

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**BAZI *BACILLUS* TÜRLERİNDEN LİPAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT
OLARAK ÜRETİMİ, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE
İMMOBİLİZASYONU**

**Kezban YILDIZ DALGINLI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Onur ATAKİŞİ**

**Şubat-2017
KARS**

Bu tez çalışması **2014-FEF-42** numaralı proje ile **Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)** tarafından desteklenmiştir.

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

BAZI *BACILLUS* TÜRLERİNDEN LİPAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİMİ, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE İMMOBİLİZASYONU

Kezban YILDIZ DALGINLI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Onur ATAKIŞI

Şubat-2017

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Kezban YILDIZ DALGINLI 'nın Prof. Dr. Onur ATAKIŞI' nin danışmanlığında doktora tezi olarak hazırladığı “**Bazı Bacillus Türlerinden Lipaz Enziminin Rekombinant Olarak Üretimi, Karakterize Edilmesi ve İmmobilizasyonu**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy *birliği* ile kabul edilmiştir.

02/02/2017

Adı ve Soyadı

imza

Başkan : Prof.Dr.Berrin SALMANOĞLU

Üye : Prof.Dr. Mitat ŞAHİN

Üye : Prof.Dr.Muzaffer ALKAN

Üye : Prof.Dr.Onur ATAKIŞI (Danışman)

Üye : Yrd.Doç.Dr.Barbaros DİNÇER

Bf yd
Mitat
Muzaffer
Onur
Zahur

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2017 gün ve/
..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Özlem GÜRSOY KOL

.....
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında Doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

B.thermocatenulatus ve *B.pumilus* MBB03' den rekombinant olarak lipaz üretilmiş ve rekombinant olarak elde edilen lipazların alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklama yöntemi kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda immobilize boncuklar için optimum immobilizasyon koşulları ve hem serbest enzimin hem de immobilize enzimlerin optimum pH, optimum sıcaklık, protein ve substrat konsantrasyonu, pH ve ısı stabilite gibi çeşitli biyokimyasal karakterizasyon çalışması yapılmıştır.

Tez çalışmamda en büyük emeği geçen, yoğun çalışmalarından bana zaman ayırarak, her türlü maddi ve manevi destek sağlayan, tecrübe ve derin bilgilerinden faydalanma fırsatı veren, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmeye yönelik de birkaç adım ileride olmamı sağlayan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum, değerli bilim adamı Sayın Prof. Dr. Onur ATAKIŞI' ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma esnasında kullanılan Moleküler Tekniklerin uygulanması konusunda değerli bilgilerinden yararlandığım Dr. Mustafa KOLUKIRIK' a, yine bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr.Özkan ÖZDEN'e Biyokimya Araştırma Laboratuar'ında beraber çalıştığımız, çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Doktora Öğrencisi Canan GÜLMEZ ve Öğrt Gör. Çağatay ÖZBEY' e, ayrıca Kafkas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü hocalarıma ve değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman sabır ve anlayışıyla beni yalnız bırakmayan desteğini ve yakın ilgisini esirgemeyen eşim Serhat DALGINLI' ya, hayatımın her anında maddi manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyerek bugünlere gelmemde büyük emek harcayan çok değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Kars-2017

Kezban YILDIZ DALGINLI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1 Enzimler Özellikleri ve Kullanım Alanları	3
2.2 Lipazlar.....	6
2.2.1 Lipazların Tanımı	6
2.2.2 Lipazların Tarihçesi	7
2.2.3 Lipazların Katalizledikleri Reaksiyonlar	8
2.2.4 Lipazların Yapısı.....	8
2.2.5 Lipazların Substrat Spesifikliği	11
2.2.6 Lipazların Uygulama Alanları	12
2.2.7 Lipazların Kaynakları	16
2.3 <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	17
2.4 <i>Bacillus thermocatenulatus</i> Lipazı 2 (BTL2 Lipazı)	18
2.5 <i>Bacillus pumilus</i> Lipazı	23
2.6 İmmobilizasyon	23
2.6.1 İmmobilize Enzimin Özellikleri	25
2.6.2 İmmobilizasyon Yöntemleri ve Seçimi	27
2.6.2.1 Tutuklama.....	29
2.6.2.1.1 Polimer Matrikse Tutuklama Yöntemi	30
2.6.2.1.2 Mikrokapsülleme (Membranda Tutuklama).....	31
2.6.3 İmmobilize Enzimlerin Kullanım Alanları	33
2.6.4 İmmobilizasyon Destek Materyalleri.....	33
2.6.4.1 Alginat.....	36

2.6.4.2 Jelatin	38
3. MATERYAL METOT	41
3.1 Materyal.....	41
3.1.1 Kullanılan Kimyasal	41
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	41
Jel dökümantasyon sistemi Alpha EL1100,UK	42
3.1.3 Kullanılan Nükleotidler	42
3.1.4 Kullanılan Enzimler ve Tamponları	43
3.1.5 Kullanılan Kitler	43
3.1.6 Kullanılan Moleküler Belirteçler	43
3.1.7 Kullanılan Plazmit Vektörler	44
3.1.8 Kullanılan Bakteri Soyları	46
3.1.9 Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri	47
3.2 Metot	53
3.2.1 BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB0 Lipaz Geninin Restriksiyon Enzim Haritalarının Çıkartılması.....	53
3.2.2 BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 Lipaz Geninin PCR ile Çoğaltılması	53
3.2.3 PCR Ürününün Saflaştırılması.....	57
3.2.4 BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 Lipaz Geninin Klonlanması.....	57
3.2.5 Plazmit DNA'sı ve PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzim Kesimi ve Saflaştırılması	57
3.2.6 BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 Lipaz Geninin pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 Vektörüne Aktarımı	59
3.2.7 pEcoli-Cterm-6xHN-BTL2-lipaz' ın ve pD451-SR:219414- <i>B. pumilus</i> MBB03- lipaz' ın <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerine Transforme Edilmesi.....	60
3.2.8 Lipaz Gen Ekspresyonu ve Hücre Özütlerinin Hazırlanması	60
3.2.9 Rekombinant BTL2-lipaz ve <i>B. pumilus</i> -lipaz Proteinlerinin Saflaştırılması	61
3.2.10 Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini	61
3.2.11 SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	63
3.2.12 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	64
3.2.13 Alginat +Jelatin Jelde Tutuklama	65

3.2.14 İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	66
3.2.14.1 Jelatin Konsantrasyonunun Optimizasyonu	66
3.2.14.2 Alginat Konsantrasyonu Optimizasyonu	66
3.2.14.3 Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu	67
3.2.14.4 Enzim Miktarı Optimizasyonu	67
3.2.14.5 Boncuk Boyutu Optimizasyonu	68
3.2.14.6 Boncuk Miktarı Optimizasyonu	68
3.2.15 <i>B. thermocatenuatus</i> ve <i>B. pumilus</i> MBB03 Lipazının Biyokimyasal Karakterizasyonu	69
3.2.15.1 pH'ın Lipaz Aktivitesine Etkisi	69
3.2.15.2 Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	69
3.2.15.3 Protein Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi.	70
3.2.15.4 Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi	70
3.2.15.5 Substrat Spesifitesinin İncelenmesi.....	70
3.2.15.6 pH Kararlılığının İncelenmesi.....	71
3.2.15.7 Isıl Kararlılığın İncelenmesi.....	71
3.2.15.8 Bazı Metal İyonlarının Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	71
3.2.15.9 Bazı Deterjanların Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	72
3.2.15.10 Bazı Organik Çözücülerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	72
3.2.15.11 Bazı Kimyasal ve İnhibitör Maddelerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	73
3.2.15.12 İmmobilize Lipazın Tekrar Kullanılabilirliği.....	73
3.2.15.13 İmmobilize Lipazın Depo Kararlılığı.....	73
4. BULGULAR	74
4.1 BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 Lipaz Geninin PCR ile Çoğaltılması.....	74
4.2 PCR Ürününün Saflaştırılması	74
4.3. pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 Klonlama Vektörlerinin Ligasyona Hazırlanması.....	75

4.4 Lipaz Genlerinin pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 Vektörüne Ligasyonu	75
4.5 Transformasyon ve Transformanların Seçimi	76
4.6 Klonlanan Lipaz DNA'sının Nükleotit Dizilerinin Karşılaştırılması.....	78
4.7 Lipaz Gen Ekspresyonu.....	80
4.8 Lipaz Saflaştırılması	80
4.9. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini.....	81
4.10 Elektroforez	81
4.11 Alginat+Jelatin Jelde Tutuklanma.....	82
4.12 İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	83
4.12.1 Jelatin Konsantrasyonunun Optimizasyonu	83
4.12.2 Alginat Konsantrasyonu Optimizasyonu	84
4.12.3 Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	85
4.12.4 Enzim Miktarı Optimizasyonu.....	86
4.12.5 Boncuk Boyutu Optimizasyonu	87
4.13 Serbest ve Alginat+jelatin jelde Tutuklu <i>B. thermocatenulatus</i> (BTL2) ve <i>B.pumilus</i> MBB03 Lipazının Biyokimyasal Karakterizasyonu	90
4.13.1 pH' ın Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi.....	90
4.13.2 Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi.....	92
4.13.3 Protein Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi	93
4.13.4 Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi.....	95
4.13.5 Serbest ve İmmobilize Lipazın Farklı Substratlar Üzerine Etkisi	96
4.13.6 pH Kararlılığın İncelenmesi.....	98
4.13.7. Isıl Kararlılığın İncelenmesi	102
4.13.8 Bazı Metal İyonlarının Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi....	108
4.13.9 Bazı Deterjanların Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	111
4.13.10 Bazı Organik Çözücülerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	114
4.13.11 Bazı Kimyasal ve İnhibitör Maddelerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	118
4.13.12 İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği.....	120

4.13.13 İmmobilize Enzimlerin Depo Kararlılığı.....	122
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	124
6. KAYNAKLAR	150
ÖZGEÇMİŞ.....	169



ÖZET

Lipazlar (triasilgliserol açilhidrolaz, EC 3.1.1.3), hidroliz ve sentez reaksiyonlarını katalizleyen ve birçok endüstriyel sürecin yanı sıra biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir role sahip enzimlerdir. Bu çalışmada, *Bacillus thermocatenulatus* (BTL-2) ve *Bacillus pumilus* MBB03'te bulunan lipazın rekombinant olarak üretimi, karakterizasyonu ve immobilize edilmesi hedeflendi. Bu amaçla BTL2 ve *B.pumilus* MBB03'te bulunan lipaz geni ekspresyon vektörlerine klonlandı. Bu vektörler, *E.coli* BL21(DE3) kompetan hücrelerine transforme edilerek Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırıldı. Üretilen enzimlerin alginat+jelatin jel karışımında immobilizasyonu, immobilizasyon optimizasyonu ve hem serbest hem de immobilize enzimin karakterizasyon ölçümleri yapıldı. SDS-PAGE analizi ile BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının molekül ağırlığı sırasıyla yaklaşık 43 kDa ve 22 kDa saptandı. BTL2' den elde edilen serbest ve immobilize enzimin özgül aktivitesi sırasıyla 10.9 U/mg ve 6.9 U/mg *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize enzimin özgül aktivitesi sırasıyla 4.6 U/mg ve 3.3 U/mg olarak tespit edildi. Optimum sıcaklık ve pH değerleri BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 serbest (60 °C, 50 °C ve pH 9.0, pH 8.0) ve immobilize enzimler için (60-70 °C, 55 °C ve pH 9.5, pH 8.5) belirlendi. K_m ve V_{maks} değerleri, BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 sırasıyla serbest enzimler için (0.146 mM, 2.504 U/mL ve 0.055 mM, 0.636 U/mL) ve immobilize enzimler için (0.123 mM, 0,220 U/mL ve 0.128 mM, 0.119 U/mL) saptandı. Isıl kararlılık, BTL2 ve *B.pumilus* MBB03 serbest ve immobilize enzimlerin sırasıyla 40 ile 65 °C ve 40 ile 60 °C arasında, pH kararlılık ise +4 °C' de pH 7.0-11.0, +4 °C' de pH 8.0-10.0 aralığında saptandı.

Elde edilen serbest ve immobilize lipazların geniş ısıl ve pH kararlılığı, çeşitli metal iyonları, organik çözücü deterjan formülasyonları içinde stabilitesini koruması ve diğer önemli özelliklerinden dolayı çeşitli endüstriyel uygulamalarda potansiyel olarak kullanımının uygun olabileceği sonucuna varıldı.

2017, 172 sayfa

Anahtar kelimeler: *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus pumilus*, Rekombinant Lipaz, Immobilizasyon, Karakterizasyon

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) are enzymes which act as catalysts during hydrolysis and synthesis of reactions and have significant roles in biotechnical applications as well as many industrial processes. This study aims to the recombinant production, characterization and immobilization of the lipase which exists in the *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2) and *Bacillus pumilus* MBB03. In this respect, the lipase gene in BTL2 and *B.pumilus* MBB03 were cloned into expression vector. These vectors were transformed into *E.coli* BL21 (DE3) competent cells and purified by Ni-NTA affinity column. The produced enzymes were immobilized in the alginate and gelatin mixture, and the optimization of immobilization process was carried out and characterization measurements of both free and immobilized enzymes were performed. The molecular weights of BTL2 and *B.pumilus* MBB03 lipases were calculated approximately 43 kDa and 22 kDa, respectively on SDS-PAGE analysis. The specific activities of free and immobilized BTL2 enzyme were detected as 10.9 U/mg and 6.9 U/mg U/g, respectively. The specific activities of free and immobilized *B.pumilus* MBB03 were determined as 4.6 U/mg and 3.3 U/g, respectively. The optimum temperature and pH values for BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 were recorded as (60 °C, 50 °C and pH 9.0, pH 8.0) for free enzymes and (60-70 °C, 55 °C ve pH 9.5, pH 8.5) for immobilized enzymes. K_m and V_{max} values for free BTL2 were 0.146 mM and 2.504 U/mL, respectively; and these values for *B. pumilus* MBB03 were calculated as 0.055 mM and 0.636 U/mL, respectively. K_m and V_{max} values for immobilized enzymes were detected as 0.146 mM and 2.504 U/mL for BTL2; and 0.055 mM, 0.636 U/mL for *B. pumilus* MBB03, respectively. Thermal stability for both BTL2 and *B. pumilus* MBB03 for free and immobilized enzymes were recorded between 40-65 °C and 40-60 °C, respectively. pH stability for BTL2 was pH 7.0-11.0 at +4 °C for both free and immobilized enzymes, and it was pH 8.0-10.0 at +4 °C for *B. pumilus* MBB03 for both free and immobilized enzymes.

In this study, we concluded that wide ranges of thermal and pH stabilities of free and immobilized lipases, and their abilities to protect their stabilities in various metal ions and organic solvent detergent formulas and other significant qualities make them potentially suitable for many industrial applications.

2017, 172 pages

Key words: *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus pumilus*, Recombinant Lipase, Immobilizasyon, Characterization.



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

1.Simgeler

kDa	: Kilo Dalton
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
°C	: Santigrat
UV	: Ultraviyole (Morötesi) ışınım
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

2.Kısaltmalar

16S	: Küçük altbirim RNA'ları
APS	: Amonyum Persülfat
Bç	: Baz çifti
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BSA	: Bovin Serum Albümin
BTL2	: <i>Bacillus thermocatenulatus</i> lipazı 2
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
E.C	: Enzim Sınıflandırması (Enzyme Classification)
IPTG	: İzopropiltiogalaktozid (Isopropylthiogalactoside)
IUBMB	: International Union of Biochemistry and Molecular Biology
LB	: Luria-Bertani

NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDB	: Protein Data Bank
PMSF	: Fenilmetilsülfonoflorid
<i>pNP</i>	: <i>p</i> -nitrofenil
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
rRNA	: Ribozomal RNA
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakril Amid Jel Elektroforezi
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil)aminometan
U	: Ünite
U/mg	: Özgül Aktivite Birimi
<i>V_{maks}</i>	: Maksimum Hız
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-indolil-β-D-galaktopiranosid
X-Ray	: Röntgen Işınları (<i>Röntgenstrahlung</i>)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1 Lipidlerin gliserol ve yağ asitlerine hidroliz reaksiyonu.	6
Şekil 2.2.4a α/β hidrolaz katlanması.....	10
Şekil 2.2.4b <i>B. subtilis</i> lipazının yapısal gösterimi.....	11
Şekil 2.4a BTL2' nin renklendirilmiş etiketli açık konformasyon yapısı.	18
Şekil 2.4b BTL2' nin aktif bölgesi.	20
Şekil 2.4c BTL2' nin aktif bölgesini gösteren çubuk yapısı.....	21
Şekil 2.4d BTL2' nin açık ve kapalı lid yapısı.	22
Şekil 2.6.2 Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	29
Şekil 2.6.2a Tutuklama yöntemi ile enzim immobilizasyonu	30
Şekil 2.6.2b Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu.	31
Şekil 2.6.2c Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu.	32
Şekil 2.6.4 İmmobilizasyonda kullanılan farklı destek materyal türleri.....	34
Şekil 2.6.4.1 Alginatın kimyasal yapısı.	36
Şekil 2.6.4.2 Jelatin ve kollajenin şematik görünümü.	39
Şekil 3.1.6 Moleküler belirteçler.	44
Şekil 3.1.7a pEcoli-Cterm-6xHN vektör haritası.	45
Şekil 3.1.7b pD451-SR:219414 vektör haritası.....	46
Şekil 3.2.10 BSA standart grafiği	63
Şekil 4.1 PCR ile çoğaltılan BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipaz geninin %1' lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	74
Şekil 4.4. pEcoli-Cterm-6xHN -BTL2-lipaz plazmit DNA' sı ve pD451-SR:219414- <i>B.</i> <i>pumilus</i> MBB03-lipaz DNA' sı %1' lik agaroz jel görüntüsü.	76
Şekil 4.5 Mavi-Beyaz koloni seçimi.....	77

Şekil 4.6a BTL2-lipaz genine ait anlamlı DNA zinciri.	78
Şekil 4.6b <i>B. pumilus</i> MBB03-lipaz genine ait anlamlı DNA zinciri.	79
Şekil 4.10 BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipaz SDS-PAGE elektroforezi.....	82
Şekil 4.11 <i>B. thermocatenulatus</i> ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklanması ile elde edilen boncuklar.....	83
Şekil 4.12.1 <i>B. thermocatenulatus</i> ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna jelatin konsantrasyonunun etkisi.	84
Şekil.4.12.3 <i>B. thermocatenulatus</i> ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna CaCl ₂ konsantrasyonunun etkisi.....	86
Şekil 4.12.4 <i>B. thermocatenulatus</i> ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna enzim konsantrasyonunun etkisi.....	87
Şekil 4.12.5 <i>B. thermocatenulatus</i> ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna boncuk boyutunun etkisi.	88
Şekil 4.12.6 <i>B. thermocatenulatus</i> ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna boncuk miktarı etkisi.	89
Şekil 4.13.1a <i>B. thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipaz enzim aktiviteleri üzerine pH' in etkisi.	91
Şekil 4.13.1b <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipaz enzim aktiviteleri üzerine pH' in etkisi.	91
Şekil 4.13.2a <i>B. thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipaz enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi.	92
Şekil 4.13.2b <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipaz enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi.	93
Şekil 4.13.3a <i>B. thermocatenulatus</i> serbest lipaz enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.	94
Şekil 4.13.3b <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest lipaz enzim aktiviteleri üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.	94

Şekil 4.13.4a <i>B. thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipazı Lineweaver-Burk eğrisi.....	95
Şekil 4.13.4b <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipazı Lineweaver-Burk eğrisi.	96
Şekil 4.13.5a <i>B. thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipazı substrat spesifite aktivite grafiği.	97
Şekil 4.13.5b. <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipazı substrat spesifite aktivite grafiği.	98
Şekil 4.13.6 a <i>B. thermocatenulatus</i> serbest lipazının +4 °C’ deki pH 4.0, 5.0,6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0’ de pH kararlılığının zamana göre değişim grafiği.	99
Şekil 4.13.6 b <i>B. thermocatenulatus</i> immobilize lipazının +4 °C’ deki pH 4.0, 5.0,6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0’ de pH kararlılığının zamana göre değişim grafiği.	100
Şekil 4.13.6 c <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest lipazının +4 °C’ deki pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0’ de pH kararlılığının zamana göre değişim grafiği.	101
Şekil 4.13.6 d <i>B. pumilus</i> MBB03 immobilize lipazının +4 °C’ deki pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0’ de pH kararlılığının zamana göre değişim grafiği.	102
Şeki 4.13.7 a. <i>B. thermocatenulatus</i> serbest lipazının 40,50, 60, 70, 80, 90 °C’ deki ısı kararlılık eğrisi.	103
Şekil 4.13.7 b <i>B. thermocatenulatus</i> immobilize lipazının 40,50, 60, 70, 80, 90 °C’ deki ısı kararlılık eğrisi.	104
Şekil 4.13.7 c <i>B. thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipazının oda ısısında ısı kararlılık eğrisi.	105
Şekil 4.13.7 d <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest lipazının 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C’ deki ısı kararlılık eğrisi.	106
Şekil 4.13.7e <i>B. pumilus</i> MBB03 immobilize lipazının 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C’ deki ısı kararlılık eğrisi	107

Şekil 4.13.7 f <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipazının oda ısısında ısı kararlılık eğrisi.	108
Şekil 4.13.12a <i>B.thermocatenulatus</i> immobilize lipazının yeniden kullanılabilirliği ..	121
Şekil 5.13.12b <i>B. pumilus</i> MBB03 immobilize lipazının yeniden kullanılabilirliği	122
Şekil 4.13.13 Alginat+jelatin boncuklara immobilize <i>B.thermocatenulatus</i> ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipazının depo kararlılığı grafiği.	123



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.2.6 Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları.	13
Çizelge 2.6.4 Enzim immobilizasyonunda kullanılan destekler.	35
Çizelge 3.2.2a BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 aday lipaz geninin PCR amplifikasyonunda kullanılan primer DNA dizileri.	54
Çizelge 3.2.2b PCR reaksiyon kurulumu.	55
Çizelge 3.2.2.c BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 ve negatif kontrol PCR reaksiyon kurulumu.	56
Çizelge 3.2.5. PCR ürünlerinin ve plazmit DNA'ları kesim reaksiyon kurulumu.	58
Çizelge 3.2.6 Kesilmiş lipaz (BTL2 ve <i>B. pumilus</i>) ve vektör (pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414) ligasyonu reaksiyon kurulumu.	59
Çizelge 3.2.10 BSA Standartları ve Protein Örneğinin Hazırlanışı.....	62
Çizelge 3.2.11 SDS-PAGE hazırlamak için gerekli bileşenler ve oranları.	64
Çizelge 4.9 <i>B. thermocatenulatus</i> BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03' ten saflaştırılan lipaz enzimine ait saflaştırma tablosu.	81
Çizelge 4.12. <i>B.thermocatenulatus</i> ve <i>B.pumilus</i> MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklanmasının optimizasyon sonuçları.....	89
Çizelge 4.13.8a Bazı metal iyonlarının <i>B. thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.	109
Çizelge 4.13.8b Bazı metal iyonlarının <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	111
Çizelge 4.13.9a Bazı deterjan, yüzey aktif maddeler ve kimyasalların <i>B. thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.	112
Çizelge 4.13.9b Bazı deterjan, yüzey aktif maddeler ve kimyasalların <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.	113
Çizelge 4.13.10a Bazı organik çözücü ve kimyasalların <i>B. thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	115
Çizelge 4.13.10b Bazı organik çözücü ve kimyasalların <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	117

Çizelge 4.13.11a Bazı kimyasal ve inhibitör maddelerin <i>B.thermocatenulatus</i> serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	118
Çizelge 4.13.11b Bazı kimyasal ve inhibitör maddelerin <i>B. pumilus</i> MBB03 serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	120



1.GİRİŞ

Enzimler canlı organizmadaki biyokimyasal tepkimelerin ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan, belirli kimyasal tepkimeleri hızlandıran protein yapısındaki bileşikler olarak tanımlanmaktadır [1]. Enzimler canlı organizma dışında uygun koşullar sağlandığında etkilerini gösterebiliyor olmaları, doğal ortamları dışındaki pek çok alanda enzimlerden yararlanabilme imkânı sağlamaktadır. Bu amaçla enzimler başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizikokimya, organik kimya, genetik, tıp, mühendislik gibi bilim dalları için büyük önem taşımaktadır [2]. Ayrıca enzimlerin spesifik oluşları ve çok düşük substrat derişimlerinde bile reaksiyonları katalizlemelerinden dolayı endüstride önemli kullanım alanlarına sahiptirler. Enzimler gıda ve kimya endüstrisi başta olmak üzere eczacılık, ziraat gibi alanlarda teşhis ve tedavide kullanılmaktadırlar [3].

