülmektedir. Substrat tercihi açısından kısa zincirli substratları tercih etmesi bir esteraz olabileceğini önermektedir. Ham doku homojenatlarının esteraz aktivitelerinin zararlı (pest) böcek türleri ile mücadelede kullanımının doğru olmadığını düşünmekle birlikte, saflaştırılmış enzimlerin daha doğru sonuçları beraberinde getireceği yadsınmaz bir gerçektir. Bu nedenle, çalışmamızda elde edilen verilerin ilgili tür ile zirai mücadele de önem arz ettiğini düşünmekteyiz. Ancak

Çalışmamızın bir eksiki olarak herhangi bir insektisit in saflatılmış *D. fructuum* larval esterazı üzerine etkisi değerlendirilememiştir.



KAYNAKÇA

- Abd El-Latif, A.O., Subrahmanyam, B.** (2010). Pyrethroid resistance and esterase activity in three strains of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), 155-159.
- Akpınar, M.A., Görgün, S., Gençer, L., ve Aktümsek A.** (2017). Fatty Acid Composition of *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen, 1895) (Hymenoptera: Cynipidae) During Its Developmental Stages. *Journal of the Entomological Research Society*, 19 (3), 109-118.
- Aldridge, W.N.** (1953). Serum esterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, 53, 110-117.
- Arrese, E.L., Wells, M.A.** (1994). Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. *Journal of Lipid Research*, 35, 1652-1660.
- Arrese, E.L., Patel, R.T. ve Soulages, J.L.** (2006). The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A1: identification and characterization. *Journal of Lipid Research*, 47, 2656-2667.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., ve Verger, R.** (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2: 133-153.
- Bhardwaj, K., Raju, A., ve Rajasekharan, R.** (2001). Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*, 127(4), 1728-1738.
- Bollag, D. M., Edelstein, S. J., ve Rozycki, M. D.** (1996). *Proteins methods* (No. 547.96 BOL).
- Bompensieri, S., Gonzalez, R., Kok, R., Miranda, M.V., Nutgeren-Roodzant, I., Hellingwerf, K.J., Cascone, O., ve Nudel, B.C.** (1996). Purification of lipase from *Acinetobacter calcoaceticus* AAC323-1 by hydrophobic interaction methods. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 23(1), 77-81.
- Bornscheuer, U.T.** (2002). Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 73-81.
- Bülow, L., Mosbach, K.** (1987). The expression in *E. coli* of a polymeric gene coding for an esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. *FEBS letters*, 210(2), 147-152.
- Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., ve Sandoval, G.** (2018). Lipases: an overview. *Methods in Molecular Biology*, 861, 3-30.
- Chen, Y., Black, D.S., ve Reilly, P.J.** (2016). Carboxylic ester hydrolases : Classification and database derived from their primary, secondary, and tertiary structures, *The Protein Society*, 25, 1942-1953.
- Dahan-Moss, Y.L., Koekemoer, L.L.** (2016). Analysis of esterase enzyme activity in adults of the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors*, 9(1), 110.

- Dai, L., Gao, H., Ye, J., Fu, D., Sun, Y., ve Chen, H.** (2019). Isolation of CarE genes from the Chinese white pine beetle *Dendroctonus armandi* (Curculionidae: Scolytinae) and their response to host chemical defense. *Pest Management Science*, 75(4), 986-997.
- Dubey, J.P., Venturini, L., Venturini, M.C., ve Speer, C.A.** (2000). Isolation of *Sarcocystis speeri* Parasite from the South American Opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. *Journal of Parasitology*, 86(1), 160-163.
- El-Sheikh, E.A.** (2015) Characterization and Kinetics of Juvenile Hormone Esterase from *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *S. frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(3), 625-630.
- Fahmy, A. S., Abdel-Gany, S. S., Mohamed, T.M., ve Mohamed, S.A.** (2004). Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 137, 159-168.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., ve Petersen, S.B.** (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*, 82(11), 1033-1041.
- Gilham, D., Lehner, R.** (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36, 139-147.
- Görgün, S., Akpınar, M.A.** (2012). Purification and characterization of lipase from the liver of carp, *Cyprinus carpio* L. (1758), living in Lake Tödürge (Sivas, Türkiye). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(2), 207-215.
- Haubruge, E., Amichot, M., Cuany, A., Berge, J-B., ve Arnaud, L.** (2002) Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1181-1190.
- Hemingway, J., Ranson, H.** (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45, 371-391.
- Hemingway, J., Bates, I.** (2003). Malaria: past problems and future prospects. *EMBO Reports*, 4, 29-31.
- Jackson, C.J., Liu, J-W., Carr, P.D., Younus, F., Coppin, C., Meirelles, T., Lethier, M., Pandey, G., Ollis, D. L., Russell, R.J., Weik, M., ve Oakeshott, J.G.** (2013). Structure and function of an insect α -carboxylesterase (α Esterase7) associated with insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 10177-82.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., ve Reetz, M.T.** (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 53, 315-351.
- Ji, L., Xiaoling, T., ve Hongwei, Y.** (2010). Prediction of the enantioselectivity of lipases and esterases by molecular docking method with modified force field parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(4), 687-696.
- Kraut J.** (1977). Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry*, 46,331-358.