Lipazlar sulu ortamlarda triaçilgliserollerde bulunan karboksilester bağları ile etkileşime girerek yağ asitleri ve gliserolu oluşturan triaçilgliserolester hidrolazları olarak ifade edilirler [4]. Çok az suyun bulunduğu ortamlarda ise lipazlar esterifikasyon, alkolizis ve asidolizis gibi tersinir reaksiyonları gerçekleştirebilmektedir [5].

Lipazlar, hücre dışı enzim üreten mikroorganizmalardan ve diğer farklı kaynaklardan elde edilen enzimlere göre daha ucuz ve kolay elde edilebilmektedir. Bu yüzden biyokatalizör olarak pek çok endüstriyel süreçte geniş kullanım alanına sahiptir. Endüstriyel enzimlerin % 80'e yakını hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Günümüzde lipazlar, oldukça geniş uygulamalar ile giderek artan bu pazarın yaklaşık % 10'luk kısmını oluşturmaktadır. Lipazlar; esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, kimyasal olarak üretilemeyen özel bileşiklerin üretimini, stereo ve bölgesel spesifik özellikleri ile kolaylaştırmaları, ester bağına spesifik olmaları, yüksek substrat seçicilikleri ve yan ürün oluşumunu engellemeleri gibi avantajlara sahiptir [6].

Endüstriyel lipaz üretiminin daha hızlı gelişmesini engelleyen temel sebep, lipazların düşük aktivite ve kararlılık göstermesi ya da maliyetleri olmuştur. Tüm bu faktörler göz

önüne alındığında, endüstriyel uygulamalarda kullanılacak immobilize lipaz sistemlerinin önemi daha da artmaktadır. Dolayısıyla bu dezavantajdan kurtulmak için, lipazların çeşitli desteklere fiziksel ve kimyasal immobilizasyonları bir ihtiyaç haline gelmiştir [7].

İmmobilize enzim serbest enzim içermemesi nedeniyle daha temiz olmasına ve enzimin tekrar kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. Genel olarak serbest enzime kıyasla tutuklanmış enzimin, yüksek sıcaklık veya organik çözücüler gibi denatüre edici koşullara karşı daha dayanıklı bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir [8, 9].

Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin endüstrideki önemi ve kullanım alanları genişledikçeS endüstriyel enzim pazarında bu organizmalardan elde edilen enzimlerin payı artarak büyümeye devam etmektedir. Bu nedenlerden ötürü farklı organizmalardan yeni özelliklere sahip enzimlerin tanımlanması, karakterize edilmeleri oldukça önem taşımaktadır. Son dönemlerde lipazlar kullanıldığı birçok endüstriyel sürecin yanı sıra biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir role sahiptir. Bu çalışmada gıda, deterjan, ilaç sanayisi, tarımla ilgili kimyasal madde (insektisit, pestisit), ve oleokimyasal (katı-sıvı yağ hidrolizleri, biyolojik yüzey aktif madde sentezleri) endüstrileri gibi çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılan lipaz enzimi *B. thermocateulatus* (BTL2) ve *B. pumilus* MBB03' te kodlanan lipaz geni klonlandı, *E.coli* BL21 (DE3) konak hücrede rekombinant olarak üretildi ve saflaştırıldı. Elde edilen enzimin alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklama tekniğiyle immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bu immobilize formların aktiviteleri denenerek elde edilen başarılı immobilize formların bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi. Bu amaçla; BTL2 ve *B.pumilus* MBB03 lipazının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonu ile elde edilen immobilize boncuklar için optimum alginat konsantrasyonu, jelatin konsantrasyonu, CaCl₂ yüzdesi, enzim miktarı, boncuk boyutu, boncuk miktarı gibi koşullar optimize edilerek, immobilize ve serbest lipazın aktifliğine etki eden sıcaklık, pH, substrat derişimi, pH ve ısıl kararlılık, çeşitli metal iyonları, deterjanların ve kimyasal maddeleri gibi çeşitli parametrelerin etkisi, depolama süresi, tekrar kullanılabilirliği incelendi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Enzimler Özellikleri ve Kullanım Alanları

Kimyasal bir reaksiyonu hızlandıran, fakat kendisi reaksiyondan değişmeden çıkan maddelere “katalizör” denir. Enzim ise canlı hücreler tarafından sentezlenen, etki yapabilmesi için hücrenin varlığını gerektirmeyen, ısıya dayanıksız, protein yapısında organik bir katalizördür. Enzimler, organizmada sayısız kimyasal reaksiyonu yöneten moleküller oldukları için enzim reaksiyonları yaşam yönünden en önemli reaksiyonlardır.

Enzimlerin iki çarpıcı özelliği bilinmektedir. Bunlardan biri; katalize ettiği reaksiyonların hızları, katalize edilmeyen aynı reaksiyonun hızından 10^3 - 10^8 kat daha fazladır. Bir diğeri ise; enzimler o kadar stereospesifiktirler ki, tek bir metabolitin tek bir reaksiyonunu katalize ettikleri gibi, sadece enantiyomerleri değil identik atomları veya grupları da parçalayabilirler [10].

Enzimler yaklaşık 12 bin ile 1 milyon dalton arasında değişen molekül ağırlığına sahiptir. Enzimler bir veya birden fazla substratı etkilerken aktivite göstermek için bazen Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da kofaktöre bazen de koenzim adı verilen kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimler aktivite için hem koenzime hem de bir ya da daha fazla metal iyonuna ihtiyaç duyarlar. Enzim proteinine çok sıkı hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır [11]. Eğer enzim kofaktörü veya koenzimi ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif durumda ise enzimin bu haline holoenzim adı verilmektedir. Kofaktör veya koenzim enzimden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelecek olursa enzimin yalnız proteinden meydana gelmiş bu inaktif haline apoenzim adı verilmektedir [12]. Enzimle katalizlenen bir tepkimenin bir özelliği de aktif yer olarak adlandırılan enzim üzerindeki sınırlandırılmış bir bölgenin içinde meydana gelmesidir. Enzimin aktif merkezine bağlanan ve enzimin üzerinde aktivite gösterdiği molekül substrat olarak adlandırılır. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları

substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu sağlayan aminoasitlerden oluşmuştur [11].

Önceleri enzimler, kullandıkları substratın veya katalizledikleri reaksiyonların türüne göre isim almaktaydı. Enzimin etkilediği substratın ya da reaksiyon adının sonuna “-az” veya “*litik*” eki getirilerek enzim isimlendirilmekteydi. Yağları parçalayan lipaz (lipolitik enzim gibi). Bazen enzimin kaynağı da belirtilerek pankreatik lipaz gibi daha detaylı isimlerde verilir. Enzim adlarının az bir kısmının sonuna “*in*” eki (pepsin, kimotripsin gibi) vardır. Çok sayıdaki enzim isminin ise bu kuralların hiç birine (lizozim gibi) uymadığı belirtilir [10].

Enzimler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğine (IUBMB) bağlı Enzim Komisyonu (E.C.) tarafından 4 numarayla tanımlanırlar ve E.C. 1.2.3.4 şeklinde gösterilir. Bu gösterimde;

1. İlk numara enzimin 6 sınıftan hangisine ait olduğunu gösterir.
2. İkinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu belirtir.
3. Üçüncü numara akseptörü belirtir
4. Dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasıdır

Enzim Komisyonu, enzim sınıflandırılmasını 6 büyük grup altında toplamaktadır.

1- Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize ederler.

2- Transferazlar: Alıcı ve verici moleküller arasında fonksiyonel grup (amino, açil, tek karbon, fosfat, kükürt, glikozil) transferi yapan enzimlerdir.

3-Hidrolazlar: Bir molekülü iki ya da daha fazla sayıda moleküle ayırmak için çeşitli (C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit gibi bağınıda içeren) bazı bağları sulu ortamda gerçekleşen hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler.

4-Liyazlar: C-C, C-O, C-S, C-N bağlarının ayrılmasını, hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla katalizlerler.

5-İzomerazlar: Bir molekül içerisindeki atomların yeniden düzenlenme reaksiyonlarını katalizlerler.

6-Ligazlar: İki molekülün birbirine bağlanma reaksiyonlarını katalizlerler [10, 13, 14].

Örneğin lipaz enziminin sistematik tanımlaması E.C. 3.1.1.3 (triacilgliserol lipaz) olup, kullanılan rakamlardan sırasıyla “3” altı büyük gruptan üçüncüsü olan hidrolazları, “1” ester bağına etki edenleri, “1” karboksil asit hidrolazları, “3” ise triacilgliserol lipazı ifade etmektedir [13].

Enzimler *in vivo* koşullarda aktivite gösterebildikleri gibi, *in vitro* şartlar sağlandığında da aktivite göstermeleri onların canlı olmayan koşullarda kullanımına olanak sağlamıştır [2]. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler günümüzde hücreden çıkmış çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir [10, 15]. Böylece enzimlerin birçok alanda kullanımı yaygınlaşmış, endüstriyel proseslerde ekonomik olarak rahatlama sağlamıştır [2]. Günümüzde enzimler; gıda, tekstil, farmasötik, deterjan, kağıt ve deri endüstrisi, kozmetik, biyosensör üretimi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca, enzimatik reaksiyonların yüksek özgülüğü ve kullanılan ılımlı reaksiyon koşulları enzim kullanılan proseslere olan ilginin artma nedenleri arasında sayılmaktadır. Çeşitli uygulamalarda giderek daha büyük önem kazanan enzimler ticari olarak üretilmektedir. [16, 17].

Endüstriyel enzim pazarında en önemli yeri, lipaz, proteaz, amilaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimler tutmaktadır [18]. 1995 yılında endüstriyel enzimler için dünya çapında satış hacmi 1 milyar dolar olduğu ve 2000 yılında, enzimlerin endüstriyel pazardaki değerinin yaklaşık 1.5 milyar dolar olduğu ve bu hacmin 2005 yılına kadar iki katına çıkacağı tahmin edilmekteydi [19]. Global Endüstri Araştırma Kuruluşu, endüstriyel enzimlerin dünya çapındaki pazarı üzerinde kapsamlı bir analiz yapmıştır. Bu global stratejik iş raporunda, enzimlerin dünya pazarındaki bütçesinin 2012 yılında 2.9 milyar doları aştığı ve ana ürün parçalarının lipazlar, karbohidraz ve proteazı içereceği bildirilmiştir [20]. Bu enzimlerin en az % 75 hidrolazlardır ve bunların % 90 mikroorganizmaların fermantasyonu ile üretilmektedir [19]. Tanımlanan 4000 kadar enzimin 200 kadarı ticari amaçlı kullanılmaktadır [21]. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59’unu proteazlar, %28’ini karbohidrazlar, % 3-5’ini lipazlar ve %10’unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır [15,20]. Dünyada enzim talepleri 12 büyük ve 400

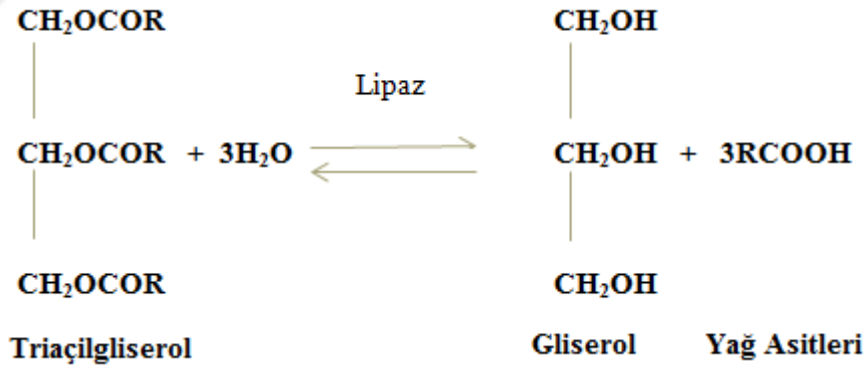
kadar küçük üretici firma tarafından karşılanmaktadır. Toplam üretimin yaklaşık % 60' ı Avrupa ülkelerinden sağlanmaktadır [21].

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan olarak değerlendirilen rekombinant DNA teknolojilerinin başka bir ifade ile genetik ve protein mühendisliğinin uygulamalarından yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır [22].

2.2 Lipazlar

2.2.1 Lipazların Tanımı

Lipazlar (E.C.3.1.1.3), yağ-su arayüzeyde triaçilgliserolleri serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimler olarak tanımlanır [23] (Şekil 2.2.1). Lipidlerin gliserol ve yağ asitlerine hidroliz reaksiyonu sulu fazda ve bunun tersine sentez reaksiyonu suyun sınırlı olduğu organik çözücülerde meydana gelir [24].



Şekil 2.2.1 Lipidlerin gliserol ve yağ asitlerine hidroliz reaksiyonu [25].

Lipazlar genel olarak organizmada trigliseridlerin gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalizler. Buna ilaveten, karboksilli esterlerin hidrolizi dışında karboksilli ester sentezini, içesterleşme, transesterleşme ve amid sentezi gibi reaksiyonları katalizlemektedir. [26]. Ayrıca lipazların çok yönlü fonksiyonları, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çalışabilirliği, ticari olarak bulanabilirliği, düşük maliyeti, stereo ve

enantiyo seçiciliği biyoteknolojik uygulamalarda lipazı en önemli biyokatalizörlerden biri yapmıştır [6, 26].

Lipazlar, geniş kapsamlı kullanımı nedeniyle, yoğun bir çalışma konusu olmaya devam etmektedir. Lipaz üzerine araştırmalar, özellikle lipaz genini klonlama, kinetik, eylem mekanizmasının aydınlatılması, genel karakterizasyon performansı ve yapısal karakterizasyonu üzerine odaklanmıştır [21].

2.2.2 Lipazların Tarihçesi

Lipaz ilk olarak Claude Bernard tarafından 1856'da çözünmeyen yağ damlacıklarını çözünür hale getirmek için yaptığı çalışmalar sırasında karışıma bir enzim olarak kattığı pankreatik sıvıda keşfedilmiş ve daha sonra 1943 yılında kan plazmasındaki lipoprotein lipazlar “temizleyici faktör” olarak tanımlanmıştır. Anfinsen ve arkadaşları temizleyici faktörü lipolitik enzimlerin varlığı olarak yorumlamışlardır. Christiaan Eijkman tarafından 1901 yılında birçok bakterinin lipaz ürettiği ve salgıladığı rapor edilmiştir [27, 28]. Sarda ve Desnuelle tarafından 1958 yılında, lipazlara dayalı ara yüzey aktivasyonu tanımlanmış. Bu özelliğin keşfinden sonra, Sarda ve Desnuelle lipaz aktivitesinin suda çözünmeyen substrat ve su arasındaki arayüzü oluşumu ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır [29]. Pankreatik lipaz için 1981 yılında, amino asit dizisi belirleme çalışması yapılmıştır [30]. Yapılan çalışmaları takiben 1990 yılında *Rhizomucor miehei* lipazı ve insan pankreas lipazının 3 boyutlu yapıları belirlenmiştir [29].

Ticari anlamda ilk lipaz üretimi, 1994 yılında Novo Nordisk firması tarafından üretilen *Thermomyces lanuginosus* (fungi) orijinli *Aspergillus oryzae*'de ifade edilmiş ilk rekombinant lipazdır. Hemen ardından 1995'de Genencor International tarafından iki bakteriyel lipaz *Pseudomonas mendocina*'dan “Lumafast” ve *Pseudomonas alcaligenes*'den “Lipomax” üretilmiştir [21].

Daha sonra 1994-1998 yılları arasında çok sayıdaki yeni lipazın klonlandığı ve karakterize edildiği, aynı dönem içerisinde lipaz gen ekspresyonunun ve regülasyonunun anlaşılmasında önemli mesafelerin katedildiği ve ayrıca lipazın

katlanma ve salgılama mekanizmaları üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır [19, 26, 31].

2.2.3 Lipazların Katalizledikleri Reaksiyonlar

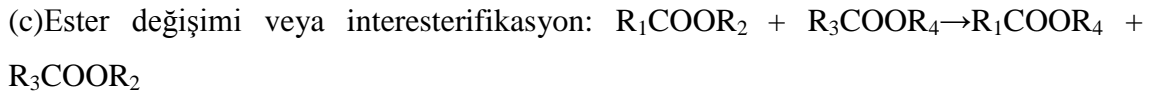
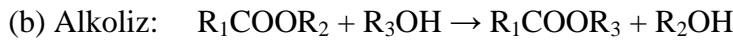
Lipazlar, trigliseritler üzerindeki hidrolitik aktivitelerinin yanı sıra, interesterleşme, alkoliz, asidoliz, esterleşme ve aminoliz reaksiyonlarını katalizlemektedir [17, 20, 32]. Bu hidroliz reaksiyonları tersine çevrilebilir. Ayrıca mikrobiyal lipazlar bölge seçimli ve kiral seçim özelliği göstermektedir [33].

Endüstride ve bilimsel araştırmalarda lipazlar; hidroliz, esterleşme, transesterleşme, peptit sentezi gibi reaksiyonları ve bölge seçimli, stereoseçimli dönüşümleri katalizlemekte kullanılırlar [21].

Lipazların Katalizlediği reaksiyonlar:



3. Transesterifikasyon (Organik ortam)



Lipaz substratları suda oldukça düşük çözünürlüğe sahip triaçilgliseroller olup reaksiyonları yağ-su arayüzeyinde gerçekleşir. Lipazların katalitik potansiyelleri, protein mühendisliği, solvent mühendisliği, yönlendirilmiş evrim gibi yöntemler kullanılarak arttırılarak daha seçici hale getirilmektedir [31].

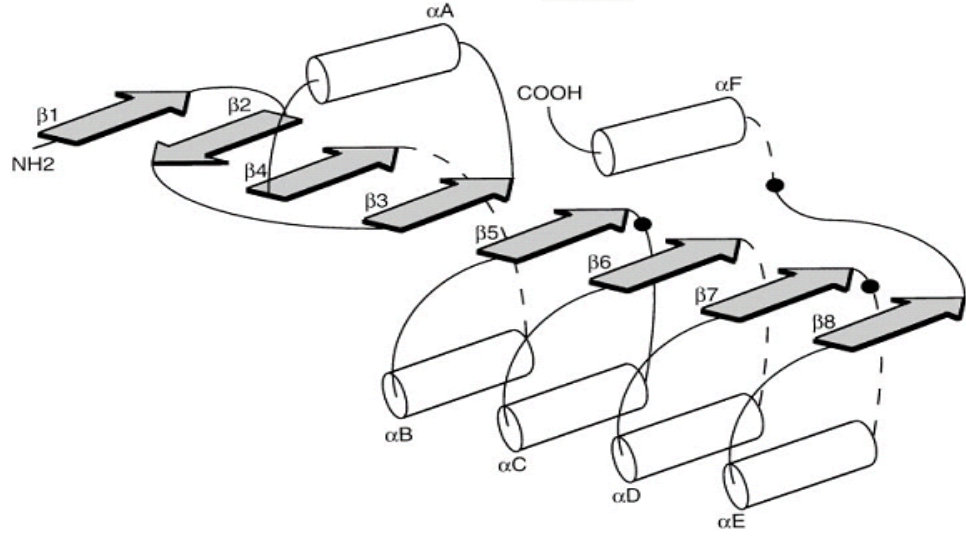
2.2.4 Lipazların Yapısı

İlk kez 1990 yılında iki farklı lipaz (*Rhizomucor miehei* lipazı ve insan pankreatik lipazı) yapıları X-ışını kristalografisi ile çözülmüş ve enzimin üç-boyutlu yapısından, ara yüzey aktivasyonunun enzimin aktif merkezini kapsayan kısa α sarmal yapısında

(kapak) olabileceği öne sürülmüştür [34]. Lipazların üç boyutlu yapısının belirlenmesi, enzimin arayüzüne bağlanması durumunda enzimin bu kapak yapısının kapalı formdan açık forma dönüştüğü, yani su-yağ arayüzey substrat varlığında kapağın açıldığı ve enzimin aktif hale geldiği substrat yokluğunda ise kapağın kapalı olduğu ve enzim inaktif olduğu belirtilir [35, 36]. Ancak, yüksek derecede saflaştırılmış lipaz üzerine yapısal ve biyokimyasal veriler sonucunda arayüzey aktivasyonun tüm lipazlarda görülmediği ve bazı lipazların aktif merkezine erişimini kontrol eden bir kapak yapısının olmadığı görülmüştür [34]. *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* ve *Candida antarctica* lipazları aktif bölgelerini kaplayan kapak yapısına sahip olmalarına rağmen yüzeysel aktivasyon göstermezler. *Bacillus subtilis* elde edilen ve domuz pankreatik lipazı gibi diğer lipazlar, yüzeysel aktivasyona sahip olmalarına rağmen aktif bölgelerini kaplayan bir kapaktan yoksun olduğu kaydedilmiştir [31,34]. Lipolitik enzimlerin gerçek lipaz olarak tanımlanmasında iki önemli kriter bulunmaktadır. Bunlardan biri, yağ-su arayüzeyinde aktif olmalarıdır. Bu duruma ara yüzey aktivasyonu denir. İkincisi ise, bir kapak yapısı içermeleridir. Fakat bu kriterler sınıflandırma için her zaman uygun olmayabilir. Çünkü bazı enzimler kapak yapısına sahip olmasına rağmen lipolitik aktivite göstermemektedir [31].

Geobacillus thermocatenulatus' dan elde edilen lipazın, kapak enzimin amino asitlerin büyük bir bölümünü içeren karmaşık bir yapıya sahip olduğu ve bir çift kapaktan oluştuğu belirtilmiştir [37].

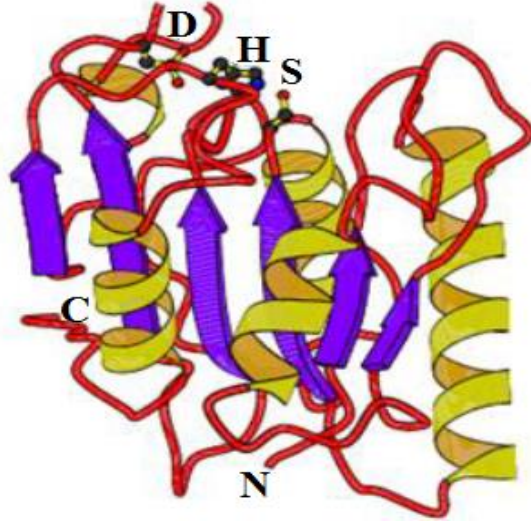
Lipazların aktif merkezi ile yapılan çalışmalar lipazların serin hidrolaz sınıfına ait olduğunu ortaya koymuştur [26] Aktif bölgelerinde serin yer aldığı için serin hidrolazları olarak adlandırılmaktadır [6] Yapılan X-Ray çalışmaları lipazların α/β hidrolaz ailesi katlanmasına ait olduğunu gösterilmiştir. Bu tür karakteristik katlanmanın, çekirdekte amfifilik altı α -sarmal ($\alpha A-\alpha F$) tabakasının çevrelediği sekiz şeritten oluşan bir hidrofobik β -tabaka ($\beta 1-\beta 8$) içerdiği bildirilmiştir [38] (Şekil2.2.4a).



Şekil 2.2.4a α/β hidrolaz katlanması [31].

Aktif bölge; serin, aspartik asit/glutamik asit ve histidinden oluşan üç katalitik içerikten meydana gelmiştir [31]. Nükleofilik serin kalıntısının çoğunlukla korunmuş Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly bir pentapeptid olduğu ve $\beta 5$ şeritinin C-terminal ucunda yer aldığı belirtilmiştir [39, 40]. Aktif bölgedeki glutamik ya da aspartik asit olan diğer iki kalıntı kaynağın yedinci β şeritten sonra, glisinin sekizinci β şeridinde ve altıncı α -heliks arasında yer aldığı ifade edilmiştir [31]. β tabakanın bir sol-el süpersarmal bükülme sergilediği ve ilk ile son şeritlerin birbirini yaklaşık olarak 90° 'lik bir açı ile kestiği tanımlanmıştır [31].

Bu hidrofobik birimlerin çoğunun lipazların lipid-su arayüzeyine tutunabilmesi için görev aldığı ve böylece lipid yüzeyinin hidrofobik kısmına enzimin nüfuz etmesini sağladığı belirtilir. Bir aktivasyon olduğunda enzimin kapağı kapalı formdan açık forma dönüşür ve böylece aktif bölge substratın etkileşebileceği bir hale gelir. Bu aktivasyon işlemi sırasında katalitik serin birimi üzerinde hidrofobik bir yarıklık oluşur. Bu yarıklık açıl gruplarının ulaşabilmesi için uzanmış bir cep şeklindedir. Birçok lipazda kapağın hareketiyle ayrıca bir oksianyon boşluk oluşmaktadır. Bu boşluk substrata yapılacak nükleofilik saldırı sırasında oluşan negatif yükleri kararlı kılan elektrofilik bir çevre meydana getirir [40].



Şekil 2.2.4b *B. subtilis* lipazının yapısal gösterimi.

Ser77, His156 ve Asp133 rezidülerinden oluşan aktif bölge sırasıyla S, H, ve D ile gösterilmiştir. N ve C harfleri ise, N ve C terminallerini işaret etmektedir [41].

Lipazların boyutu tiplerine göre değişmekle birlikte, 19,4 kDa kadar küçük boyutlu lipazların bulunduğu ve ayrıca her bir alt birimi yaklaşık 50 kDa olan 300 kDa'dan daha büyük oligomerik yapıya sahip lipazların bulunabildiği rapor edilmiştir [42].

2.2.5 Lipazların Substrat Spesifikliğı

Lipazların substrat spesifikliğı, enzimin moleküler özellikleri ve substratın yapısına bağlı olup, enzimin substrata bağlanmasına etki eden faktörler tarafından kontrol edilir. [6] Lipazların, substratlarına doğru pozisyon, yüzey ve stereo-spesifiklik sergilerler.

Bölgesel Spesifiklik (Pozisyonel Özgüllük): Lipazlar gliseridleri hidrolize etme kabiliyetlerine göre spesifik olmayan lipazlar, 1,3-bağlarına (pozisyon spesifikliğı veya regiospesifiklik gösteren lipazlar) spesifik lipazlar ve yağ asidi spesifik lipazlar olarak üç ayrı grupta incelenmektedir.

Spesifik Olmayan Lipazlar: Bu gruba giren lipazlar, triaçilgliserollerin tüm pozisyonlarındaki açıl gruplarını koparabilme yeteneğine sahip olup; sonuçta triaçilgliserollerini, gliserol ve serbest yağ asitlerine parçalarlar [6,25]. Reaksiyonda ana

ürün olarak mono ve diaçilgliseroller oluşur. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girerler [43].

1,3 Bağlarına Spesifiklik Gösteren Lipazlar: Bu gruba giren lipazlar sadece nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından özgül olarak hidrolizlerler [44]. Reaksiyon sonunda triaçilgliserollerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diaçilgliseroller ve 2-monoaçilgliseroller oluşur. 1,2 (2,3)-diaçilgliseroller ve 2-monoaçilgliseroller, kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3- diaçilgliserollere ve 2-monoaçilgliserollere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilir ve sonuçta 1,3-bağlarına özgül lipazlar da özgül olmayan lipazlar gibi triaçilgliserolleri gliserol ve serbest yağ asitlerine kadar parçalayabilirler. *Bacillus thermocatenuatus*, *Candida antarctica*, *Mucor javanicus*, *Penicillium cyclopeum*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-bağlarına özgüldür [6].

Yağ Asidi Özgül Lipazlar: Bu grup lipazlar, yağ asidi zincir uzunluğuna göre spesifiklik gösterirler [18]. Triaçilgliserollerdeki 9 ve 10. karbonlar arasında çift bağ içeren bazı yağ asitlerine özgül olup sadece bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar. *Geotrichum candidum*' dan elde edilen lipaz bu grupta yer alır [25].

2.2.6 Lipazların Uygulama Alanları

Enzimlerin kullanıldığı pek çok alanda lipazların önemi giderek artmaktadır [6]. Doğal ürünlere olan ilginin artmasıyla birlikte gıda sanayinde geleneksel kimyasal işlemler yerine enzimlerin kullanımı gündeme gelmiştir [45]. Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantiyo seçicilik, bölge seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur [6]. Lipazlar sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi ekstrem koşullarda kararlı yapılarını koruyabilmeleri ve kullandıkları substratların çeşitliliği gibi nedenlerle önemli biyokatalizörler arasında kabul edilirler. Özellikle endüstriyel alanda kullanılan lipazlar, genellikle hücre dışı lipaz üreten

mikroorganizmalardan üretilmektedir [18, 21,27]. Lipazlar endüstriyel enzim pazarının sadece % 3-5'ini oluşturmaktadır ve biyoteknolojide önemli enzimler olarak önem kazanmaktadır [15,20].

Endüstride ve bilimsel araştırmalarda; hidroliz, esterleşme, transesterleşme, peptit sentezi gibi reaksiyonları ve stereoseçimli, bölge seçimli dönüşümleri katalizlemekte kullanılırlar [21]. Birçok tepkimeyi katalizleyebilme yetenekleri ile deterjan, gıda, kâğıt, kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde, deri sanayi ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda geniş kullanıma sahiptir [17,18, 21, 27] (Çizelge 2.2.6).

Çizelge 2.2.6 Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları [21].

Endüstri	Görevi	Ürün ve Uygulama Alanı
Deterjan	Yağların hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynir olgunlaştırılması, tereyağının modifikasyonu	Süt, peynir ve tereyağındaki tatlandırıcı maddelerin geliştirilmesi
Ekmek	Lezzet geliştirilmesi	Raf ömrünün uzatılması
İçecek	Aroma geliştirilmiş	İçecekler
Gıda sosları	Kalite iyileştirme	Mayonez, sos
Et ve balık	Lezzet geliştirme	Et ve balık ürünlerinde yağ uzaklaştırılması
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon; hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
Kimyasallar	Enantioseçicilik, sentez	
İlaç	Transesterifikasyon; hidroliz	Sindirimi kolaylaştırıcı düzenleyiciler
Kozmetik	Sentez	Nemlendiriciler, emülsifiye ediciler
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Kâğıt	Hidroliz	Geliştirilmiş kalitede kâğıt
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması

Lipaz kullanılarak yeni bileşiklerin sentezi ve uygun teknolojilerin geliştirilmesi bu enzimin kullanım alanını hızla genişletmektedir [21]. Lipaz esaslı çalışmaların temel amacının geliştirilmiş endüstriyel uygulamalar için yüksek bir performans ile birlikte belirli bir substrat için geliştirilmiş stabilite ve yüksek spesifite olduğu ifade edilmektedir [46].

Hidrolitik lipazların başlıca ticari kullanım alanı deterjanlardır ve toplam lipaz satışının % 32'si deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. 2001 yılı verilerine göre yaklaşık olarak 13 milyar ton deterjana 1000 ton kadar lipaz eklenmesi yapılmaktadır [21]. Deterjanlarda kullanımı yağ kaynaklı lekelerin kolayca çıkarılması amacıyla, dericilikte yalnızca derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için kullanılmaktadır [22]. Lipazların trigliseridler için geniş seçicilik göstermesi atık su arıtma uygulama alanlarında ve çamaşır deterjan formülasyonlarında avantaj sağlamaktadır [46].

Lipazlar, kâğıt endüstrisinde beyazlaşmayı artırır, kimyasal kullanımını ve işlem süresini azaltır. *Pseudomonas* türlerinden (KWI-56) elde edilen 200 ünite lipazın boya giderme çözeltilisine eklenmesi ile atık mürekkep lekelerinin 18 cm' den 7 cm' ye indirdiği ve kâğıdın beyazlaşma oranının % 56,5' den % 58' e çıktığını bildirilmiştir [27].

Kozmetik ve parfüm endüstrisinde; kozmetikte parfümlerde ve sabunlarda uçucu esterlerin hazırlanmasında lipazlar yaygın olarak kullanılmaktadır [47]. Transesterifikasyon ile rasemik ara ürünlerin ayrıştırılmasında ve kokuların üretiminde lipazlardan yararlanılmaktadır. *Pseudomonas cepaci'* dan elde edilen lipaz, sitronelolün bromometoksilasyonu ile oluşturulan rasemik gül oksitlerinin ayrıştırılmasında kullanılmaktadır [48].

Gıda endüstrisinde, katı ve sıvı yağlar daha yüksek besin değeri elde etmek için fiziksel özelliklerinin değiştirilmesinde ve ekmek ve peynirde iyi tat ve kokunun geliştirilmesinde kullanılmaktadır [46]. Ekmek sanayinde kullanımında hamurun işlenebilirliğinde kolaylık, hamur stabilitesinde artış, ekmek içi yumuşaklık, ekmek

hacminde artış sağlamaktadır [22]. Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, okolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margarinler, fırın ürünleri ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır [22]. Lipazlar peynir, tereyağı, sos ve çorba gibi birçok ürünün üretiminde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Peynir tadının oluşturulması ve olgunlaştırmanın hızlandırılması ve işlenmiş mavi peynirde tadın iyileştirilmesi işlemleri lipaz ile gerçekleştirilmektedir [45].

Bunlara ek olarak, lipaz enziminin ilaç endüstrisinde, yüksek enantio seçiciliğı ile önemli bir etken olarak tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Örneğın, BTL2 1-feniletıl asetat hidroliz ve 1-fenil-etanol ve vinil asetat ile 1-fenilpropanolün açılasyonu gerçekleştirirken iyi enantio seçicilik göstermektedir [46].

Lipazlar tarafından sentezlen dimetil tereftalat, vinil asetat, bütıl akrılátın polimerleri plastiklerde, kaplamalarda, yapıştırıcılarda ve laminatlarda kullanılmaktadır. Diizodesil fitalat ve ditridesil fitalat boyalarda, cilalarda ve kaplamalarda kullanılmaktadır [47].

Kimyasal tarım madde endüstrisinde, pestisitler, insektisitler ve kimyasal tarım ürünlerinde yararlı diğerk bileşiklerin üretimindeki ara ürünlerin sentezinde lipazlar kullanılmaktadır [16].

Medikal alanda da lipaz enzimi hyaluronidaz ve thiomukaz enzimleri ile birlikte deri iltihaplanmasını önlemede kullanılmaktadır. Kolesterol seviyesini düşüren lovastatin üretiminde *Candida rugosa* lipazı kullanılır. *S. marcescens* lipazı, diltiazem hydrochloride sentezinde kullanılan ara bileşik olan 3-fenilglisidik asitin ester hidroliz reaksiyonunu katalizler [27].

Bakteriyel immobilize lipazlar biyosensör olarak kullanılmaktadır. Bu tür biyosensörler, klinik örnekler ve gıdalardaki trigliseridleri belirlemek için, pestisit kontaminasyonu gibi kirlilik analizlerinde ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır [16,49].

2.2.7 Lipazların Kaynakları

Lipazlar çok sayıda bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi kaynaklarda yaygın bir dağılım göstermekte ve bunlardan ekstrasyon yoluyla elde edilmektedir [27]. Ökaryotlarda, lipazlar yağ sindirimi, emilimi, sulandırma ve lipoprotein metabolizması dahil olmak üzere lipid metabolizmasının çeşitli aşamalarına katılır [21]. Mikroorganizma kaynaklı lipazlar bakteri, küf ve mayalardan elde edilmektedir. Bitkisel kaynaklı lipazlar daha çok özellikle yağlı tohumlarda az miktarda tahıllarda ve fasulyelerde bulunmaktadır [21, 26, 50]. Hayvansal lipazlar arasında; bazı memeli pankreatik lipazları, memeli gastrik ve pregastrik lipazları, ruminantların mide içinde üretilen dilsel lipazlar, balıkların ve omurgalıların sindirim lipazları, lipoprotein lipazlar, doku lipazları ve süt lipazları bulunmaktadır [50]. Hayvansal kaynaklı lipazlar arasında üzerinde en çok araştırma yapılan ve en iyi bilinen lipolitik enzim pankreatik lipazdır [51]. Mikrobiyal enzimler bitki ve hayvanlardan izole edilen enzimlerden daha çok kullanışlıdır. Bu durum, mikroorganizmaların kolay üretilibilmeleri ve genetik olarak modifiye edilebilmeleriyle ilişkilendirilmektedir. Mikrobiyal lipazların yüksek biyoteknolojik potansiyelleri; organik çözücülerde kararlı olmaları, kofaktöre gereksinim duymamaları, geniş substrat spesifitesine sahip olmaları ve yüksek enantiyoselektivite göstermelerinden kaynaklanmaktadır [40]. Bunlara ek olarak, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları gibi sebepler tercih edilebilirliğini artırmaktadır [22, 27]. Mikrobiyal kaynaklı lipazlardan en çok bakteriyel ve fungal orjinli lipazlar, biyoteknolojik uygulamalarda ve organik kimyada yaygın olarak kullanılan enzim sınıfı olarak tanımlanmaktadır [18]. Biyoteknolojik alanda kullanılan pek çok lipaz geni klonlanmış ve ticari olarak kullanılmıştır [23]. Günümüzde genel lipaz üreticilerinin faydalandığı 38 farklı bakteriyel kaynak vardır [18].

Bakteriyel lipazlar ilk olarak 1901 yılında *Serratia marescens* ve *Pseudomonas auroginosa* türlerinde gözlemlenmiştir [27]. Son yıllarda bakteriyel lipazların başarılı bir şekilde kullanılması ile lipaz kaynaklı birçok ürün pazara girmiştir [18].

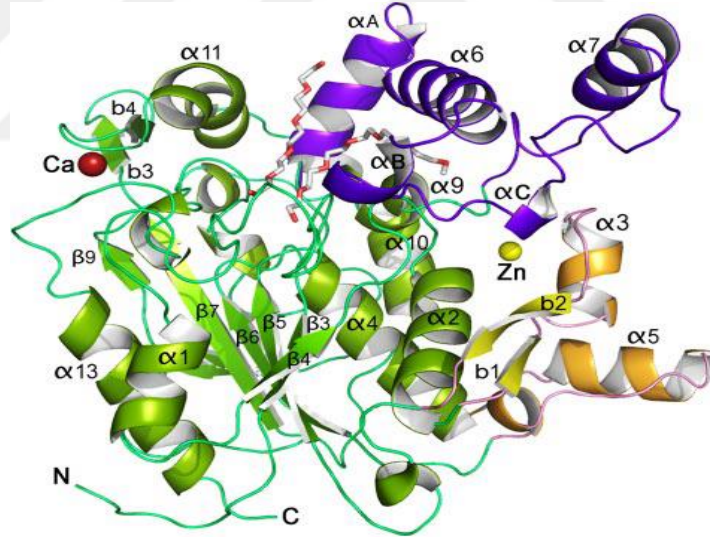
2.3 *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Bacillus cinsi bakteriler 1 ile 10 mm boyutları arasında değişen "Gram pozitif" bakteriler olarak tanımlanırlar [52]. Bu bakteri cinsi düz, çubuk şeklinde, aerobik ve fakültatif anaerob, endospor oluşturan mikroorganizmalar olarak ifade edilir [53]. *Bacillus*'ların genellikle 30- 40 °C' de ve pH 7 civarında ürediği, termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunmaktadır [54]. Bazı *Bacillus*'ların ise ekstrem şartlarda (üre içeren, uç pH değeri olan, asitli veya aşırı tuzluluk, yüksek sıcaklık gibi) büyüebilme kapasitesinde çeşitli ortamlara uyum sağlayan türleri bulunmaktadır. Sahip oldukları metabolik çeşitlilik *Bacillus*' ları enzim, antibiyotik, çeşitli biyokimyasal maddeler ve insektisitlerin üretiminde tercih edilen, bakteriler dünyasında dikkat çeken ve üzerinde geniş çalışmaların yapıldığı mikroorganizmalar olarak bilinmesine olanak sağlamaktadır [55, 56]. Endüstriyel enzim üretiminde önemli biyolojik kaynaklar olan, *Bacillus*' lar tarafından üretilen ve ticari öneme sahip birçok protein endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak yararlanılan *Bacillus* türleri, kolay ve yüksek hızda üreme, farklı karbon ve nitrojen kaynaklarını, geniş çeşitlilikte substratları kullanabilme, yüksek verimde ürün oluşturma ve ekonomik üretim kapasitesine sahip olma gibi yetenekleri sayesinde birçok alanda tercih edilmektedir. Genetikleri, biyokimyaları ve fermentasyon özellikleri hakkında biriken bilgilerden soy geliştirme çalışmaları için yararlanılmaktadır [56]. Buna ilaveten *Bacillus* türlerinin kolay büyümeleri, güvenli olmaları ve litre başına gramlarla ifade edilen miktarda proteini büyüdükleri ortama salgılayabilmeleri onların aynı zamanda gen ekspresyon çalışmalarında heterog protein üretimi için kullanılmalarına olanak sağlar [18, 56].

Bacillus türlerinden lipaz üretebilen bazı mikroorganizmalar şunlardır; *B. subtilis*, *Bacillus sp.*, *Bacillus sp.* IHI-91, *B. alcalophilus*, *B. megaterium*, *B. laterosporus*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. thermocatenulatus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. atrophaeus*, *B. sphaericus*, *B. thaiminolyticus*, *Bacillus sp.* RS-12, *B. thermoleovorans* ID-I, *B. strain* WAI28A5, *B. coagulans* [16, 18, 21].

2.4 *Bacillus thermocatenulatus* Lipazı 2 (BTL2 Lipazı)

Termofil *G.thermocatenulatus* (*Bacillus thermocatenulatus*) organizması tarafından farklı boyutlarda üretilen iki lipaz (BTL1 ve BTL2) bulunmaktadır [57, 58]. *Bacillus thermocatenulatus* ve *Bacillus stearothermophilus* P1(BPS)' nin 16S rRNA sekansları sonucunda % 98-99 benzerlikle *Bacillus* soylarının 5.grubu içerisinde sınıflandırılmaktadır [59]. Her iki bakterinin yaklaşık 43 kDa moleküler ağırlığa sahip lipaz ürettiği ve amino asit dizileri arasında % 95 benzerlik vardır [60]. *B. thermocatenulatus* (BTL2) lipazı ilk olarak 1996 yılında, *Escherichia coli* sentezleme sistemi kullanılarak karakterize edilmiştir [61]. Aynı zamanda BTL2 *Escherichia coli*' nin yanı sıra *Pichia pastoris*' de de işlevsel olarak ifade edilmiştir [62]. BTL2 lipaz yapısı ilk olarak Carrasco-Lopez ve ark. (2009) tarafından rapor edilmiştir Burada, aktif bölgesine Triton deterjanın iki molekülü ile açık bir konformasyonda BTL2 nin kristal yapısı sunulmuştur [37] (Şekil 2.4a).

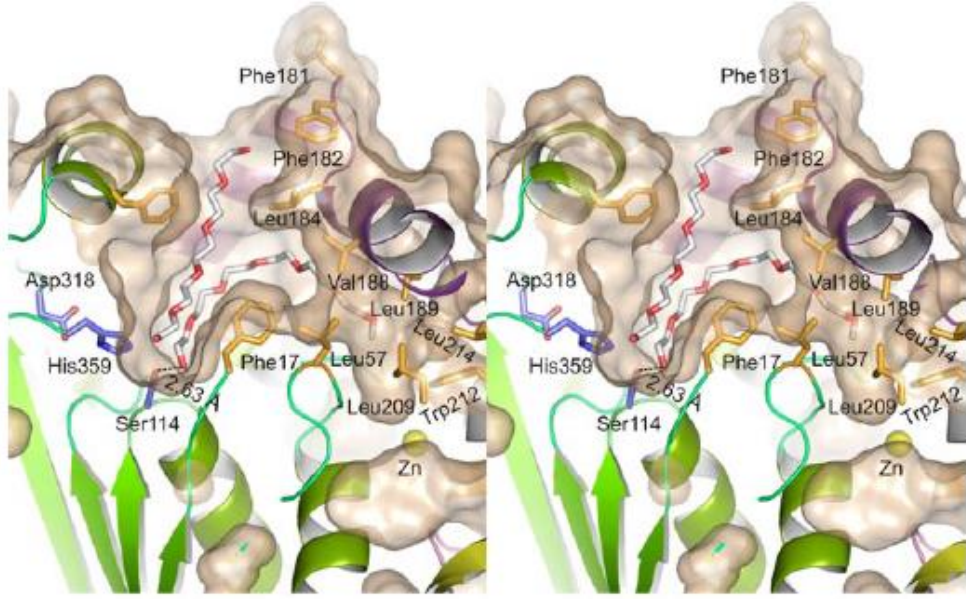


Şekil 2.4a BTL2' nin renklendirilmiş etiketli açık konformasyon yapısı.

(α/β) hidrolaz çekirdek yeşil, 169-239 rezidüden oluşan kapak alanı mor, çinko iyonu alanı sarı, kalsiyum iyonu koyu kırmızı ve aktif bölgede Triton X-100 iki deterjan molekülü çubuk şeklinde gösterilmiştir [37].

BTL2' nin üç boyutlu yapısının 389 rezidüden oluştuğu ve α -heliksler ($\alpha 1$ ve $\alpha 13$ bir tarafta $\alpha 2$, diğer tarafta $\alpha 4$ ve $\alpha 10$) ile çevrili, yedi beta-tabaka ($\beta 3$ - $\beta 9$) içeren bir merkezden oluşan α/β hidrolaz katlama özelliği gösterdiği belirtilmiştir [37]. Ayrıca daha önce başka bir çalışmada belirtildiği gibi b1 ile b2 şeritleri ve $\alpha 3$ ile $\alpha 5$ helikslerini içeren lipazlarda var olan Zn^{+2} koordinasyonda ekstra bir yapı ihtiva etmektedir [63]. Zn^{+2} koordinasyon bağları (α/β) hidrolaz çekirdek alanından His-82 ve ekstra etki His-88 (sırasıyla 2.29 Å ve 2.21 Å) ve Asp-62 (2.11 Å ve 2.96 Å) ve Asp-239 (2.13 Å ve 2.71 Å) ile oluşturulmaktadır. Ayrıca b4 ile $\alpha 11$ ve $\beta 9$ ile $\alpha 13$ arasında oluşan bölgeler hidrojen bağı oluşturmak için bulunduğu ifade edilmiştir (Şekil 2.4.a). Koordinasyon Gly-287 (2.61 Å) ve Pro-367 (2.58 Å)' nin iki ana zincir karbonil oksijen atomları ile Glu-361 (2.96 Å) ve Asp-366 (2.89 Å)' in karboksil oksijen atomları ile etkileşimleri bulunmaktadır. BTL2 aktif bölgesine yerleştirilmiş olan iki Triton X-100 deterjan molekülleri ile açık konformasyon yapısı çözülmüştür [63]. Kristal yapısında her bir iyonu dört kalıntıdan oluşan iki farklı iyon olan çinko ve kalsiyum (Ca^{2+} iyon için Glu-361, Asp-366, Gly-287, Pro-367 iken Zn^{2+} iyonu için His-82, His-88, Asp-65, Asp-239) bulunmaktadır [37].

Thermoalkalofilik lipazların karakteristik özelliği, katalitik aktivitesini katalitik üçlü ve bir oksianyon oyuktan oluşmasıdır. Bu katalitik üçlü genellikle Ser-His-Asp' tir. Bu üçlü aminoasit grubunun BTL2 için Ser-114, His-359, Asp-318 olarak tespit edilmiştir. BTL2 nin katalitik mekanizmasının Phe-17 ve Gln-115' in azot atomu omurgası ile oluşturulan bir oksianyon oyuk ile tamamlandığı ve oksianyon oyukun α/β hidrolaz katlanma içinde çok iyi korunduğu ifade edilmiştir [37].