- Lee, S.E., Lees, M., ve Campbell, B.C.** (2000). Purification and characterization of an esterase conferring resistance to fenitrothion in *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Insecta, Coleoptera, Silvanidae), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4991-4996.
- Li, X.C., Schuler, M.A., ve Berenbaum, M.R.** (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52, 231-253.
- Lopes, D.B., Fraga, L.P., Fleuri, L.F., ve Macedo, G.A.** (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 603-613.
- Low, V.L., Chen, C.D., Lee, H.L., Tan, T.K., Chen, C.F., Leong, C.S., Yvonne, Y.A.L., Lim, P.L., Norma-Rashid, Y., ve Sofian-Azirun, M.** (2013). Enzymatic characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of Malaysian *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *PLOS ONE*, 8(11), 1-8.
- Mateus, R.P., Cabral, H., Bonilla-Rodriguez, G.O., ve Ceron, C.R.** (2009). Molecular weight estimation of esterase isoenzymes in closely related drosophila species (Diptera: Drosophilidae) in non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1083-1089.
- McCaffery, A., Nauen, R.** (2006). The Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): public responsibility and enlightened industrial self interest. *Outlooks on Pest Management*, 17,11-14.
- Min, M., Bin, Z., ve Sheng-cai, L.** (2011). Purification and partial characterization of acetylcholinesterase from *Pardosa astrigera* L. Koch. *Journal of Cell and Animal*, 5(11), 11-16.
- Montella, I.R., Schama, R., ve Valle, D.** (2012). The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 437-449.
- Murthy, K.S., Ramya, S.L., Venkatesan, T., Jalali, S.K., ve Verghese, A.** (2014). Biochemical basis of insecticide resistance and determination of esterase enzyme patterns in field collected populations of *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) from India. *Annals of Biological Research*, 5(11), 7-15.
- Nardini, M., Dijkstra B.W.,** (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 732-737.
- Nauen, R.** (2007). Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science*, 63, 628-633.
- Nussbaumer, C., Hinton, A.C., Schopf, A., Stradner, A., ve Hammock, B.D.** (2000). Isolation and characterization of juvenile hormone esterase from hemolymph of *Lymantria dispar* by affinity- and by anion- exchange chromatography, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 307-314.
- Ollis D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J. Sussman, J.L., Verschueren,**