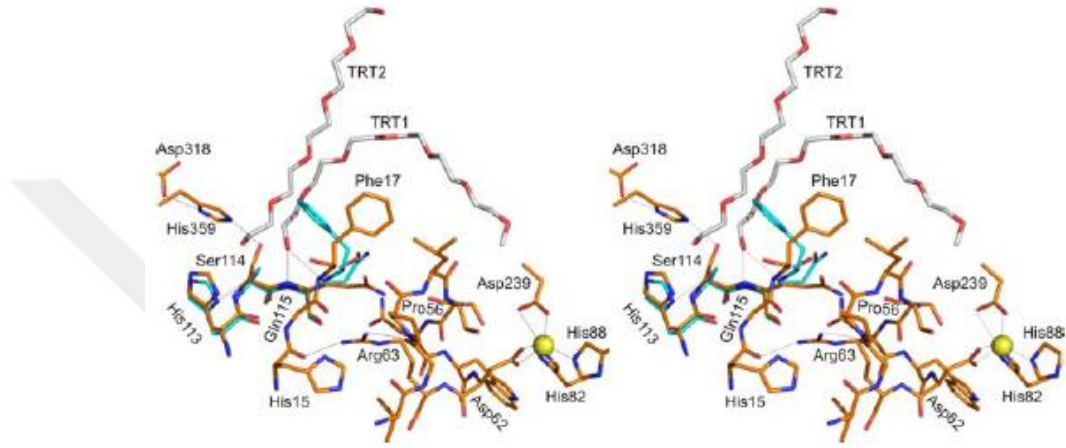


Şekil 2.4b BTL2' nin aktif bölgesi.

Katalitik çatlak stereo görünümü Triton X-100 iki zincir beyaz sopa ile, katalitik üçlü (Ser-114, His-359, ve Asp-318) mavi renkle, hidrofobik oluk astar artıkları sarı çubuk şeklinde çizilmiştir [37].

Katalitik serin substrat bağlanması için önemli bir aminoasittir ve lipazların çoğunda Gly-X-Ser-X-Giy motifine sahip olmasına rağmen, thermoalkalofilik lipazlar ve BTL2 katalitik serin etrafında Ala-X-SerX-Giy motif özelliği gösterir [64]. BTL2' ye benzerlik gösteren L1 lipazının kristal yapısı, kapalı durumda iken belirlenmiş ve katalitik serinin, lipaz termokararlılığına katkı sağlayan ve serin lobunun stabilizasyonu ile sonuçlanan aktif bölgenin (His-113, Phe-17, Ile-320, Thr-270 ve Met-326 gibi) bazı aminoasit yan gruplarıyla sıkı yan zincir paketlenme içinde gösterilmiştir. Bu konumda, katalitik serin doludur ve çözücüye maruz değildir [63]. Ayrıca BTL2' nin kristal yapısı açık durumda tespit edilmiştir ve Şekil 2.4c'de gösterildiği gibi katalitik serin, Phe-17 hariç sıkı bir ambalaj yapı gösterdiği belirtilmiştir. Bu aminoasitin subtrata O γ grubunu yönlendiren şeklini değiştiren, katalitik serine substratın erişimini sağlayan şeklini değiştirdiği belirtilir. Phe-17 nin hareketi kapalı durumdan açık duruma $\times 1$ yan zincir torsiyon açısında ($\Delta x1 = 100^\circ$) bir değişiklik içerdiği ifade edilir. Aynı zamanda katalitik serinin kapalı formdan açık forma konformer değişikliği hidrojen bağlayıcı modelinin

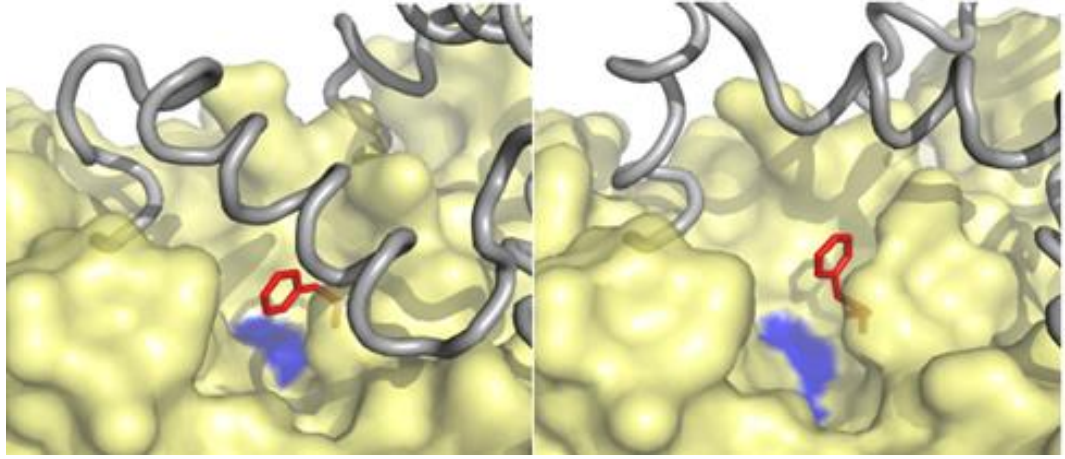
değişikliklerini içerir. Kapalı durumda, serin yan zinciri O γ atomu noktaları katalitik histidin atomdan ve His-113 atom (2.89 Å) ve 3.36Å'dir. Ancak, aktif durumda, serin yan zincir O γ atom His-113 N δ 1 atomundan katalitik histidine Ne2 atom ve 5.08 Å' den 2.96 Å dır. Katalitik kalıntıları His-359 (N δ 11 atom) ve Asp-318 (O δ 2) arasındaki hidrojen bağlarında kapalı ve açık durumlarda (sırasıyla 2.68 ve 2.81 Å)' da herhangi bir değişiklik gözlenmez (Şekil 2.4c).



Şekil 2.4c BTL2' nin aktif bölgesini gösteren çubuk yapısı.

*Katalitik bölge ve oksianyon stabilizasyona katılan BTL2 kalıntıları turuncu renkle; Kapalı yapısı (*B. stearothermophilus* L1 lipaz) ile temel farklar mavi renkle; Zn⁺² katyon koordine rezidüleri de sarı (sarı küre) renkl; kesik çizgiler ise ana etkileşimleri gösterilmektedir [37] .*

Phe-17' nin O γ grubu (\times 1 yan zinciri için 100° açısını burma) döndürülebilir ve substrat bağlanması için katalitik serin alanı lipaz kapak ara yüzey aktivasyonu ile açıldığında katalitik serinin çözücüye maruz kalarak ve substrat bağlama için uygun hale geldiği gösterilmiştir [37] (Şekil 2.4d).



Şekil 2.4d BTL2' nin açık ve kapalı lid yapısı.

Kırmızı çubukla Phe1' nin OY grubunun 100 derece dönebildiği ve mavi yüzeyde katalitik serin bölgesi gösterilmiştir [37].

Oksianyon delik tarafından stabilize edilen tetrahedral ara bağ oluşumu ile lipit parçalanma reaksiyonu sürdürülür. Bakteriye lipazların I.1 ve I.2 ailesinde tetrahedral arada oluşan oksianyon, aynı pozisyona sahip aminoasit (I.1 ailesinde Met-16 ve His-83 iken, I.2 ailesinde Leu-17 ve Gln-88) ana zincir amid grupları ile stabilize edilir. BTL2 de ise, eşdeğer atomları hemen hemen aynı konumları işgal eden Phe-17 ve Gln-115 bulunmaktadır. Phe-17 ve Gln-115 omurgası azot atomları α/β hidrolaz katı enzimler içinde çok iyi muhafaza edilen bir pozisyonda oksianyon-bağlama cebine lokalize olmuştur. BTL2' de, Phe17 ve Gln115 omurgası azot atomu oksianyon deliğini oluştururlar. Phe17, I.5 bakteriye lipazlar ailesi içinde korunmuş $\beta 3$ iplikleri ile ve $\alpha 4$ sarmal arasında bulunan Gly-Phe/Leu / Ile-X-Gly tetrapeptidinde ikinci bir motif olarak yer almaktadır. Ayrıca bakteriye lipazların I.1 ve I.2 ailesinde, korunmuş ve gömülü Arg-63 kalıntı oksianyon deliği kararlılığını artıran ve açılış sırasında kapağın istikrarı destekleyen $\beta 3$ iplikçik ve $\alpha 2$ sarmal arasındaki döngü oksianyon delik bağlandığı belirtilmiştir [65]. Aynı zamanda bir arginin artığı, His-15' i Gly-55' e bağlayan BTL2 (Arg-63)' nin eşdeğer pozisyonlarda bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 2.4c). Bu bağlantı His-15 için; karbonil, oksijen atomu ve Arg-63 NH2 atomu arasında bir hidrojen bağı yoluyla, Gly-55 için; karbonil oksijen atomu ve Arg-63 NH1 atomu yoluyla

gerçekleştiği ifade edilmiştir. L1 lipazının kapalı formu ile karşılaştırıldığında BTL2' de bulunan önceden oluşturulmuş oksianyon oyuğu ile uyum içinde, bu Arg yan zincirinin hidrojen bağlayıcı modelinde farklılıkların olmadığı ortaya koymaktadır. Arg-63 doğrudan Zn^{+2} koordinasyon katılır sonra Asp-62 yerleştirilir. Bu nedenle, bakteriyel lipazların I.5 ailesinde, Arg-63 oksianyon bağlayıcı cebinde dengeleyici bir rol oynayabilir. Lipazların bu ailenin karakteristik özelliği olan Zn^{+2} -bağlayıcı etki ile takviye edilmesi gereken bir görevi olduğu belirtilir [37].

2.5 *Bacillus pumilus* Lipazı

Bacillus pumilus lipazları % 74-77 sekans dizi benzerliği gösteren I.4 alt familya üyesi olarak sınıflandırılmıştır [31, 66]. I.4 alt familyası içinde yaklaşık % 80 amimo asit sekans benzerliği gösteren *Bacillus pumilus* dahil, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis* ve en iyi karakterize edilen lipolitik enzim olan lipaz A' yı üreten *B. subtilis* yer alır [67, 68].

I.4 Alt familya lipazlar en az α/β hidrolaz katlanması ihtiva eden ve aktif bölgesinde kapak yapısının olmaması nedeniyle çözücüye maruz kalan substrat bağlanma bölgesine sahip bilinen en küçük lipazlar olduğu bildirilmiştir [41]. Alt familya I.4 lipazları 181 aminoasit kalıntılara sahip ve tüm lipazlar arasında yaklaşık 19 kDa moleküler ağırlığı ile en küçük proteinlerin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca alkali pH ve substrat olarak kısa zincirli trigliseritlere ilgi gösterirler. Yüksek sekans kimliği bütün alt familyası için ortak bir katlanma ifade eder. Bu nedenle bu üyelerden birinde yeniden üretilen alt ailesinin bir üyesinde mutasyon etkileri gözlenebildiği ifade edilir [67].

Bacillus pumilus ve *Bacillus subtilis* suşları (GRAS) genel olarak güvenli kabul edilen mikroorganizmalardır. Bu nedenle, gıda ve hammadde sanayi gibi çeşitli sektörlerde, bu mikroorganizma lipazlarının kullanımı ile ilgili herhangi bir kısıtlama yoktur [69].

2.6 İmmobilizasyon

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması mümkün değildir. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun

kontrolü güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak bununla da serbest enzimin yanında yeni bir kirlilik unsuru oluşacaktır. Ürünlerin kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok artırmaktadır. Ayrıca serbest enzimin aktivitesini yitirmeden ortamdan alabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılabilmesi de söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmalarına neden olmakta, endüstriyel üretimde de maliyeti yükselten en önemli etken olmaktadır [2].

İmmobilizasyon, enzimin suda çözünebilir hareketli fazdan, suda çözünmeyen faza dönüştürülmesi olarak tanımlanır [70]. İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, “tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, kımıldatmamak” anlamına gelen çözünmez bir hale gelmesi demektir [2, 71].

Enzim immobilizasyonu terimi, enzimlerin kinetik özelliklerini kaybetmeden fiziksel olarak belirli bir yere yerleştirilmesi veya hapsedilmesinin yanında katalitik aktivitelerinin de korunması ile birlikte tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olmasını sağlamak anlamına gelir [72, 73]. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla veya suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllere tutuklamayla immobilize edilirler [2]. İmmobilizasyon teriminin sadece enzimlere değil biyolojik olarak aktif maddeler olan hücresel organeller, mikrobiyal hücreler, bitki ve hayvan hücreleri gibi tüm biyokatalizör tiplerine de uygun olduğu kaydedilmiştir [74].

Enzim immobilizasyonunun ardındaki temel prensip, enzim proteinin ve enzimin geçişini engelleyecek, fakat substrat ürün ve kofaktörlerin geçmesine izin verecek bir yarı geçirgen destek materyaline enzimin hapsedilmesidir [75].

İmmobilize enzimler genel olarak endüstriyel uygulamalarda katalitik özelliklerinin yanında, ekonomik olarak da geliştirilmiş olmasının son derece önemli bir faydasıdır [76] İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel kullanımı 1967 yılında Chibata ve

arkadaşları tarafından sentetik rasemik DL aminoasitlerin çözümü için *Aspergillus oryzae*’ den elde edilen aminoasilaz immobilizasyonudur [77].

İmmobilize enzimlerin önemli uygulama alanı şekerler, amino asitler ve ilaçların endüstriyel üretilmesidir [78]. Endüstriyel olarak uygulamalarından başka, biyoafinite kromatografisi, biyosensörler ve tıpta kullanılan ilaçlardaki pek çok biyoteknolojik ürünlere enzim immobilizasyonunun temel teşkil ettiği görülmektedir [79]. Son yıllarda immobilizasyon teknolojisi hızla gelişmekte ve giderek rasyonel tasarım konusu haline gelmekte ve daha da geliştirilmesi için ihtiyaç olduğu görülmektedir [80].

2.6.1 İmmobilize Enzimin Özellikleri

İmmobilize enzimler serbest enzimlerin dezavantajlarını ortadan kaldırarak daha kararlı olmalarına olanak sağlar [81]. Saflaştırılan enzimlerden en yüksek oranda faydalanmak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir [2]. Enzimlerin kararlılığını geliştirme ve kullanım ömrünü artırmak, sürekli kullanımını sağlamaktadır [82]. İmmobilizasyon prosesinin en önemli avantajı, enzimin katalizlediği reaksiyon ürünlerinden kolayca ayrılabilmesinin yanı sıra enzim preparatlarının rahat kullanımınıdır [81]. Üründen enzimin kolay ayrılması enzim uygulamaları kolaylaştırarak güvenilir ve verimli bir reaksiyon teknolojisini destekler. Enzimler genellikle çözünür yapıya sahiptir. Bu nedenle, pahalı ayırma işlemi olmadığında enzimler sadece bir kez kullanılabilir. Buna ilaveten, ilk etapta enzim katalizli bir işlem oluşturulması için yeniden enzimin üretilme ihtiyacını ortadan kaldırarak maliyet avantajı sağlamaktadır [83].

Geliştirilen farklı immobilizasyon yöntemlerinin uygulanması sayesinde enzimlerin kararlılıkları ve tekrar kullanılabilirliklerinin artırılması, sürekli sistem çalışmalarına uygulanabilir olması, işlemin kısa süresiyle işletim maliyetinin azaltılmış olması ve ürünlerin saflık derecesi artırılabilmesi mümkün hale gelmektedir [84]. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım ve elde edilen ürünün ortamdan kolayca uzaklaştırılma avantajı sayesinde, geliştirilen kullanıma uygun ve ucuz immobilizasyon teknikleri ile enzimlerin endüstriyel kullanımına büyük fayda sağlamaktadır. İmmobilize enzimler, saf ürün eldesi, kullanım kararlılığı ve termal stabilite gibi üstünlükleri sayesinde

biyokimya, biyoteknoloji, biyotıp ve gıda endüstrisi gibi alanlarda serbest enzimlere tercih edilmektedir.

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere olan diğer bazı özellikler aşağıda sıralanmıştır.

- Sıcaklık, pH vb. çevre şartlarına karşı dayanıklıdırlar,
- Serbest enzimlere kıyasla daha kararlıdırlar,
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir,
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir,
- Birbirini takip eden çok basamaklı reaksiyonlar için kullanılabilir,
- Enzimin kendi kendini parçalayabilme olasılığı azalır,
- Süzme, santrifüjleme vb. işlemlerle reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılması sayesinde ürünlerin enzim tarafından kirletilme problemi ortadan kalkar,
- İmmobilize enzimler substrat ve ürün inhibisyonuna karşı koyarak enzim aktivitesinin uzun süre korunmasını sağlarlar,
- Reaksiyon kontrolünün mümkün olması,
- Sürekli ve kesikli sistemlere uygulanabilir olması,
- Ekonomik olması,
- Yüksek saflık,
- Endüstriyel boyutta önemli bir ekonomi sağlar; üretim kaybının azalması,
- Otomatik işlemlere imkân vermesi,
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite göstermesi,
- Reaktör seçimi, tasarım kolaylığı sağlaması şeklinde ifade edilir [2, 72, 85,86].

İmmobilize enzimlerin bu avantajlarının yanı sıra aşağıda belirtildiği gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır.

- İmmobilizasyon enzim yapısında ve aktif bölgesinde değişimlere neden olabilir ve böylece enzim aktivitesinde azalmalar meydana gelebilir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.

- Enzim desteklerinin maliyeti yüksektir.
- İmmobilize enzimin optimum pH' sı değişebilir.
- Enzimin Km değeri immobilizasyondan etkilenebilir
- Enzimin optimum sıcaklığında artışlar olabilir [87, 88].

Enzim saflaştırılması özel teknikler gerektirdiğinden maliyeti oldukça yüksektir. Öte yandan, serbest enzimin aktifliğini kaybetmeden istenildiği anda reaksiyon ortamından uzaklaştırılması çok zordur. Bu durum pahalı olan enzimlerin tekrar tekrar kullanılmasına engel olur. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması ise zaten enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürünlerin bu kirlilikten arıtılması için kompleks ayırma işlemlerine ihtiyaç olur, bu da maliyeti bir kat daha artırır. Yukarıda sayılan teknik ve ekonomik problemler den dolayı serbest enzim yerine immobilize enzim kullanılmasının daha uygun olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla immobilize enzim sistemlerinin hazırlanması ve pek çok teknolojiye kullanımı son zamanlarda büyük önem kazanmıştır [89].

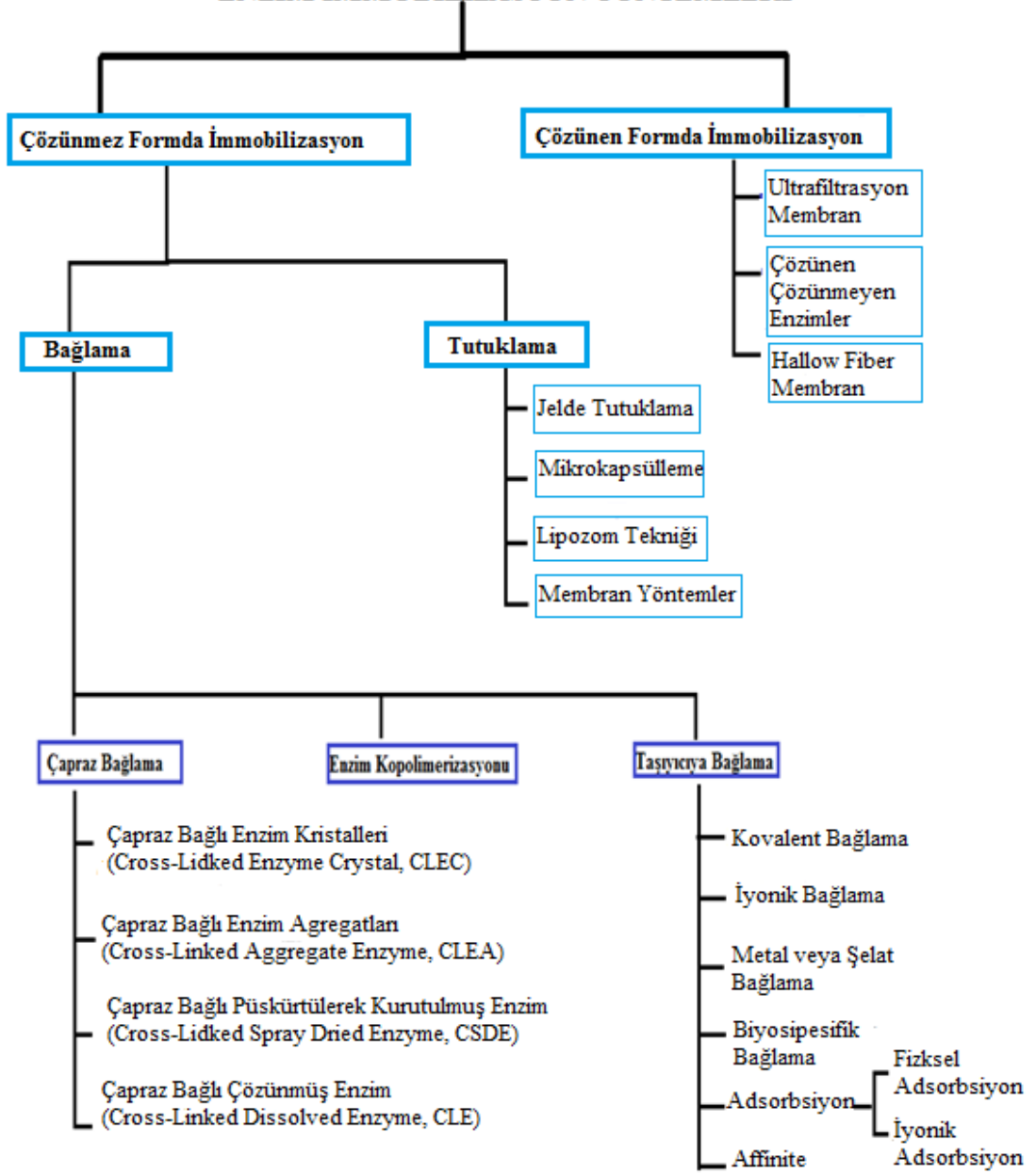
2.6.2 İmmobilizasyon Yöntemleri ve Seçimi

Enzimin immobilizasyonu için değişik yöntemler kullanılabilir. Bunların içinde enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir [87]. İmmobilizasyon işlemi sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma meydana gelirse bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunması gerekmektedir [90,91]. Bu koruma görevi bazen substrat bazen de yarışmalı inhibitör tarafından sağlanır. İmmobilizasyon yönteminin seçiminde güvenilirlik, maliyet, enzim aktivitenin korunması ve kararlılık gibi özelliklere sahip olması dikkate alınır. Enzimin immobilizasyonu için değişik yöntemler kullanılabilir. Bunların içinde enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir. [87]. İmmobilizasyonda kullanılan yöntemler immobilize enzimin kinetik

parametrelerinin etkileyebilmektedir. Bunlara ek olarak immobilizasyon yöntemi seçerken, destek materyalinin gözenek yapısı, parçacık boyutu, taşıdığı fonksiyonel grup ve morfolojisi gibi fiziksel ve kimyasal özellikler dikkate alınması gerekir [92].

Enzim immobilizasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir. Kimyasal yöntemler, enzim destek materyali üzerinde bulunan fonksiyonel gruplar arasında kovalent bağların oluşmasını sağladığı ifade edilir. Fiziksel yöntemlerde ise enzimle kovalent bağlanma gerçekleşmezken, enzimin desteğe daha zayıf bağlanması veya hapsedilmesi söz konusudur [2,92]. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler ve bunların sınıflandırılması için birçok şema hazırlanmıştır. Genel olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler Şekil 2.6.2' de gösterilmiştir.

ENZİM İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ

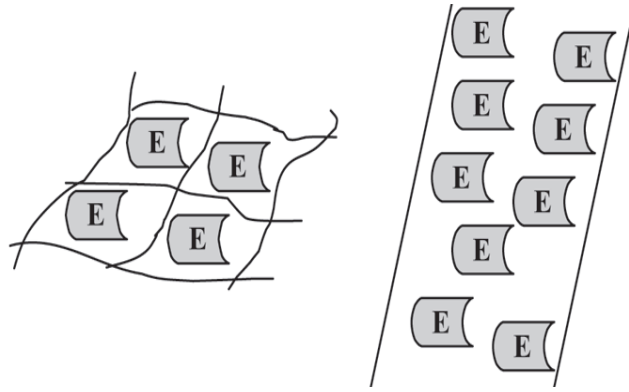


Şekil 2.6.2 Enzim immobilizasyon yöntemleri [2].

2.6.2.1 Tutuklama

Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir ortamda durmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matris içindeki kafelerde gerçekleştiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir [2] (Şekil 2.6.2a).

Tutuklama yöntemi; Kafes (polimer matrikste tutuklama), mikrokapsül, lipozom, membran ve ters misel tekniği olarak beşe ayrılmaktadır.



Şekil 2.6.2a Tutuklama yöntemi ile enzim immobilizasyonu [93].

2.6.2.1.1 Polimer Matrikse Tutuklama Yöntemi

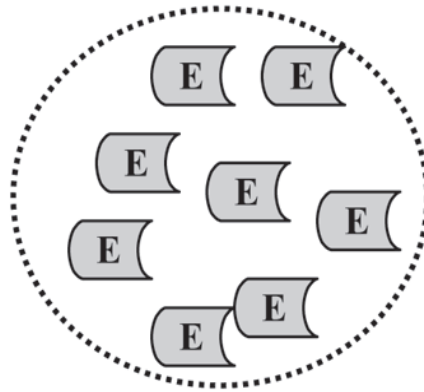
Bu yöntemde enzim çözeltisi içinde yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin oluşturulması ve polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında (kafes, odacıklarda) tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir [94]. Bu şekilde enzimler, organeller, hücreler ve antikorlar gibi biyomoleküller polimerin örgü yapısı içinde fiziksel olarak tutuklanmakta ve dışarı çıkması engellenmektedir. Bu metotta enzim molekülünün jel matrigisine veya membrana fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmayışı diğer fiziksel tutuklama yöntemlerinde olduğu gibi herhangi bir kimyasal değişme meydana gelmediğinden aktivite kaybı olmaması yöntemin en büyük avantajıdır. Ancak substrat ve ürünün serbest olarak geçmesi için yalnızca düşük molekül ağırlıklı substratların kullanılması ve çapraz bağlı polimer örgüsü arasından enzimin sızma ihtimali ve substratın polimer kılıfı geçerek polimerin boşluklarına yerleşmiş enzim molekülüne ulaşmasındaki güçlük yöntemin dezavantajıdır. Buna ilaveten yöntemde substrat ve ürünün difüzyonuna izin verilirken protein difüzyonu engellendiği için polimer matrigisinin sıkı yapıda olması gerekir [2,71].

Bu amaçla en çok kullanılan polimerler N,Nmetilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamid ve Ca-aljinat, agar gibi polimerler matrigis olarak kullanılır. Ayrıca

polivinilalkol gibi bazı sentetik polimerler ve nişasta gibi doğal polimerler, bu teknikle enzim hapsedme işlemi için immobilize enzim hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar [95].

2.6.2.1.2 Mikrokapsülleme (Membranda Tutuklama)

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanmaktadır. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek ancak hapsedilmiş enzimin giriş çıkışına izin vermeyecek büyüklükte olması gerekmektedir. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde ise bir sıvı tabaka olduğu belirtilir. Immobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması gerekir [2, 96] (Şekil 2.6.2b). Bu yöntemin oldukça küçük bir hacimde enzim ile substratın etkileşme alanının yüksek olması, az miktarda enzim kullanılması en büyük avantajı iken, yöntemin uygulanması sırasında enzim inaktive olabilmesi, mekanik dayanıklılığının az olması ve enzimin zarın içinden kaçma olasılığının fazla olması yöntemim dezavantajlarından olduğu belirtilir [2].



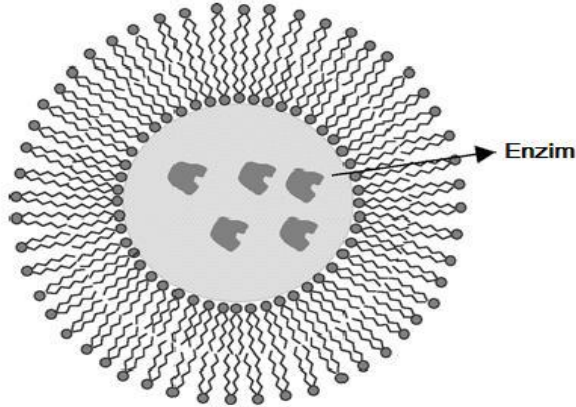
Şekil 2.6.2b Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu [93].

Enzimlerin mikrokapsüllemesi için iki yöntem kullanılır. Bunlar faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyonudur. Faz ayrımı yönteminde, enzim ve mikrokapsülü oluşturan

çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. Ara yüzey polimerizasyonun da ise enzimin sudaki çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiyedir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsülendirilmiş olur [97].

Mikrokapsülasyon ile enzim immobilizasyonu, sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikro kapsüllerde tutuklama olarak iki grupta incelenebilir. Sürekli mikro kapsüllerde çerçeve membran katı, sürekli olmayan mikro kapsüllerde ise (lipozom) sıvı bir tabakadır [96].

Lipozom tipi: Lipitlerden amfipatik sıvı yüzey aktif madde membranı içine tutuklama yapılıdır. Çapı 1-100 µm arasında değişen enzim çözeltisi damlacıklarını içeren hidrokarbon çözücünün; çeşitli katkı maddeleri ve yüzey yapıcılarla enzim çözeltisi damlacıkları çevresinde oluşturduğu suda çözünmeyen faza sıvı yüzey yapıcı membranlar adı verilmektedir [74, 98] (Şekil 2.6.2c).



Şekil 2.6.2c Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu [98].

Membran tipinde: Enzimin membran içerisinde immobilizasyonunda ise enzimin çok yarı geçirgen bir zarla çevrelediği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir teknik olarak nitelendirilmiştir. Yöntemde biyokatalizör, reaksiyon çözeltisinden

ultrafiltrasyon membranı, mikrofiltrasyon membranı veya hollow-fiber ile ayrılmıştır. Yarı geçirgen özellik gösteren hollow-fiber (oyuk elyaf) membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biri olduğu belirtilmiştir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün geçişine izin vermektedir [74, 99].

Ters misel tipinde: Biyokatalizör, yüzey aktif madde ile bir organik çözgenin karışımı ile oluşturulan ters miseller içinde tutuklanmıştır [74].

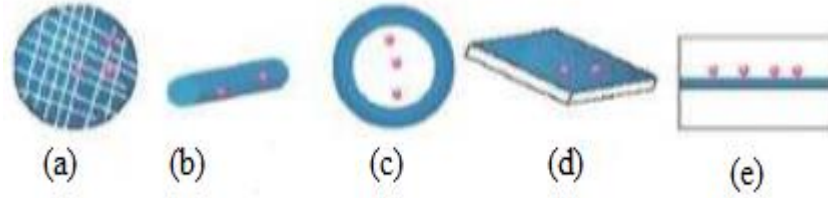
2.6.3 İmmobilize Enzimlerin Kullanım Alanları

İmmobilize enzim sistemleri son yıllarda biyomedikal alanda hastalıkların tanı ve teşhisi için, tedavi amacıyla yapay hücre ve organ yapımında kullanılmaya başlanmıştır [100,101] . Ayrıca tıp ve eczacılık gibi sağlık alanlarının yanı sıra immobilize enzim sistemleri gıda, çevre ve kimya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle enzim elektrotlarının yapımı ile analitik amaçlı kullanımı yaygınlaşmıştır. İmmobilize enzimler organik sentezler gibi çok daha spesifik alanlarda da kullanılmaktadır [101]. Gıda sanayinde, saflaştırılmış enzimler kullanılır, ancak saflaştırma sırasında enzimler denatüre olması nedeniyle, immobilizasyon tekniği enzimleri kararlı hale getirdiği için immobilize enzim kullanımı tercih edilmektedir. Biyodizel üretiminde adsorbsiyon, çapraz bağlama, tutuklama gibi immobilizasyon tekniğiyle elde edilen immobilize lipaz enzimleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İmmobilize enzimler, kağıt, tekstil, deri gibi endüstriyel ürünlerin üretim sonucunda su kirliliğine neden olan, atık suların arıtma yöntemlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde temizleme, biyo parlatma, tabaklama gibi işlemler ve deterjan endüstrisinde yaygın bir şekilde immobilize enzimler kullanılmaktadır [100].

2.6.4 İmmobilizasyon Destek Materyalleri

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Destek materyel bir membran, suda çözünür bir katı ya da polimer bir matriks olabilir [102]. Enzim immobilizasyonunda farklı teknikler, birçok farklı destek

materyali türleri (boncuklar, lifler, membranlar, filmler ve kapsüller) kullanılarak yapılabilmektedir [103] (Şekil 2.6.4).



Şekil 2.6.4 İmmobilizasyonda kullanılan farklı destek materyal türleri.

a) Boncuk (küre), b) Lif, c) Kapsül, d) Film, e) Membran [103].

Organik destekler doğal polimerler, proteinler, aktif karbon ve sentetik polimerler olarak sınıflandırılır. Doğal polimerler olan ve enzim immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit türevlerinin en büyük avantajı hidroksil gruplarına sahip olmalarıdır. Destek materyaldeki bu hidroksil grupları enzimlerin elektrofilik grupları ile etkileşerek enzim immobilizasyonunu sağlarlar. Buna ilaveten polisakkarit desteklerinin zayıf nükleofilik özellikleri ile aktivasyonu alifatik veya aromatik, karboksil veya tiyol grupları kullanılarak gerçekleştirilebilir [104,105]. Sentetik polimerler fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak çok kullanılırlar. Sentetik polimerler mikroorganizmaların saldırılarına karşı dirençlidirler ve saflıklarını korurlar [104]. Kullanılan destek materyalleri Çizelge 2.6.4' de listelenmiştir.

Çizelge 2.6.4 Enzim immobilizasyonunda kullanılan destekler [105].

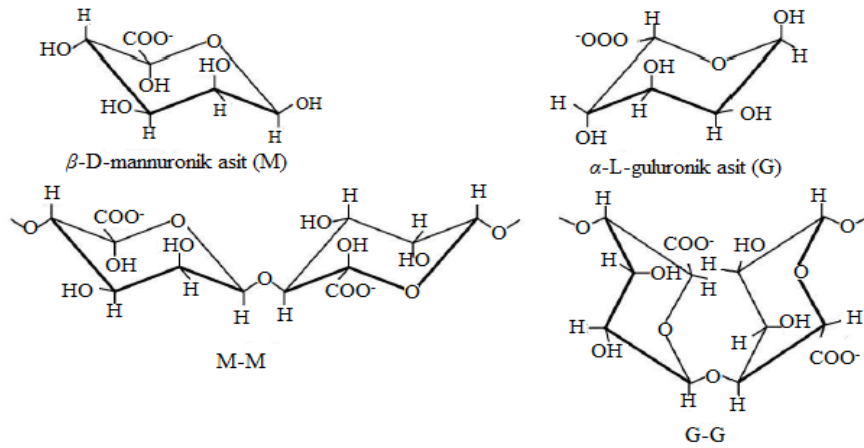
Organik Destekler	İnorganik Destekler
Doğal Polimerler	Doğal Minareller:
Polisakkaritler: Selüloz, Nişasta, Dekstranlar Agar, Agaroz(Sefaroz), Aljinat, Kitin, pektin	Bentonit, Silika Kil, selit, zeolitler, Aktif karbon,
Protein: Kollojen, Albümin	Kömür
Diğer destekler: Jelatin, Kitosan, Karagenan İpek	İşlenmiş
Sentetik Polimerler	Malzemeler: Cam
Polisteren Türevleri:	boncuk (gözenekli ve gözeneksiz),
Diğer Polimerler: Poliakrilat, Polimetakrilatlar, Poliakrilamid, Poliamidler, Naylon, Vinil ve alil polimerler, Oksiranlar, İyon değiştirici reçineler, Maleik- anhidrit polimerleri,	Metal oksitler (ZrO ₂ ,TiO ₂ ,Al ₂ O ₃), Hidroksiapatit, Titandioksit, Zirkonyumdioksit, Nikel Oksit, Ponza taşı, Metaller,

Enzimin immobilize edileceği destek materyalin seçilmesi önem taşımaktadır. Kullanılması planlanan malzemenin parçacık büyüklüğü, yüzey alanı, desteğin kimyasal bileşimi ve içerdiği fonksiyonel gruplar göz önünde bulundurulur [106]. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan iyi bir destek materyalinin; hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli yapı, mekanik stabilite ve uygun gözenek büyüklüğü, kimyasal ve termal kararlılık, mikroorganizmalara karşı dirençlilik, rejenere olabilme, zehirsizlik, ucuzluk, geniş yüzeysel alan, yüksek tutuculuk, uygun parça büyüklüğü gibi özelliklere sahip olmalıdır [2, 102]. Bunlara ek olarak enzim destek seçiminde immobilizasyon yöntemi, substratın reaktör tipi, immobilizasyon iyonik veya kovalent bağlama ile gerçekleştirilecekse taşıyıcının fonksiyonel guruplar içermesi gibi özellikler

dikkate alınır. Yüklü taşıyıcının kullanılması, enzim optimum pH'sının 1-2 birim, Km değerinin ise 10 kata kadar değişmesine sebep olabilirler [91].

2.6.4.1 Alginat

Alginat doğada yaygın olarak kahverengi deniz alglerinde (Phaeophyceae) bulunduğu ve kuru maddesinin %40' ını oluşturduğu belirtilir. Ayrıca *Azobacter vinelandil* gibi toprak bakterileri ve bazı *Pseudomonas* türlerinde de alginata benzeyen hücre dışı polimerik maddelerin tespit edildiği belirtilir. Ticari alginatlar genellikle en fazla *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis Pyrifera* alg türlerinden elde edilir. Ayrıca *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia negrescens* ve *Sargassum* türleride algiat üreten türlerdir. Alginat, kahverengi deniz alginin intrasellüler matrikste alginik asitin Na^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} , Mg^{+2} , ve Br^{+2} iyonlarını içeren bir jel halinde bulunur. Çoğunlukla doğal alginat çözünmeyen çapraz bağlı Ca^{+2} jel şeklinde bulunur ve alg dokularındaki temel işlevi dayanıklılık ve elastikiyettir [107, 108]. Aljinik asit 1881 yılında, Stanford tarafından kahverengi su yosunlarından (İrlanda yosunu) ekstraksiyonla elde edilmiştir ve 1930' larda ilk ticari kullanımı sağlanmıştır [109]. Alginat (1-4) bağlı β -D-mannuronik (M) ve α -L-guluronik asidin (G) ünitelerinin farklı miktarlarından oluşur. Molekül olarak düz zincir yapıda dallanma göstermeyen lineer bir polisakkarit yapıda olduğu bildirilmiştir [110] (Şekil 2.6.4.1).



Şekil 2.6.4.1 Alginatın kimyasal yapısı [109].

Alginat yapısında D-mannuronik, L-guluronik asid monomerlerinin glikozidik bağ ile bağlanarak polimerik yapı oluşturur. Jel oluşturma özellikleri aljinat molekülünün kompozisyon ve sırasına bağlıdır. G bloklarının uzunluğu jel formasyonunun başlıca yapısal durumunu belirlemektedir. Aljinat yapısını oluşturan G ve M oranlarındaki değişiklik alginatın fiziksel özelliklerini de etkilemektedir. Örneğin, M içeriği fazla olan aljinatlar daha yumuşak ve elastik bir jel yapısı oluştururken, G içeriği yüksek olan aljinatlar ise daha sert ve kırılabilir bir jel yapısına sahip olmaktadır. G, M miktarları alginatın elde edildiği kaynağa göre değişiklik gösterir. Heteropolimerik (MM blokları ve GG blokları) bölgelerinden oluşmuş blok kalıplarında düzenlenir. İki değerli katyonların bağlanması ve jel oluşumu artık blokların kompozisyonlarına ve düzenlenmelerine bağlıdır. Özellikle jel dayanıklılığı G içeriği ile ilgilidir. Deniz yosunu kaynağına göre (G formu) % 20-75 arasında değişir. GG blokları arasında Ca^{2+} gibi divalent katyonlar için seçimli bağlanma bölgeleri vardır ve bağlanmış iyonlar jel oluşumuna neden olan bağlanmaları oluşturmak üzere diğer GG blokları etkileşir [111,112].

Alginik asidin en önemli özelliği düşük konsantrasyonlarda bile sodyum gibi +1 değerlikli katyonların varlığında viskoz bir çözelti oluştururken, başta kalsiyum olmak üzere baryum, alüminyum ve stronsiyum gibi +2 değerlikli katyonların varlığında ise suda çözünmeyen bir jel oluşturmasıdır [113]. Jel oluşumunun, polimer zincirindeki karboksil gruplarının kalsiyum iyonları ile iyonik köprü oluşturması şeklinde veya kalsiyum iyonlarının her polimer çiftindeki hidrotoksil ve karboksil grupları ile şelat oluşturması ile elde edilmektedir [111].

Alginat jelinin dayanıklılığındaki temel faktör yapısındaki gluronik asit ünitelerinin oranı ve uzunluğu ve mannuronik asit içeriği Ayrıca Na-alginat konsantrasyonu ve $CaCl_2$ çözeltisinin konsantrasyonudur [108, 114]. Enzimlerin ve/veya hücrelerin alginatta tutuklanması immobilizasyonun en basit metodlarından biridir [112].

Alginat ile immobilizasyon yönteminde, sodyum alginat çözeltisi ile karıştırılan enzim ya da hücreler $CaCl_2$ çözeltisine damlatılır ve oluşan Ca-Alginat jel boncukları içinde hücrelerin hapsedilmeleri sağlanır. Jel oluşumu sırasında sodyum iyonları kalsiyum

iyonları ile yer değiştirerek suda erimeyen Ca- alginat boncukları oluşturur [114]. Ca- alginat jelinin immobilizasyon materyali olarak kullanılmasında en önemli problem, laktik asit ve sitik asit gibi organik asitlerin, EDTA gibi şelat yapıcı bileşiklerin ve Mg^{+2} , K^{+} katyonların Ca-alginatta bulunan Ca^{+2} iyonları ile yer değiştirmesi sonucunda Ca-alginat kararlılığının bozulmasına ve jelin parçalanıp dağılmasına neden olmasdır [115].

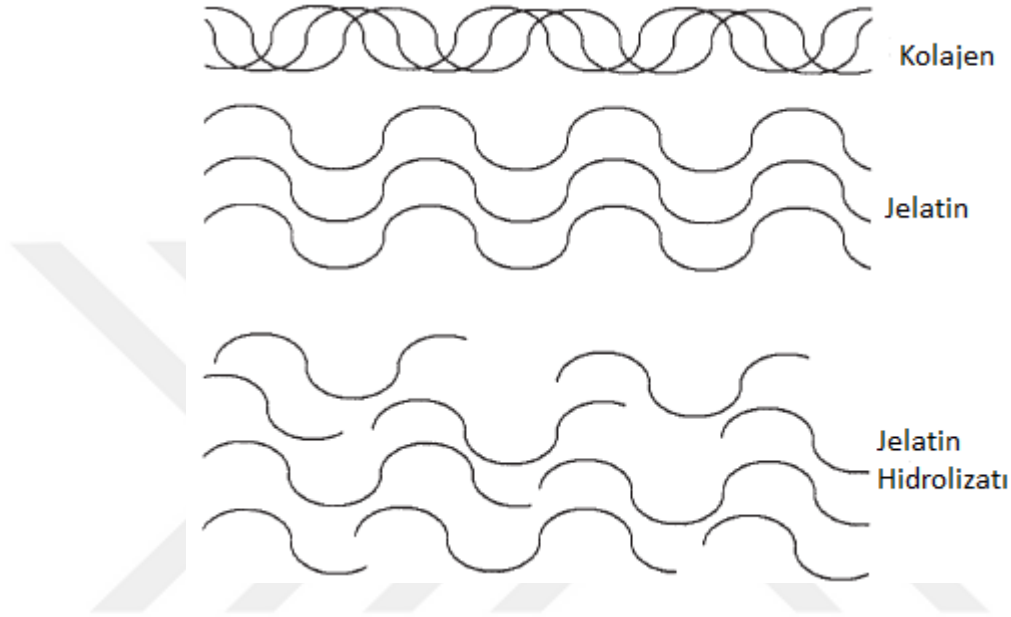
Alginat tanecikleri uzun yıllar boyunca yavaş salınım özelliğinden dolayı böcek ilacı ve gübre gibi suda çözünen kimyasallar içeren maddelerde kullanılmaktadırlar. Alginatlar, suda çözüner sodyum alginatlar olarak ticari formda biyoteknolojik uygulamalarda kullanımının yanı sıra gıda, tekstil sektörlerinde ve farmosötik endüstrilerinde kıvamlaştırıcı, emülsiyede edici, film oluşturucu ve jelleşme ajanı olarak uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Gıda sanayinde, dondurma üretiminde yıllardan beri kullanılan alginat bazlı stabilizörler kristal oluşumunu sağlayarak pürüzsüz bir yapı elde edilmesini sağlamaktadır. Bunlara ilaveten eritme peyniri, süt ve süt ürünlerinde, pastacılıkta krema ve sosların stabilizasyonu için alginat bazlı stabilizatörler kıvam arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Çözünmeyen kalsiyum alginat jelde tutuklama, enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonu için hızlı, toksik ve pahalı olmayan çok yönlü bir yöntemdir [112].

2.6.4.2 Jelatin

Jelatin, sığır ve domuz gibi hayvanların bağ dokularından ekstrakte edilen kollajenin kontrollü şartlarda kısmi hidrolizi ile üretilen bir hidrokoloid protein olarak tanımlanır [116]. Eski çağlarda “biyolojik bir yapışkan” olarak kullanılırken, zamanla endüstriyel ölçekte üreilmeye ve çok çeşitli alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır [117].

Jelatin yapısında glisin, prolin ve hidroksiprolin gibi amino asit içeriğine sahip olan bir proteindir [118]. Jelatin yapısında bulunan bu aminoasitler, üçlü heliks yapı ve jelleşme özelliği oluşumuna sağladığı katkıdan dolayı önemlidir [119].

Kolajen içeren dokular genellikle seyreltik alkali veya asit ile muamale edildikten sonra suda 40 °C üzerindeki sıcaklıklarda hidrolize edilir. Böylece kolajenin fibril yapısı geri dönüşsüz olarak parçalanır. Bu işlemle moleküller arasındaki H bağları ve diğer çapraz bağlar zayıfladığı gibi bazı amino asitler arasındaki kovalent bağlar da kopar ve daha küçük molekülü yapılar ortaya çıkar [116] (Şekil 2.6.4.2).



Şekil 2.6.4.2 Jelatin ve kollajenin şematik görünümü [116].

Jelatin, üretim koşullarına ve üretildiği hammaddeye bağlı olarak, farklı molekül ağırlığına ve aminoasit kompozisyonuna sahip olarak elde edilebilmektedir [116].

Jelatin, gıda katkı maddesi, kozmetik, tarım ilaçları, fotoğraf ve boya gibi çeşitli ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan önemli bir endüstriyel üründür. Bununla birlikte jelatin, suda kolay çözünür olması, tatsız ve kokusuz olması, birkaç fonksiyonel özelliği birlikte gösterebilmesi ve çeşitli uygulamalar için farklı özelliklere sahip olarak üretilebilmesi nedeniyle tercih edilmektedir [120, 121]. Jelatinden çeşitli tipte ve farklı amaçlara yönelik olarak bir takım jelatin türevleri veya alt ürünleri üretilmektedir. Bunlar; suda çözünür özellikteki jelatinler, jelatin hidrolizatları kimyasal olarak modifiye edilmiş jelatinler olmak üzere üçe ayrılır [116].

Enzim immobilizasyonunda jelatin kullanımının en dikkat çekici sebebi uzun bir raf ömrüne sahip olması özelliğindedir [118]. Ayrıca ucuz ve kolay elde edilebilmesi, jel

oluşumu için herhangi bir iyon, molekül, tuz pH ayarlamasına ihtiyaç kalmadan enzim, hücre ve doku immobilizasyonu için genellikle jelatinin tercih edilmesini sağlamaktadır [122].