- K.H.G., ve Goldman, A.** (1992). The alpha/beta-hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5, 197-211.
- Park, D.S., Oh, H.W., Heo, S.Y., Jeong, W.J., Shin, D.H., Bae, K.S., ve Park, H.Y.** (2007). Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle, *Journal of Microbiology*, 45, 409-417.
- Petersen, M.T.N., Fojan, P., ve Petersen, S.B.** (2001). How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*, 85, 115-147.
- Queiroz, J. A., Tomaz, C.T., ve Cabral, J.M.S.,** (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, 87, 143-159.
- Ramnath, L., Sithole, B., ve Govinden, R.** (2017). Classification of Lipolytic Enzymes and their Biotechnological Applications in the Pulping Industry. *Canadian Journal of Microbiology*, 63, 1-14.
- Ramya, S.L., Venkatesan, T., Srinivasa Murthy, K.S., Jalali, S.K., ve Verghese, A.** (2016). Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 327-336.
- Ranjbar, M., Zibae, A., ve Sendi, J.J.** (2015). Purification and characterization of a digestive lipase in the midgut of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Frontiers in Life Science*, 8(1), 64-70.
- Rossiter, L.C., Conyers, C.M., Macnicoll, A.D. ve Rose, H.A.,** (2001). Two qualitatively different Esterases from two organophosphate-resistant strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and their roles in fenitrothion and Chlorpyrifos-methyl resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 69, 118-130.
- Santana, C.C., Barbosa, L.A., Junior, I.D.B., do Nascimento, T.G., Dornelas, C.B., ve Grillo, L.A.M.** (2017). Lipase activity in the larval midgut of *Rhynchophorus palmarum*: Biochemical characterization and the effects of reducing agents. *Insects*, 8(100), 1-7.
- Satoh, T.** (2005). Toxicological implications of esterases—from molecular structures to functions. *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2), 11-18.
- Sharma, R., Chisti, Y., ve Banerjee, U.C.** (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Shin, D., Smartt, C.T.** (2016). Assessment of esterase gene expression as a risk marker for insecticide resistance in Florida *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 41(1), 63-71.
- Sood, S., Sharma, A., Sharma, N., ve Kanwar, S.S.** (2016). Carboxylesterases: sources, characterization and broader applications. *Insights in Enzyme Research.*, 1, 1-11.
- Srinivas, R., Udikeri, S.S., Jayalakshmi, S.K., ve Sreeramulu, K.** (2004). Identification of factors responsible for insecticide resistance in *Helicoverpa armigera*. *Comparative Biochemistry and Physiology – part C: Toxicology & Pharmacology*, 137(3), 261-269.

- Stamatis, H., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B.J., ve Kolisis, F.N.** (1998). Studies on the synthesis of short-chain geranyl esters catalysed by fusarium oxysporum esterase in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 4(4), 229-36.
- Temizkan, G., Arda, N.** (1999). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler: Genel Bakış. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, 1*, 1-17.
- Valles, S.M., Oi, F.M., ve Strong, C.A.** (2001). Purification and characterization of trans-permethrin metabolizing microsomal esterases from workers of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 715-725.
- Walker, C.H., Mackness, M.I.** (1983). Esterases: problems of identification and classification. *Biochem Pharmacol*, 32, 3265-3269.
- Wang, L-L., Lu, X-P., Meng L-W., Huang, Y., Jiang, H-B., Smagghe, G., Wang, J-J.** (2016). Functional characterization of an α -esterase gene involving malathion detoxification in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 130, 44-51.
- Yang X.Q., Zhang, Y.L.** (2013) Effect of temperature and sorbitol in improving the solubility of carboxylesterases protein CpCE-1 from *Cydia pomonella* and biochemical characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 10423-10433.
- Zera, A.J., Sanger, T., Hanes, J., ve Harshman, L.** (2002). Purification and characterization of hemolymph juvenile hormone esterase from the cricket, *Gryllus assimilis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 49(1), 41-55.
- Zibae, A., Bandani, A., ve Ramzi, S.** (2008). Lipase and invertase activities in midgut and salivary glands of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera, Pyralidae), rice striped stem borer. *Invertebrate Survival Journal*, 5, 180-189.
- Zibae, A.** (2012). A Digestive lipase of *Pieris Brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae): Purification, characterization, and host plants effects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 81(1), 1-19.
- Zibae, A., Fazeli-dinan, M.** (2012). Purification and characterization of a digestive lipase in rice green semi-looper, *Naranga aenescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae). *SOAJ of Entomological Studies*, 1, 33-48.
- Zou, C.S., Cao, C.W., Zhang, G.C., Wang, Z.Y., ve Zhu, Y.C.** (2014). Purification, characterization, and sensitivity to pesticides of carboxylesterase from *Dendrolimus superans* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Journal of Insect Science*, 14(1), 1-6.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Mazen ALTHALJI
Doğum Yeri ve Tarihi	Halep, 22.09.1990
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce, Türkçe
İletişim Adresi	Örtülüpınar Mah. Hasanlı Sok. Bina: 21, Daire: 5, Merkez Sivas
E-posta Adresi	Mazenalthalji90@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Al-Basel Lelmotafawekin Lisesi, 2008
Lisans	Halep Üniversitesi, 2013
Yüksek Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 2019

İş Tecrübesi

Modern Lübnan Laboratuvarı	Analiz Sorumlusu, 2016
Ayman Atat Eczane	Eczacı, 2015
Ebla Özel Üniversitesi	Okutman, 2014
Halep Üniversitesi	Araştırma Görevlisi, 2014