3. MATERYAL METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasal

Asetonitril (Sigma-Aldrich,34851), 2-propanol (Merk M109634.2511), Etanol, Metanol, Aseton, HCl, Asetik asit (Merk M100063.2500), Gliserol, Agaroz (AppliChem, A8963), Agar (AppliChem,A0949), %30 Akrilamid/Bisakrilamid (Bio-Rad), Glisin (AppliChem), β -Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich,M3148), Commassie Brillant Blue G-250 (C.I. 42655), EDTA, IPTG (GeneON 46-010), Amfisilin (Applichem A0839), Kanamisin, X-Gal (406-501), Luria-Bertani (LB) brot (AppliChem A0954,0500G), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), TEMED, 1,4- dithiothreitol (DTT Sigma-Aldrich), CAPS (AppliChem), NaOH, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl_2 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KCl, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EDTA, Tris Bazı, Fenil Metil Sülfonil Florit (PMSF, Sigma-Aldrich,), Sodyum Deoksikolat, Sodyum Taurokolat (Sigma Aldrich 86339), Tween 80, Tween 20, TritonX-100, DMSO, Ksilen, n-Bütanol, Dimetilformamid (DMF), Jelatin (Sigma-Aldrich), Sodyum Alginat (Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil-asetat (pNPA, C2) (Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil - bütirat (pNPB, C4), *p*-nitrofenil- oktaonat (pNPO, Kaprilat C8) (Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil dekonat (pNPD-C10) (Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil laurat (pNPL, C12), *p*-nitrofenil meristat (pNPM, C14) (Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil palmitat (pNPP, C16) (Sigma-Aldrich),

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Soğutucu (+4 °C)	Profilo, Türkiye
Derin Dondurucu (-20 °C)	Profilo, Türkiye
Derin Dondurucu (-45 °C)	Uğur, Türkiye
Dikey Elektroferez Sistemi	Bio-Rad, Mini Protean Tetra Cell, Çin
Güç Kaynağı	nanoPAC-300
Masa Üstü Santrifüj Mikrosantrifüj	Hettich Mikro 200
Masa Üstü Santrifüj	Hettich Rotina 35R

Otoklav	NewClave Autohouse AD7, Tayvan
pH Metre	Adwa AD800, Romanya
Etüv	Labart
Termal Döngü Cihazı	Inovia, Small Cyclers 1600,
Çalkalamalı İnkübatör	Inovia, INO THZ-100B,
Çalkalamalı Su Banyosu	Jeio Tech BS-06, Kore
UV Görüntüleme Cihazı	Liuyi WD 940 3D
UV Görüntüleme Cihazı	Gel Company, Illuminator, Tayvan
Mikrodalga Fırın	Vestel, Türkiye
Mikroplate Okuyucu	Bio-Tek Eon, USA
Jel dökümantasyon sistemi	Alpha EL1100,UK
Manyetik Isıtıcı Karıştırıcı	WiseStir MSH-20A, DAIHAN, Kore
Hassas terazi	Denver TP-214,
Vorteks	Yellow line TTS 2, IKA, USA
Mini Shaker	Biosan PSU-2T, EU
Saf Su Cihazı	GFL 2004, Almanya

3.1.3 Kullanılan Nükleotidler

- dNTP-Mix (40mM) (Cat No: 110-002, GeneOn GmbH, Almanya),
- BTL2-F (10 µM) (5'- AAGGTCGACATGATGAAAGGCTGCCGGGT-3')
(GTCGAC: Sall kesim bölgesi) (Macrogen Ltd. Co., Hollanda),
- BTL2-R (10 µM) (5'-CCTAAGCTTAGG CCGCAAACCTCGCCAACT-3')
(AAGCTT: HindIII kesim bölgesi) (Macrogen Ltd. Co., Hollanda),
- *B.pumilus* MBB03-F (10µM) (GCTGAAGCTCTTCT'ATGAAAGT
GATGTTTG) (GCTCTTC: SapI kesim bölgesi), (Macrogen Ltd. Co.,
Hollanda),
- *B.pumilus* MBB03-R (10µM)
(TGACGGCTCTTCTACC'TTAATTCGTATTCTG) (GCTCTTC: Tip IIs kesim
bölgesi) (Macrogen Ltd. Co., Hollanda).

3.1.4 Kullanılan Enzimler ve Tamponları

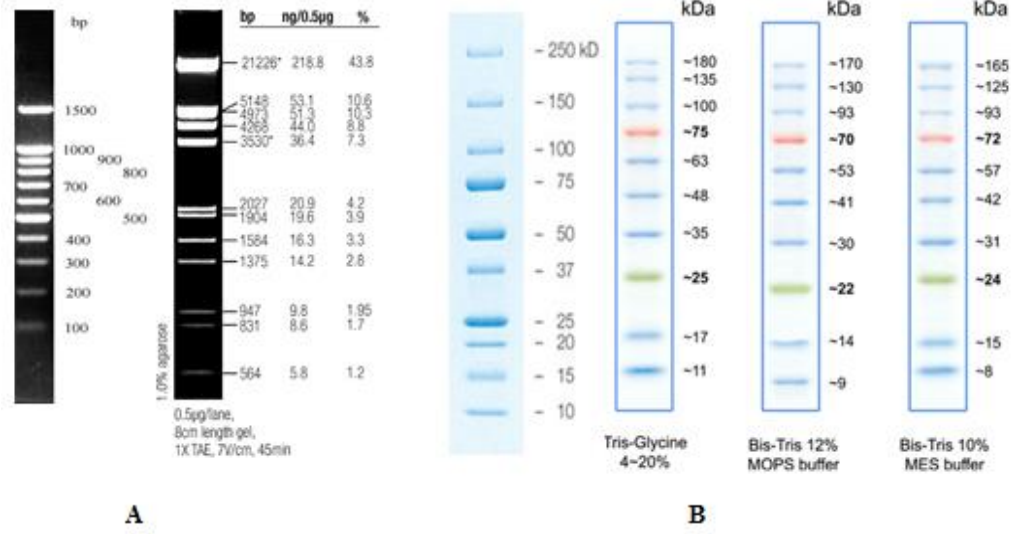
- Maximo *Taq* DNA Polymerase (5 u/μL, cat No:S102, GeneOn GmbH, Almanya),
- 10X Reaksiyon Tamponu (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 9.0, % 1Triton X-100, 15mM MgCl₂),
- Sal I (20 U/μL, cat no: R0138S, New England Biolabs, Amerika),
- HindIII (20 U/μl, cat no: R0104S, New England Biolabs, Amerika),
- SapI (20 U/μL), Tip IIs (20 U/μL) (NEBuffer 3.1 Tamponu (1M NaCl, 0,5M Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100μg/mL BSA, pH 7.9),
- T4 DNA Ligaz (400 U/μL, cat no: M0202S, New England Biolabs, Amerika),
- 10x T4 DNA Ligaz Tamponu (0,5 M Tris-HCl,0,1 M MgCl₂, 10 mM ATP, 0,1 M DTT, pH 7.5).

3.1.5 Kullanılan Kitler

- Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (GF-1, GeneON GmbH)
- Protein saflaştırma Kiti (His60 Ni Buffer Set, Clontech 635665)

3.1.6 Kullanılan Moleküler Belirteçler

- Moleküler DNA belirteci (1 kb Plus Blue DNA ladder-S304-105 GeneON, Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker Fermentas),
- Moleküler Protein belirteci (BlueRAY Prestained Protein Ladder- PM006-0500S GeneDirex, Precision Plus Protein Standarts-All Blue-161-0373 BioRad) (Şekil 3.1.6).

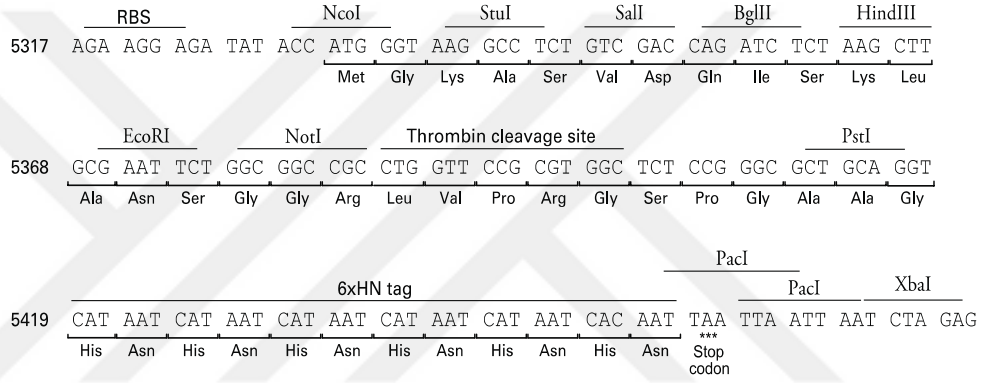
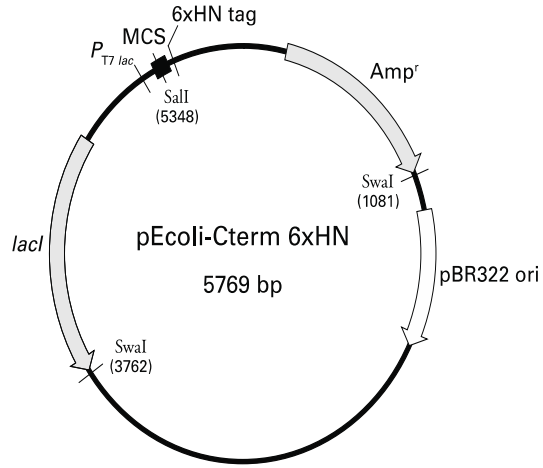


Şekil 3.1.6 Moleküler belirteçler.

A) 1 kb ve 10kb Moleküler DNA Belirteçleri B) 10-250 ve 8-165 kDa Protein Belirteçleri

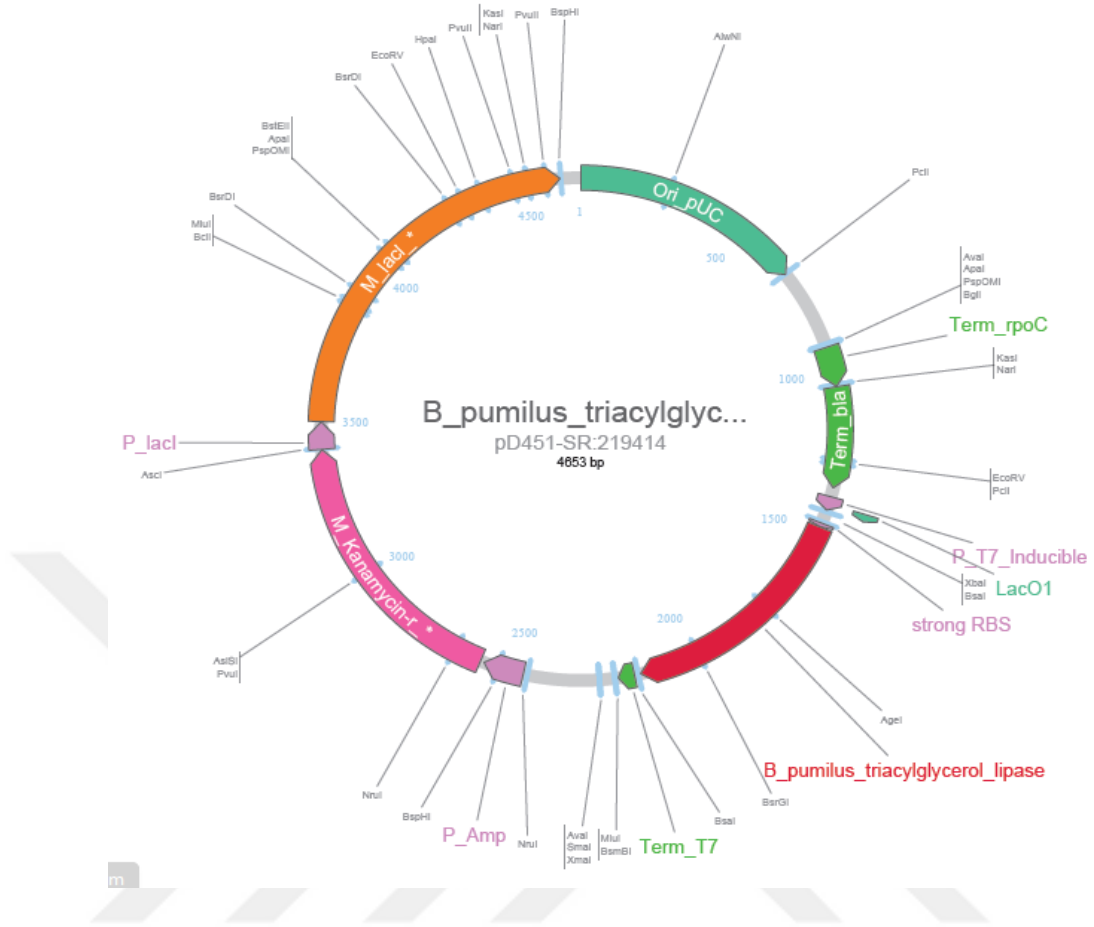
3.1.7 Kullanılan Plazmit Vektörler

Bu tez çalışmasında pEcoli-Cterm-6xHN vektör sistemi (Cat. No. 631418, Clontech Laboratories, Inc, Japonya) *B. thermocatenuatus*'tan ve pD451-SR:219414 vektör sistemi ise *B. pumilus* MBB03' dan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile elde edilen lipaz genini klonlamak için kullanılmıştır (Şekil 3.1.7a, 3.1.7b).



Şekil 3.1.7a pEcoli-Cterm-6xHN vektör haritası.

Çoklu klonlama bölgesi ve vektörün genel özelliklerini gösteren şekli.



Şekil 3.1.7b pD451-SR:219414 vektör haritası.

Çoklu klonlama bölgesi ve vektörün genel özelliklerini gösteren şekli.

3.1.8 Kullanılan Bakteri Soyları

Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus thermocatenulatus* ve *Bacillus pumilus* suşları MBB03 genomik DNA' sını DSMZ, Almanya (The Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)' dan temin edilmiştir. Sırasıyla pEcoli-Cterm-6xHN' ya ve pD451-SR:219414' e klonlanan lipaz geninin ekspresyonu için *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3) (Stratagene) kompetan hücreleri kullanılmıştır. BL21-CodonPlus (DE3) hücreleri T7 promotörü taşıyan plazmitlerin uyarılması sonucu yüksek miktarda protein ekspresyonu sağladığından ve bu özelliğinden dolayı protein ekspresyon çalışmalarında kullanılmak için ideal bir tür olarak kabul edilir.

3.1.9 Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri

Agaroz Jel Elektroforezi İçin Gerekli Solüsyonlar

50X TAE Tamponu (1L)

- Tris: 242 g
- Glasiyal Asetik Asit: 57.1 mL
- 0.5 M EDTA (pH 8.0): 100 mL

% 0.1' lik Agaroz Jel (50 mL)

- Agaroz: 1g
- 1X TAE Tamponu: 50 mL

6X yükleme boyasını

- Gliserol v/v: %30
- Bromofenol mavisi w/v: %0.25
- Ksilen siyanol FF w/v : % 0.25

SybrGreen boyası (1 µL)

DNA Marker (2 µL)

Ampisillin Stok Çözeltisi (5 ml, 100 mg/mL)

0.5 g Ampicillin (Cat No: A0839,0010, Applichem, Almanya) distile su ile 5 mL'ye tamamlandı ve filtre ile sterilizasyon yapıldı. 1 mL alikotlar halinde -20 °C' de saklandı.

Kanamisin Stok Çözeltisi (10 mL, 50 mg/mL)

0.5 g Kanamisin distile su ile 10 mL' ye tamamlandı ve filtre ile sterilizasyon yapıldı. 1 mL alikotlar halinde -20 °C' de saklandı.

İzopropiltiogalaktozid (IPTG) Stok Çözeltisi (100 mM, 10 mL)

238 mg IPTG (Cat No 406-501, GeneOn GmbH, Almanya) 10 mL distile su ile çözüldü. Filtre ile sterilizasyon yapıldı. 1 mL alikotlar halinde -20 °C' de saklandı.

X-Gal Stok Çözeltisi (10 mL, 40 mg/mL)

400 mg X-Gal (Cat No 406-010, GeneOn GmbH, Almanya) 10 mL dimetilformamid (DMF) içerisinde çözüldü. Işıktan korunarak -20 °C' de saklandı.

Luria Broth (1 L, pH 7.5, AppliChem, A0854,0500G)

- NaCl: 10 g
- Tripton: 10 g
- Maya Özütü: 5 g

25 gr LB-Broth' u 1 L distile su ile tamamlanarak ve çözüldü. Böylelikle LB sıvı besi yerini elde edilebildi. LB sıvı besi yeri 30 mL, 400 mL, 400 mL ve 170 mL olacak şekilde 4 parçaya ayrıldı ve aşağıdaki işlemler yapıldı.

1. LB: 30 mL LB sıvı besi yerini otoklavlandı.

2. A. LB-Agar-Amp: 400 mL LB sıvı besi yerine 6 g Agar eklendi ve otoklavla (121 °C, 15 dk). Otoklavdan sonra besi yeri sıcaklığı 55 °C olan bir su banyosuna yerleştirildi ve 10 dk bekletildi. 400 µL ampisilin (100 mg/mL) eklendi ve iyice karıştırıldı. LB-Agar-Amp petrilere döküldü.

2. B. LB-Agar-Kanamisin: 400 mL LB sıvı besi yerine 6 g Agar eklendi ve otoklavla (121 °C, 15 dk). Otoklavdan sonra besi yeri sıcaklığı 55 °C olan bir su banyosuna yerleştirildi ve 10 dk bekletildi. 400 µL kanamisin (50 mg/mL) eklendi ve iyice karıştırıldı. LB-Agar- Kanamisin petrilere döküldü.

3. A. LB-Amp: 400 mL LB sıvı besi yerini otoklavlandı. Otoklavdan sonra besi yeri sıcaklığı 55 °C olan bir su banyosuna yerleştirildi ve 10 dk bekletildi. 400 µL ampisilin (100 mg/mL), eklendi ve iyice karıştırıldı.

3. B. LB-Kanamisin: 400 mL LB sıvı besi yerini otoklavlandı. Otoklavdan sonra besi yeri sıcaklığı 55 °C olan bir su banyosuna yerleştirildi ve 10 dk bekletildi. 400 µL kanamisin (50 mg/mL) eklendi ve iyice karıştırıldı.

4. LB-Agar: 170 mL LB sıvı besi yerine 2.55 gr Agar eklendi ve otoklavlandı. LB-Agar petrilere döküldü.

Hazırlanan besiyerleri 121 °C' de 20 dakika süre ile otoklavlanarak steril edildi.

Protein Ekstraksiyonu ve Saflaştırma İçin Kullanılan Çözeltiler

His60 Ni xTractor Tamponu

His60 Ni Dengeleme Tamponu (pH 7.4)

- NaH₂PO₄: 50 mM
- NaCl: 300 mM
- İmidazol: 20 mM

His60 Ni Yıkama Tamponu

- His60 Ni Ayırma Tamponu: 710 µL
His60 Ni Dengeleme Tamponu: 9.29 mL

Ayırma Tamponu (pH 7.4)

- NaH₂PO₄: 50 mM
- NaCl: 300 mM
- İmidazol: 300 mM

Bradford için Kullanılan Çözeltiler

Coomassie Blue G-250 Ayıraç Hazırlanışı

- Coomassie Brilliant Blue G-250: 10 mg
- % 95' lik Etanol: 5mL
- % 85' lik Fosforik Asit: 10mL

Distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.

Sığır Serum Albuminin (BSA) Hazırlanması

- BSA: 10 mg distile su ile 10 mL' ye tamamlandı.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi (SDS-PAGE) İçin Kullanılan Çözeltiler

Ayırma Jeli Tamponu (pH 8.8)

- Tris-HCl: 1.5 M 5.4225 g Tris bazı 200 mL distile suda çözülerek, pH' sı 8.8' e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C' de saklandı.

Yığıma Jeli Tamponu (pH 6.8):

- Tris-HCl: 1 M 0.2850 g Tris bazı 200 mL distile suda çözülerek, pH' sı 6.8' e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C' de saklandı.

SDS Çözeltisi (% 10):

- SDS: 10 g distile suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlandı.

Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (% 10):

- APS:1 g distile suda çözülüp hacmi 10 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti -20 °C' de saklandı.

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.

Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (% 30):

- Akrilamid: 29.20 g
- N,N'-metilenbisakrilamid: 0.80 g

distile suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.

Gliserol Çözeltisi (% 80):

- Gliserol: 80 mL hacminin distile suyla 100 mL' ye tamamlanması ile hazırlandı.

Bromofenol Mavisi (0.1):

- Bromofenol mavisi: 10 mg distile suda çözülüp hacminin 10 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi:

- Tris-HCl: 1 M, 150 µL (pH 6.8),
- SDS : % 10, 400 µL
- Bromofenol mavisi: % 0.1, 100 µL

- Gliserol: % 80,250 μ L
- 2-merkaptoetanol' ün: 60 μ L

kariştirilmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C' de saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (pH 8.3):

- Tris: 7.20 g
- Glisin: 1.50 g
yaklaşık 480 mL distile suda çözüldükten sonra
- SDS (%10): 10 mL

çözeltisi ilave edildi. pH 8.3' e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL' ye tamamlandı.

Jel Boyama Çözeltisi:

- Coomassie Brilliant Blue-R250: 1 g
- Glasiyel asetik asit: 62.5 mL
- Metanol: 93.5 mL

içinde çözümlenmesiyle hazırlandı.

Boya Uzaklaştırma Çözeltisi:

- Glasiyel asetik asit: 100 mL
- Metanol: 400 mL
- Saf su: 600 mL

kariştirilerek hazırlandı.

Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

Asetat Tamponu (50 mM, pH 4.0): 0.205 g sodyum asetat yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N asetik asit ile 4.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

Asetat Tamponu (50 mM, pH 5.0): 0.205 g sodyum asetat yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N asetik asit ile 5.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

KH₂PO₄ Tamponu (50 mM, pH 6.0): 0.3402 g potasyum fosfat yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 6.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

KH₂PO₄ Tamponu (50 mM, pH 7.0): 0.3402 g potasyum fosfat yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 7.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8.0): 0.3028 g Tris yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N HCl ile 8.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9.0): 0.3028 g Tris yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N HCl ile 9.0' a ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 10' a ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 11' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 12.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL distile suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 12' e ayarlanarak hacmi 50 mL' ye tamamlandı.

Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Gerekli Substrat Çözeltileri

*p*NPA: *p*-nitrofenil asetat (C2)

*p*NPB: *p*-nitrofenil bütirat (C4)

*p*NPO: *p*-nitrofenil oktaonat (Kaprilat, C8)

*p*NPD: *p*-nitrofenil dekonat (C10)

*p*NPL: *p*-nitrofenil laurat (C12)

*p*NPM: *p*-nitrofenil meristat (C14)

*p*NPP: *p*-nitrofenil palmitat (C16)

asetonitril içinde çözümlenerek, 10mM konsantrasyonda stok solüsyonu olacak şekilde hazırlandı.

3.2 Metot

3.2.1 BTL2 ve *B. pumilus* MBB0 Lipaz Geninin Restriksiyon Enzim Haritalarının Çıkartılması

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 genomundaki (NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) lipaz geninin (sırasıyla GenBank'ta 1321705:106-1374), (GenBank'ta 215414329:121-768) restriksiyon enzim haritası NCBI BLAST programı ile hazırlandı. Gen dizilerindeki restriksiyon enzim kesim bölgeleri belirlendikten sonra klonlama ve ekspresyon çalışmaları için pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 vektör seçilmiş ve klonlanacak gen için bu vektörlerin Sal I ile HindIII ve SapI ile Tip IIs klonlama bölgelerine eklenmesini sağlayacak ileri ve geri primerler tasarlandı.

3.2.2 BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 Lipaz Geninin PCR ile Çoğaltılması

Klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılacak lipaz genine ait DNA fragmanı, *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03' un kromozomal DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Geni çoğaltmak için *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 genom dizisi dikkate alınarak sırasıyla (NCBI GenBank'te bulunan 1321705:106-1374, GenBank'te bulunan 215414329:121-768) içeren bölgeyi çoğaltmak üzere ileri ve geri primerler tasarlandı. Tez çalışması kapsamında yapılan bütün moleküler çalışmalar "Moleküler Cloning: A Laboratory Manual" kitabı temel alınarak oluşturulan protokol kullanılarak gerçekleştirildi [123]. Oluşacak PCR ürününün vektör ile ligasyonu sağlaması için ileri ve geri primerlerin 5' ucuna, kullanılan ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesine uygun şekilde yerleştirilmesini sağlayacak Sal I ve HindIII endonükleazına ait tanıma dizileri (SalI kesim bölgesi:5'-GTCGAC-3', HindIII kesim bölgesi- 5'-AAGCTT-3') ve SapI ve Tip IIs endonükleazına ait tanıma dizileri (SapI, kesim bölgesi:5'-GCTCTTC-3', Tip IIs kesim bölgesi-5'-GCTCTTC-3') eklenmiştir. *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 genomundan lipaz genini çoğaltmak amacıyla kullanılacak olan primer dizileri Çizelge 3.2.2a' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.2a BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 aday lipaz geninin PCR amplifikasyonunda kullanılan primer DNA dizileri.

Gen	Primer Adı	Primer DNA dizisi	Restriksiyon Enzimi	Bç. Uzunluğu
BTL2	F	AAG GTCGAC ATGATGAAA GGCTGCCGGGT	SaII	29
	R	CCT AAGCTT AGGCCGCAA ACTCGCCTCACT	HindIII	29
<i>B. pumilus</i> MBB03	F	GCTGA AAGCTCTTCT 'AT GAAAGTGATGTTTG	SapI	30
	R	TGAC GGCTCTTC TACCTTAA TTCGTATTCTG	Tip II	31

*Altı çizili gösterilen kısımlar restriksiyon tanıma bölgelerini göstermektedir.

PCR reaksiyonunu hazırlamak için gerekli olan steril şartlar sağlandıktan sonra, kullanılacak bileşenlerin oranları ve miktarları dikkatlice hesaplanarak DSMZ-Almanya (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)' dan temin edilen DNA kalıp olarak kullanılan *B. thermocatenuatus* (BTL2)'nin ve *B.pumilus* MBB03' un triaçilgliserol lipaz geni çoğaltılması aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

1. PCR cihazı, kullandığımız yönteme göre aşağıdaki şekilde programlandı.

Çizelge 3.2.2b PCR reaksiyon kurulumu.

Program İsmi	Döngü Sayısı
Ön-İnkübasyon	1
Çoğalma	40
Son Uzama	1
Soğuma	1
Sıcaklık Hedefleri	
Hedef (°C)	Bekletme
	(hh:mm:ss)
Ön İnkübasyon	
98	00:10:00
Çoğalma	
95	00:00:30
55	00:00:30
72	00:01:00
Son Uzama	
72	00:10:00
Soğuma	
40	00:00:10

2. PCR için 4 adet reaksiyonu (*Bacillus* PCR, Negatif Kontrol), 200 µL' lik PCR tüpleri içerisinde Çizelge 3.22c' deki şekilde kuruldu.

Çizelge 3.2.2.c BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 ve negatif kontrol PCR reaksiyon kurulumu.

Bileşen	<i>Bacillus</i> PCR	Negatif Kontrol
10X Reaksiyon Tamponu (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% Triton X-100, 15mM MgCl ₂)	10 µL	5 µL
dNTP-Mix (40mM)	2 µL	1 µL
<i>BTL2</i> -F (10 µM) (5'- AAG GTC GAC ATGATGAAA GGC TGCCGGGT -3') (GTCGAC : SallI kesim bölgesi)	2 µL	1 µL
<i>B. pumilus</i> MBB03-F(10 µM) (5'- GCTGAAG GCTCTT C T'ATGAAAGTGATGTTTG -3') (GCTCTTC : SapI kesim bölgesi)		
<i>BTL2</i> -R (10 µM) (5'- CCT AAG CTT AGGCCGCAA ACT CGC CAA CT -3') (AAGCTT : HindIII kesim bölgesi)	2 µL	1 µL
<i>B. pumilus</i> MBB03-R (10 µM) (5'- TGA CG GCTCTTC TAC C'TTAATTCG TATTCTG -3') (Tip IIs kesim bölgesi)		
Maximo Taq DNA Polymerase (5 u/µL)	2 µL	1 µL
<i>B. thermocatenulatus</i> genomik DNA'sı (100 ng/µL)	2 µL	-
<i>B. pumilus</i> genomik DNA'sı (100 ng/µL)		
Su (Deiyonize Su)	80 µL	41 µL
Toplam Hacim	100 µL	50 µL

3. *Bacillus* PCR reaksiyonunu 50 µL' lik iki eşit parçaya bölündü. Hazırlanan tüpler PCR cihazının reaksiyon modülüne yerleştirildi ve programı başlatıldı.

4. PCR programı tamamlandıktan sonra oluşan PCR reaksiyon ürünü % 1' lik agaroz jelde 100V' da 30 dakika yürütülerek gözlenmiştir. Jel fotoğrafları, Jel dökümantasyon sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.2.3 PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürünlerini temizlemek için PCR ürünü saflaştırma kiti (GF-I, GeneON) kullanıldı. 100 µL PCR ürünü 500 µL “Tampon PCR” ile birleştirildi. Karışım silika DNA saflaştırma kolonuna yüklendi ve 1 dk inkübe edilerek 10,000x g’ de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj yapıldıktan sonra kolon alt kısmında biriken atık uzaklaştırıldı ve kolon tekrar tüpe yerleştirildi. Kolon üst kısmına 750 µL yıkama tamponunu yüklendi, 10,000x g’de 1 dk santrifüj edilerek altta kalan sızıntı uzaklaştırıldı. Kolon tekrar tüpe yerleştirildi ve bu işlem tekrar gerçekleştirildi. Kolonda yıkama tamponu kalmadığından emin olmak için kolona hiçbir şey ekmeden boş olarak 10,000x g’ de 1 dk tekrar santrifüj edildi ve kolon steril yeni bir mikro santrifüj tüpe yerleştirildi. Kolona son olarak tampon elüsyon tamponu eklenerek 14,000 rpm’ de 1 dk santrifüj edilerek istenilen PCR ürünü saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA -20 °C’ de saklandı.

3.2.4 BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 Lipaz Geninin Klonlanması

BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 lipaz geninin klonlanması için sırasıyla pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 klonlama vektörleri kullanıldı. Bu vektörler, klonlama bölgesinin 5’ ucunda His-Tag bölgesini içermesinden dolayı seçilmiştir. His-Tag bölgesi içeren proteinler, Ni-NTA kullanılarak saflaştırılabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 klonlama vektörü kullanılarak oluşan lipaz proteini Ni-NTA kullanılarak saflaştırıldı. pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 vektörünü taşıyan *E. coli* BL21 hücreleri sırasıyla 100 mg/mL ampisilin ve 50 mg/mL kanamisin içeren 10 mL LB besiyerine ekildi ve 37 °C’ de 200 rpm’ de çalkalanarak gece boyu inkübasyona bırakıldı. Elde edilen kültür 14,000 rpm’ de 5 dakika çöktürüldükten sonra mini plazmit DNA izolasyon kiti (iNtRON, 17091) kullanılarak izole edildi.

3.2.5 Plazmit DNA’sı ve PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzim Kesimi ve Saflaştırılması

B. thermocatenuatus BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 lipaz genlerinin, sırasıyla vektör pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 ile ligasyon oluşturması için PCR ürünleri

uygun restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonuna alınarak saflaştırıldı. Primerlerde bulunan kesim bölgeleri sayesinde oluşturulan kesimlerde yapışkan uçlar oluşturuldu. Saflaştırılan ürün aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 vektörüne aktarılarak 6X-His kuyruğu eklenmiş oldu. Oluşturulan rekombinant plazmitler *E. coli* BL21(DE3) ırkına ısı şoku kullanılarak aktarıldı.

PCR ürünlerinin ve pEcoli-Cterm-6xHN, pD451-SR:219414 plazmit DNA' sı SalI ile HindIII ve SapI ile Tip IIs endonükleazları ile kesim reaksiyonun kurulma şekli ve bileşenleri Çizelge 3.2.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.5. PCR ürünlerinin ve plazmit DNA'ları kesim reaksiyon kurulumu.

Bileşen	Vektör Kesim	BTL2 ve <i>B. pumilus</i> Lipaz Kesim
pEcoli-Cterm-6xHN Vektör (500 ng/μL)	2 μL	
pD451-SR:219414 Vektör (500 ng/μL)		
Saflaştırılmış BTL2 lipaz geni		25 μL
Saflaştırılmış <i>B. pumilus</i> MBB03 lipaz geni		
HindIII (20 U/μL), SapI (20 U/μL)	2 μL	4 μL
Sal I (20 U/μL), Tip IIs (20 U/μL)	1 μL	2 μL
NETampon 3.1 Tamponu (1M NaCl, 0,5M Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 μg/mL BSA, pH 7.9)	5 μL	10 μL
Deiyonize Su	40 μL	59 μL
Toplam Hacim	<u>50 μL</u>	<u>100 μL</u>

Kurulan reaksiyon 37 °C' de 2 saat inkübe edildi ve sonlandırıldı. Vektör kesim reaksiyonuna 50 μL, BTL2 ve *B. pumilus* lipaz kesim reaksiyonuna 100 μL bağlama tamponu eklendi. Vektör kesim reaksiyonuna 50 μL, BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 kesim reaksiyonuna 100 μL 2-propanol eklendi ve karıştırıldı. Karışımı silika DNA kolonuna yüklendi, 1 dk inkübe edildikten sonra 10,000x g' de 1 dk santrifüj edilerek

oluşan atık atıldı ve kolon tekrar tüpe yerleştirildi. İki defa yıkama tamponu ile yıkandı: 500 µL yıkama tamponunu kolona yüklen, 10,000x g' de 1 dk santrifüj edilerek altta biriken atık atıldı, kolon tekrar tüpe yerleştirildi. Kolon hiçbir şey eklemeyen boş olarak 10,000x g' de 1 dk santrifüj edildi ve kolon steril yeni bir mikro santrifüj tüpe yerleştirildi. Kolona 50 µL steril deiyonize su eklendi 1 dk 55 °C' de inkübe edilerek 14000 rpm' de 1 dk santrifüj edilerek istenilen vektör ve ayrı ayrı BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 kesimleri saflaştırıldı.

3.2.6 BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 Lipaz Geninin pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 Vektörüne Aktarımı

Sal I ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile kesilen *B. thermocatenulatus* BTL2 lipaz geni ve SapI ve Tip IIs restriksiyon endonükleazları ile kesilen *B. pumilus* MBB03 lipaz geni ile aynı restriksiyon enzimleri ile kesilen pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 ekspresyon vektörüne ligasyon ile bağlandı. Bu amaçla hazırlanan ligasyon için gerekli olan bileşenler Çizelge 3.2.6' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.6 Kesilmiş lipaz (BTL2 ve *B. pumilus*) ve vektör (pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414) ligasyonu reaksiyon kurulumu.

Bileşen	1 reaksiyon için Hacim
10x T4 DNA Ligaz Tamponu (0,5 M Tris-HCl,0,1 M MgCl ₂ , 10 mM ATP, 0,1 M DTT, pH 7.5)	2 µL
Kesilmiş vector	5 µL
Kesilmiş BTL2 ve <i>B. pumilus</i> MBB03 lipaz geni	5 µL
T4 DNA Ligaz (400 U/µL)	2 µL
Deiyonize Su	6 µL
Toplam Hacim	<u>20 µL</u>

Çizelge 3.2.6' da verilen şekilde reaksiyon kuruldu, hafifçe pipetajlandı ve mikrosantrifüjde kısa süre çevirerek bileşenleri tüpün dibine alınması sağlandı. Oda sıcaklığında 60 dk inkübe edilerek sonrasında 65 °C' de 10 dk inkübe edildi ve daha sonra buz üzerinde soğutuldu.

3.2.7 pEcoli-Cterm-6xHN-BTL2-lipaz' ın ve pD451-SR:219414-B. pumilus MBB03-lipaz' ın E. coli BL21 (DE3) Hücrelerine Transforme Edilmesi

Klonlama çalışmalarında konakçı olarak kullanılan BL21 (DE3) kompetan hücreler 80°C' den alındı ve buzda eritildi. Bu şekilde buz üzerinde eriyen 50 µL kompetent hücrelerden biri olan Ligasyon Transformasyonuna (LT) ligasyon mixinden 5 µL eklenerek dikkatlice (pipetaj yapılmadan, çalkalanmadan) karıştırıldı. Kontrol Transformasyonu (KT) için eriyen kompetent hücrelerden birine 1/10 seyreltilmiş plazmit DNA'sından 1 µL eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Tüpler, 30 dk buzda inkübe edildikten sonra 42 °C' de 30 saniye inkübe edilerek ısı şoku uygulanmış, ısı şokundan sonra buzda 2 dakika bekletilen her bir tüp üzerine 250 µL LB eklendi ve ardından 37°C' de 150 rpm' de çalkalamalı inkübatörde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda LB-Agar-Amp' a ve LB-Agar-Kanamisin' e 40 µL X-Gal (40 mg/ml) ve 40 µL IPTG (100 mM) yayıldıktan daha sonra LT olan tüplerden 100 µL ekim yapıldı. LB-Agar-Amp' a ve LB-Agar-Kanamisin'e 40 µl IPTG (100 mM) yayıldıktan daha sonra KT olan tüplerden 100 µl ekim yapıldı ve Gece boyu 37 °C' de inkübe edildi. Rekombinant vektörleri içeren beyaz kolonileri toplandı.

3.2.8 Lipaz Gen Ekspresyonu ve Hücre Özütlerinin Hazırlanması

Lipaz genini içeren rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) kolonilerinden LT ve KT için ayrı ayrı yürütülecek şekilde rekombinant kolonilerden bir tanesini alındı ve 1mL LB-Amp sıvı besi yerinde 37°C'de çalkalayarak gece aşırı inkübe edildi. Gece aşırı kültür 20 mL LB-Amp sıvı besi yerine transfer edildi. İkincil kültürler, 37 °C' de, OD₆₀₀=0.6 oluncaya kadar inkübasyona bırakıldı. OD₆₀₀=0.6' a ulaştığında 200 µL (100 mM) izopropiltiogalaktozid (IPTG) eklenerek uyarıldı. Uyarılan hücreler 5 saat boyunca 37 °C' de çalkalayarak inkübasyona bırakıldı.

BTL2-lipaz ve *B. pumilus* MBB03-lipaz enzimlerinin yüksek derecede eksprese olduğu BL21 (DE3) hücreler, 3,000x g'de +4 °C' de 15 dakika süre ile santrifüj ile çöktürülmüştür. Üst kısım atıldı ve çöktürülen 100 mg çökelti başına 2 mL His60 Ni xTractor Tampon eklendi ve süspanse edildi. Buz üzerinde 15 dk, arada bir çalkalayarak

inkübe edilmesinden sonra 20 dk +4 °C' de 10,000x g' de santrifüj edilerek hücre kalıntılarından uzaklaştırılmış ve üst fazı (protein ekstraktı) temiz bir tüpe alınarak saflaştırma işleminde kullanılmak üzere -80 °C' de saklanmıştır. BTL2-lipaz ve *B.pumilus* MBB03-lipaz proteinlerini içeren hücre özütleri % 12.5' lik SDS-PAGE' de görüntülendi.

3.2.9 Rekombinant BTL2-lipaz ve *B. pumilus*-lipaz Proteinlerinin Saflaştırılması

BTL2-lipaz ve *B. pumilus* MBB03-lipaz proteinini bulunduran hücre özütleri 5 mL hacimli His60 Ni Gravity kolonu (Clontech Laboratories, Inc., Japonya) ile tek basamakta saflaştırma yapıldı. His60 Ni Gravity Kolon matriksinin süspansiyon edilmesinin ardından kolon 5 mL His60 Ni Dengeleme Tamponu (Cat No: 635665, Clontech Laboratories, Inc., Japonya) (50 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür, 20 mM imidazol; pH 7.4) ile yıkandı. Kolonun altını kapatılarak 5 mL protein ekstraktı kolona yüklendikten sonra kolonun üstünü kapatıldı. Ni-NTA (Ni²⁺-Nitrilotriasetik asit) ile 6xHis-BTL2-lipaz ve 6xHis-*B. pumilus* MBB03-lipaz bağlanması için +4 °C' de kolonu yavaşça çevirerek 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda kolon dik bir şekilde yerleştirildi ve rezinin kolonun altında birikmesi beklendi. Kolonun altına temiz bir tüp yerleştirildi ve süzülen kolona bağlanmayan fraksiyon (F1) toplandıktan sonra kolon 10 mL His60 Ni Dengeleme Tamponu ile yıkandı. Kolonu 10 mL His60 Ni Yıkama Tamponu (Cat No: 635665, Clontech Laboratories, Inc., Japonya) (710 µL His60 Ni Ayırma Tamponu + 9.29 mL His60 Ni Dengeleme Tamponu) ile yıkandı. ≥ 300 aa ve üzeri proteinlerde High Cut off, 300 aa ≥ proteinler için Low Cut off tuz ayarlayıcı tamponundan 1mL' yi 10 mL Ayırma Tamponuna (50 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür, 300 mM imidazol; pH 7.4) eklendi ve iyice karıştırıldı. 11 mL ayırma tamponu kolondan geçirildi ve protein fraksiyonları (F2, saflaştırılmış protein) toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlar % 12.5' lik SDS-PAGE ile görüntülendi.

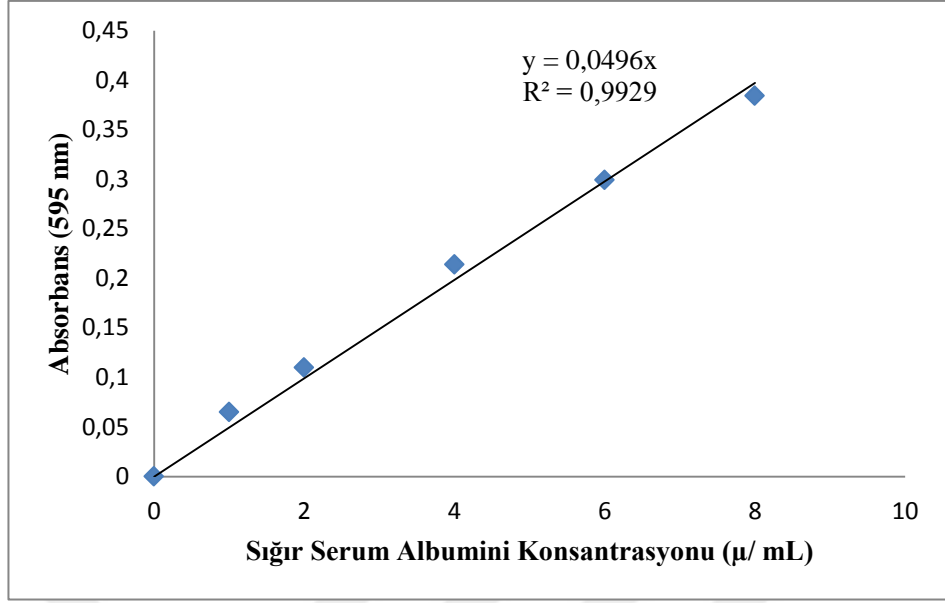
3.2.10 Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

Lipaz enziminin saflaştırılmasında; ham ekstraktan kolondan çıkan örneklere kadar tüm basamaklarda protein miktar tayini Bradford yöntemine göre yapılmıştır. “Coomassie

Brilliant Blue” boyar maddesinin proteinleri bağlaması temeline dayanan bu yöntemde, standart olarak BSA kullanılmıştır. 0.2 mg/mL stok çözeltisi hazırlanan BSA çözeltisinden; 5, 10, 20, 30 ve 40 µL hacimler alınarak, saf su ve Coomassie reaktifi ile toplam hacim 1 mL’ ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 2-10 dakika beklendikten sonra, 595 nm’ de absorbans değerleri ölçülerek BSA standart grafiği çizildi (Şekil 3.2.10). Protein miktarı tayin edilecek enzim örneği, Çizelge 3.2.10’ da gösterilen hacimlerde saf su ve Coomassie reaktifi ile hazırlanarak aynı şekilde 595 nm’ de absorbans değeri ölçüldü [124]. Kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

Çizelge 3.2.10 BSA Standartları ve Protein Örneğinin Hazırlanışı

Test Örneği	0.2 mg/mL BSA Stok Çözeltisi	Su Hacmi, µL	Coomassie Reaktifi Hacmi, µL
Kör	0	800	200
BSA Standart-1 µg/mL	5	795	200
BSA Standart-2 µg/mL	10	790	200
BSA Standart-4 µg/mL	20	780	200
BSA Standart-6 µg/mL	30	770	200
BSA Standart-8 µg/mL	40	760	200
Protein Örneği	50	750	200



Şekil 3.2.10 BSA standart grafiği

3.2.11 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Saflaştırılan enzimlerin molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE Laemmlı yöntemine göre % 5' lik yığıma jeli ve % 12' lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (% 12' lik yürütme jeli Çizelge 3.2.11' daki gibi hazırlandı) [125].

Hazırlanan jel karışımı plakalar arasına yüklendikten sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. 10 µL enzim örnekleri SDS-PAGE yükleme boyası ile karıştırıldı ve kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı daha sonra protein örnekleri protein belirteci (Moleküler Protein belirteci (GeneDirex-BlueRAY Prestained Protein Ladder-PM006-0500S ve BioRad-Precision Plus Protein Standarts-All Blue-161-0373)) ile birlikte jele yüklendi.

Çizelge 3.2.11 SDS-PAGE hazırlamak için gerekli bileşenler ve oranları [125].

Reaksiyon Bileşenleri	%5'lik Yığma Jeli Bileşenleri (mL)	%12' luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2.7	4.0
%30 Akrilamid/bisakrilamid	0.67	3.3
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.5	---
1.5 M Tris (pH 8.8)	---	2.5
% 10 SDS	0.04	0.1
% 10 APS	0.04	0.1
TEMED	0.004	0.004

Elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, proteinler, yığma jelinden çıkana kadar 20 mA'de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1.5 saat 25 mA' de yürütüldü. Elektroforezde yürütülen tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi (Coomassie Brilliant Blue-R250 ile 3 saat boyamaya bırakıldı. Boyanan jel, boyanın fazlasını uzaklaştırmak ve protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla boyadan arıtma çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır. Proteinlerin oluşturduğu bantlar moleküler ağırlık belirteciindeki ağırlığı bilinen protein bantları ile karşılaştırılmış ve proteinlerin ağırlıkları belirlendi.

3.2.12 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipaz aktivitesi *p*-nitrofenil palmitat (pNPP, C16) substratı varlığında spektrofometrik olarak belirlendi [126]. Substratların asetonitril içerisinde 10 mM konsantrasyonunda hazırlanmış çözeltisi, etil alkol ve 50 mM fosfat tamponu ile (pH 7.5) 1:4:95 (v/v/v) oranında karıştırılarak substrat karışımı hazırlandı. Bu karışımdan 980 µL alındı ve içersine 20 µL serbest enzim çözeltisi, immobilize enzim için 0.0200 g boncuk ilave edildikten sonra oda sıcaklığında absorban değişimleri 405 nm dalga boyunda ölçüldü. Aktivite dakikada oda sıcaklığında 1 µmol *p*-nitrofenol açığa çıkarmak için gerekli

enzim miktarı olarak belirlendi ve özgül aktivite mg protein başına düşen aktivite olarak hesaplandı.

Aktivite hesaplanması

$$\text{Aktivite [(U)veya } (\mu\text{mol dak}^{-1})] = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot t}$$

$$\text{Spesifik Aktivite [(U/mg prt) veya } (\mu\text{mol dak}^{-1} \text{ mg prt}^{-1})] = \frac{\text{Aktivite}}{V_{\text{Enzim}} \cdot C_{\text{Enzim}}}$$

$$\Delta A: A_{\text{Son}} - A_{\text{İlk}}$$

t (süre): dakika

$$\epsilon : 14.8 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^2$$

V_{Enzim} : mL

C_{Enzim} : (mg/mL) protein cinsinden

3.2.13 Alginat +Jelatin Jelde Tutuklama

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının jelatin ve alginat jel karışımında immobilizasyonu Norouzian'ın metoduna göre yapıldı [127]. Bu amaçla 0.5 g jelatin tartıldı, 10 mL destile suda 40 °C'de 30 dakika boyunca karıştırılarak iyice çözünmesi sağlandı, üzerine 0.2 g sodyum alginat eklendi ve karıştırıldı. Jel karışımının üzerine 2 mL lipaz enzim çözeltisi yavaş yavaş karıştırılarak eklendi. Enjektör yardımıyla, buz içerisine oturtulmuş 50 mL 250 mM'lık CaCl₂ çözeltisine damlatılarak jel boncuklar elde edildi. Boncuklar 90 dk boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi ve sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Lipazının enzimlerinin immobilize edildiği boncuklar üzerini örtecek kadar 0.05 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.2) kullanılmaya kadar buzdolabında (+4 °C) saklandı. Bu amaçla, immobilizasyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirildi.

$$\text{İmmobilizasyon Verimi (\%)} = (a_{\text{imm}} / a_{\text{serbest}}) \times 100$$

Burada

a_{imm} : İmmobilize Enzimin Spesifik Aktivitesi (mmol / (mg protein)).

a_{free} : Serbest Enzimin Spesifik Aktivitesi (mmol / (mg protein)).

$$\text{Yükleme Verimi (\%)} = [(C_i V_i - C_f V_f) / C_i V_i] \times 100$$

Burada;

C_i : Başlangıçtaki protein konsantrasyonu,

V_i : Enzim çözeltisinin başlangıç hacmi,

C_f : Toplam süzüntüdeki protein konsantrasyonu ile,

V_f : Filtrenin toplam hacmi.

3.2.14 İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.14.1 Jelatin Konsantrasyonunun Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazı immobilizasyonunda kullanılacak optimum jelatin miktarını belirlemek üzere; % 10, 15, 20, 25, 30 (w/v) olacak şekilde 1, 1.5, 2, 2.5, 3 g jelatin tartıldı ve 10 mL destile suda çözüldü. 0.2 g sodyum alginat eklendi ve bagetle karıştırarak homojen hale getirildi. Bu karışımın üzerine 2 mL *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz enzim çözeltisi sırasıyla (0.48 mg/mL, 0.44 mg/mL), eklenerek yavaşça karıştırıldı. Bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki 250 mM'lık CaCl_2 çözeltisine damlatıldı ve boncuklar elde edildi. Boncuklar 90 dk boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi ve süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Ayrıca boncukların ve yıkama sularının lipaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

3.2.14.2 Alginat Konsantrasyonu Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazı immobilizasyonunda kullanılacak optimum sodyum alginat miktarını belirlemek üzere; % 1.5, % 2, % 2.5, % 3 (w/v) olacak şekilde 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 g sodyum alginat tartıldı ve belirlenmiş olan optimum jelatin miktarı olan *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazı için sırasıyla 2 g ve 2.5 g jelatin tartılarak hazırlanan 10 mL destile sudaki çözeltisi üzerine eklendi. Bu karışımın üzerine 2 mL *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz enzim çözeltisi sırasıyla (0.48 mg/mL, 0.44 mg/mL), eklenerek yavaşça karıştırıldı. Bir

enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki 250 mM'lık CaCl_2 çözeltisine damlatıldı ve boncuklar elde edildi. Boncuklar 90 dk boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi ve süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Ayrıca boncukların ve yıkama sularının lipaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

3.2.14.3 Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazı immobilizasyonunda kullanılacak damlatma çözeltisi olan kalsiyum klorür çözeltisinin optimum konsantrasyonunu belirlemek üzere; 100, 150, 200, 250, 300 mM konsantrasyonlarda CaCl_2 çözeltileri hazırlandı. Optimum jelatin ve sodyum alginat konsantrasyonları olarak belirlenen *B. thermocatenulatus* lipazı için % 20 jelatin ve % 2.5 sodyum alginat *B. pumilus* MBB03 lipazı için % 25 jelatin ve % 2.5 sodyum alginat jel karışımında immobilize edilmiş 2 mL *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz enzim çözeltisi sırasıyla (0.48 mg/mL, 0.44 mg/mL), eklenerek hazırlanan jel karışımı bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki 5 farklı konsantrasyondaki CaCl_2 çözeltilerine damlatıldı ve boncuklar elde edildi. Boncuklar 90 dk boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi ve süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Ayrıca boncukların ve yıkama sularının lipaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

3.2.14.4 Enzim Miktarı Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazı immobilizasyonunda kullanılacak *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazı miktarını belirlemek üzere; sırasıyla (0.48 mg/mL, 0.44 mg/mL) olacak şekilde enzim çözeltisinden 1, 2, 3, 4, 5'er mL alınarak her biri için ayrı (*B. thermocatenulatus* lipazı için % 20 jelatin ve % 2.5 sodyum alginat, *B. pumilus* MBB03 lipazı için % 25 jelatin ve % 2.5 sodyum alginat olacak) şekilde hazırlanan alginat-jelatin karışımlarına eklendi. İmmobilize edilen enzimler bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde, buz banyosu içinde bulunan optimum kalsiyum klorür konsantrasyonu olarak *B. thermocatenulatus* ve

B.pumilus MBB03 her ikisi için belirlenen 250 mM CaCl₂ çözeltisine damlatıldı. 90 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra süzülerek distile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Aynı zamanda boncukların lipaz aktiviteleri ölçüldü.

3.2.14.5 Boncuk Boyutu Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazını immobilizasyonunda elde edilecek boncukların boyutunu optimize etmek için; farklı iğne çaplarına sahip enjektör uçları kullanıldı. Bu amaçla insülin enjektör, mavi enjektör, siyah enjektör, yeşil enjektör kullanıldı. *B. thermocatenulatus* için % 20 jelatin ve % 2.5 sodyum alginat, *B. pumilus* MBB03 için % 25 jelatin ve % 2.5 sodyum alginattan oluşan jel karışımlarına eklenen *B. thermocatenulatus* 2 mL ve *B. pumilus* 3 mL enzim çözeltisiyle elde edilmiş olan immobilize enzim sırasıyla farklı çaplara sahip iğne uçları 0.45x13 mm (insülin enjektör), 0,60x32 mm (mavi enjektör), 0.70x32 mm (siyah enjektör) ve 0.80x38 mm (yeşil enjektör) yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde, buz banyosu içinde bulunan 250 mM'lık CaCl₂ çözeltisine damlatıldı. 90 dk oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak süzülerek distile suyla yıkandı. Elde edilen boncukların çapları bir kumpas yardımıyla ölçüldü.

3.2.14.6 Boncuk Miktarı Optimizasyonu

Lipaz aktivite tayini yapılırken kullanılacak olan optimum boncuk miktarını belirlemek için; *B. thermocatenulatus* için % 20 jelatin ve % 2.5 sodyum alginat, *B. pumilus* MBB03 için % 25 jelatin ve % 2.5 sodyum alginattan oluşan jel karışımlarına 2 mL *B.thermocatenulatus* ve 3 mL *B. pumilus* MBB03 enzim çözeltisi eklendi. Elde edilen immobilize enzimler *B. thermocatenulatus* için 0.70x32 mm (siyah uçlu enjektör) yardımıyla, *B. pumilus* MBB03 için 0.80x38 mm (yeşil uçlu enjektör) yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde, buz banyosu içinde bulunan 250 mM'lık CaCl₂ çözeltisine damlatıldı. 90 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Aktivite tayinleri 0.01- 0.1 g arasında boncuk kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.15 *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 Lipazının Biyokimyasal Karakterizasyonu

Serbest ve alginat-jelatin karışımında immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazının kinetik özelliklerinin araştırmak için, belirlenen en iyi substrat kullanılarak optimum pH, sıcaklık, termal kararlılık, substrat spesifitesi, depo kararlılığı, *K_m* ve *V_{max}* kinetik sabitleri gibi bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi, ayrıca immobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği araştırıldı.

3.2.15.1 pH'ın Lipaz Aktivitesine Etkisi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının aktivitesi üzerine pH'ın etkilerini belirlemek amacıyla substrat olarak *B. thermocatenulatus* lipazı için *p*-nitrofenil dekonat ve *B. pumilus* MBB03 lipazı *p*-nitrofenil oktanat varlığında farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltiler kullanılarak oda ısısında belirlendi. Bunun için, 50 mM konsantrasyonda hazırlanan; pH 4.0-5.0 arasında asetat tamponu, pH 6,0-7,0 arasında KH_2PO_4 tamponu, pH 8.0-9.0 arasında Tris-HCl tamponu ve pH 10.0-12.0 arasında Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Tespit edilen optimum pH değerinden faydalanılarak substrat konsantrasyonunun, protein miktarının ve diğer parametrelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

3.2.15.2 Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının aktivitesi için optimum sıcaklık, substrat olarak *B. thermocatenulatus* lipazı için *p*-nitrofenil dekonat ve *B. pumilus* MBB03 lipazı *p*-nitrofenil oktanat kullanılarak optimum pH değerlerinde belirlendi. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 10 °C'lik artışlarla 10-100 °C aralığında sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. Tampon ve substrat çözeltisi karışımları, belirlenen optimum pH değerinde ve belirtilen sıcaklık aralığında 10 dakika inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar sıcaklığın fonksiyonu olarak grafiğe aktarıldı. Grafikte gözlenen tek pik optimum sıcaklık değeri olarak alındı.

3.2.15.3 Protein Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının lipazlarının en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonunu belirlemek üzere, lipaz aktivitesi *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 için sırasıyla *p*-nitrofenil dekonat ve *p*-nitrofenil oktanat substratı varlığında, enzimlerin 0.5–100 µg/mL konsantrasyon aralığında ölçüldü. Lipaz konsantrasyonunun değiştirilmesiyle enzim aktivitesinin değişimini incelemek ve aktivenin en yüksek olduğu optimum protein miktarını belirlemek amacıyla, önceden belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta ve sabit substrat konsantrasyonunda proteinin değişen miktarlarına karşılık aktivite değişimi ölçüldü ve elde edilen verilere göre lipaz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonu etkisi araştırılarak grafiğe geçirildi.

3.2.15.4 Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz enzimleri üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek üzere, enzimlerin aktivite gösterdiği en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, daha önceden belirlenen optimum pH, sıcaklık ve protein konsantrasyonunda enzim aktivitesi *B. thermocatenulatus* için *p*-nitrofenil dekonat ve *B. pumilus* MBB03 için *p*-nitrofenil oktaonat substratlarının 0.01-1 mM aralığında değişen miktarlarına karşı belirlendi. Enzim konsantrasyonu ise protein miktarı reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyon 30 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. Diğer parametrelerin belirlenmesinde ölçülen en yüksek hız değerindeki substrat konsantrasyonu kullanıldı. Elde edilen veriler grafiğe geçirilerek Lineweaver-Burk eğrisi kullanılarak her bir substrat için *K_m* (Michaelis sabiti) ve *V_{maks}* (maksimum hız) değerleri hesaplandı [128].

3.2.15.5 Substrat Spesifitesinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize lipazların substrat seçiciliğini belirlemek için paranitrofenol türevleri olan sentetik substratlar; *p*NPA (*p*-nitrofenil asetat, C2), *p*NPB (*p*-nitrofenil butirat, C4), *p*NPO (*p*-nitrofenil oktaonat, C8), *p*NPD (*p*-nitrofenil dekonat, C10), *p*NPL (*p*-nitrofenil laurat, C12) *p*NPM (*p*-nitrofenil meristat, C14), *p*NPP (*p*-nitrofenil

palmitat, C16) kullanıldı. Substratların asetonitril içerisinde 10 mM konsantrasyonunda hazırlanmış çözeltisi, etil alkol ve 50 mM fosfat tamponu ile (pH 7.5) 1:4:95 (v/v/v) oranında karıştırılarak substrat karışımı hazırlandı. Bu karışımdan 980 µL alındı ve içersine 20 µL serbest enzim çözeltisi, immobilize enzim için 0,0200 g boncuk ilave edildikten sonra oda sıcaklığında absorban değişimleri 405 nm dalga boyunda ölçüldü. Aktivite dakikada oda sıcaklığında 1 µmol *p*-nitrofenol açığa çıkarmak için gerekli enzim miktarı olarak belirlendi ve özgül aktivite mg protein başına düşen aktivite olarak hesaplandı.

3.2.15.6 pH Kararlılığının İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının pH kararlılığını belirlemek için enzim 50 mM konsantrasyonunda farklı pH 4-12 aralıklarında olan tamponlar içinde enzim-tampon karışımları +4 °C' de 15 gün boyunca inkübe edildikten sonra kalan enzim aktivitesi daha önce belirtilen standart reaksiyon koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanan ancak inkübasyona bırakılmamış enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bulunarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı.

3.2.15.7 Isıl Kararlılığın İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenuatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının sıcaklık kararlılığını belirlemek için enzim oda sıcaklığında 30 gün, 40, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda 15 ve 30 dakika inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde kalan enzim aktivitesi daha önce belirtilen standart reaksiyon koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayinleri yapıldı. *B. thermocatenuatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının kalan yüzde aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı.

3.2.15.8 Bazı Metal İyonlarının Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenuatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz enzimleri üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek üzere, reaksiyon ortamına nihai konsantrasyonları 0.1-1 mM arasında olacak şekilde bazı CaCl₂, NaCl₂, CuCl₂, KCl₂,

BaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, HgCl₂, NiCl₂, ZnSO₄, CuSO₄, CoSO₄, FeSO₄, MgSO₄, metal iyonlarının 100 mM'lık stok çözeltilerinden 0.1, 0.5, 1.0 mM'lık konsantrasyonlarda ilave edildi ve optimum şartlar altında lipaz aktivitesi ölçüldü. Hiçbir metal iyonu içermeyen deney ortamı kontrol olarak ve kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Metal iyonu içeren deney ortamının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi ve % bağıl aktivite hesaplandı.

3.2.15.9 Bazı Deterjanların Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenuatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz enzimleri üzerine bazı deterjanların etkisini incelemek üzere, iyonik deterjan olarak sodyum deoksikolat, sodyum taukolat ve sodyum dodesil sülfat, non-iyonik deterjan olarak Tween 80, Tween 20, Triton X-100, zwitteriyonik deterjan olarak CHAPS kullanıldı. Bu deterjanların %10' luk stok çözeltileri hazırlanarak reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları % 0.01-1 arasında olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Hiçbir deterjan içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edildi ve kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Deterjan içeren deney ortamının kontrole göre aktivite değişimleri belirlendi ve % bağıl aktivite hesaplandı.

3.2.15.10 Bazı Organik Çözücülerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenuatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz enzimleri üzerine bazı organik çözücü etkisini incelemek üzere etanol, metanol, isopropanol, n-bütanol, aseton, dimetilsülfoksit (DMSO), ksilen, dimetilformamid (DMF), gliserol kullanıldı. Bu organik çözücülerin % 10' luk stok çözeltileri hazırlanarak reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları % 0.01-1 arasında olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Hiçbir organik çözücü içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edildi ve kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Organik çözücü içeren deney ortamının kontrole göre aktivite değişimleri belirlendi ve % bağıl aktivite hesaplandı.

3.2.15.11 Bazı Kimyasal ve İnhibitör Maddelerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz enzimleri üzerine bazı kimyasal ve inhibitörün etkisini incelemek üzere, fenil metil sülfonil florür (PMSF), β -merkaptoetanol, 1,4-dithiothreitol (DTT), EDTA 10 mM stok çözeltileri hazırlanarak reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0.01-1mM arasında olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Hiçbir kimyasal ve inhibitör madde içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edildi ve kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Metal iyonu içeren deney ortamının kontrole göre aktivite değişimleri belirlendi ve % bağıl aktiviteler hesaplandı.

3.2.15.12 İmmobilize Lipazın Tekrar Kullanılabilirliği

Alginat+jelatin jel karışımında immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için sırasıyla 0.003 ve 0.004 g boncuk tartıldı. 0.5 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.2) hazırlanan substrat çözeltisi yardımıyla reaksiyon aseton-etanol karışımıyla durdurulmaksızın immobilize enzim reaksiyon ortamından süzülerek aktivite tayini yapıldı. Boncukların lipaz aktivitesi kayboluncaya kadar aktivite tayinleri tekrarlandı.

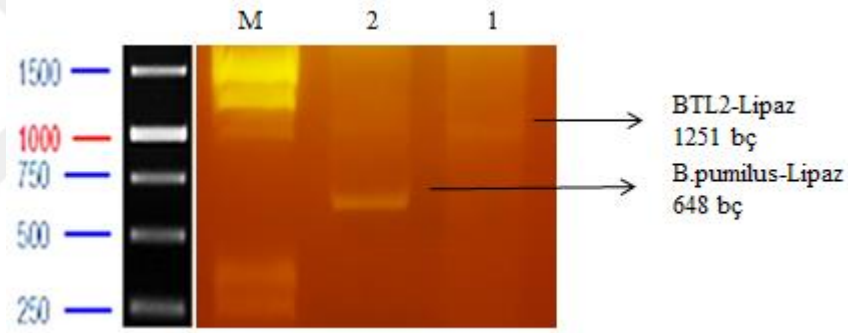
3.2.15.13 İmmobilize Lipazın Depo Kararlılığı

İmmobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının depo kararlılığını belirlemek amacıyla; immobilize enzimin aktivite tayinleri iki gün aralıklarla toplamda 30 gün süreyle gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1 BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 Lipaz Geninin PCR ile çoğaltılması

B. thermocatenuatus ve *B. pumilus* MBB03 lipaz geni NCBI BLAST programına göre hazırlanan ileri ve geri primerler kullanılarak PCR ile özgül amplicon verecek şekilde çoğaltılmıştır. PCR ile oluşan DNA fragmanı büyüklük tayini için 1 kb moleküler DNA belirteci varlığında % 1' lik agaroz jele yüklenmiştir. Çizelge 3.2.2b' de gözleendiği gibi 55 °C tutunma sıcaklığında ve 100 ng kalıp DNA kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucu sırasıyla yaklaşık sırasıyla 1251 bç ve 648 bç uzunluğunda özgül lipaz fragmanları gözlenmiştir (Şekil 4.1). Moleküler DNA belirteçleri ile karşılaştırılarak boyutları doğrulanan DNA fragmanı, daha sonraki klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4.1 PCR ile çoğaltılan BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 lipaz geninin %1' lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

M) DNA belirteci 1) BTL2-lipaz geni, 2) *B. pumilus* MBB03 lipaz geni.

4.2 PCR Ürününün Saflaştırılması

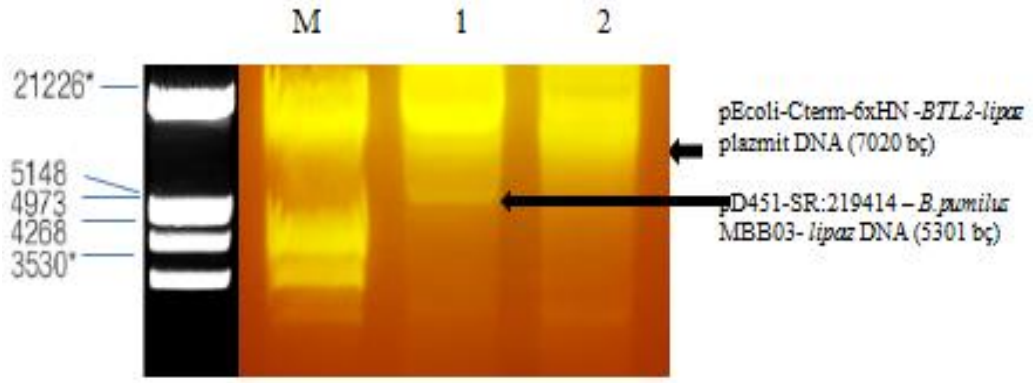
Agaroz jel görüntüsü sonucu PCR ile çoğaltılan genin doğru yerde olduğu ve istenmeyen bantlar olmadığı belirlendikten sonra PCR ürünü PCR ürünü saflaştırma kiti (GF-I, GeneON) kullanılarak saflaştırılmıştır.

4.3. pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 Klonlama Vektörlerinin Ligasyona Hazırlanması

Bu vektörler, klonlama, ekspresyon ve saflaştırma basamaklarında sağladığı kolaylıklardan dolayı ve klonlama bölgesinin 5' ucunda His-Tag bölgesini içermesinden dolayı seçilmiştir. *B. thermocatenulatus*-lipaz geninin klonlanması için pEcoli-Cterm-6xHN, Sal I ve HindIII enzimleri ile *B. pumilus* MBB03-lipaz geninin klonlanması için pD451-SR:219414, SapI ve Tip IIs enzimleri ile kesilerek yapışkan uçlar içeren lineer DNA haline getirilmiştir. Restriksiyon enzimleri ile yapılan kesimlerden elde edilen yapışkan uçlara sahip doğrusal pEcoli-Cterm-6xHN DNA'sı ve pD451-SR:219414 DNA'sı saflaştırma kiti (GF-I, GeneON) kullanılarak saflaştırılmıştır ve daha sonra ligasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

4.4 Lipaz Genlerinin pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 Vektörüne Ligasyonu

PCR ile çoğaltılan, 5' ve 3' uçlarında sırasıyla Sal I ve HindIII için kesim bölgeleri içeren ~1251 bç uzunluğundaki lipaz gen fragmanı, aynı kesim bölgelerinden kesilmiş yaklaşık 5769 bç uzunluğundaki klonlama vektörü pEcoli-Cterm-6xHN ve yine aynı şekilde 5' ve 3' uçlarında sırasıyla SapI ve Tip IIs için kesim bölgeleri içeren ~648 bç uzunluğundaki lipaz gen fragmanı, aynı kesim bölgelerinden kesilmiş yaklaşık 4653 bç uzunluğundaki klonlama vektörü pD451-SR:219414 vektörlerine ligasyon ile bağlanmıştır (Şekil 4.4). Elde edilen rekombinant vektörler *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır.



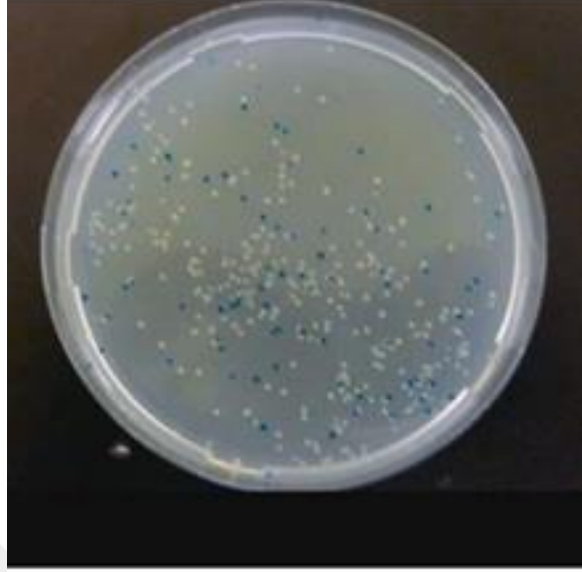
Şekil 4.4. pEcoli-Cterm-6xHN -BTL2-lipaz plazmit DNA' s1 ve pD451-SR:219414- *B. pumilus* MBB03-lipaz DNA' s1 %1' lik agaroz jel görüntüsü.

M) DNA belirteci 1) pD451-SR:219414-*B. pumilus* MBB03- lipaz plazmit DNA' s1 2) pEcoli-Cterm-6xHN-BTL2-lipaz plazmit DNA' s1

4.5 Transformasyon ve Transformanların Seçimi

Ligasyon ürünü, daha önceden hazırlanan ve -80 °C' de saklanan *E. coli* BL21 (DE3) kompetan hücrelerine steril ortamda ve buz üzerinde yapılan ısı şok çalışma ile aktarılmıştır. Transformasyonun kontrol transformasyonu (KT) için pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414, ligasyon transformasyonu (LT) için ise halkasal formda bulunan pEcoli-Cterm-6xHN/Sal I-HindIII ve pD451-SR:219414/ SapI-Tip IIs plazmiti kullanılmıştır. Transformasyon için buz üzerinde eriyen 50 µL kompetent hücrelerinden Ligasyon Transformasyonuna (LT) ligasyon karışımından 5 µL eklenerek dikkatlice karıştırıldı ve tüp 30 dk buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında daha önceden hazırlanan 42 °C' de ısıtıcı blokta 30 saniye inkübe edilerek ısı şoku uygulanmış ve plazmidin kompeten hücre içine geçmesi sağlanmıştır. Bu işlem sonunda tüp üzerine 250 µL LB eklendi ve ardından 37 °C' de 150 rpm' de çalkalamalı inkübatörde 1 saat inkübe edildikten sonra daha önceden hazırlanmış LB petrilere (100 mg/mL ampisilin ve 50 mg/mL kanamisin içeren) X-gal ve IPTG ile yayılarak 37 °C' de 1 gece inkübe edildi. pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414 ekspresyon vektör sisteminde *lac* operon sistemi bulunduğundan X-gal ve IPTG kullanarak mavi-beyaz koloni oluşturma imkanı sağlandı. Bu şekilde ampisilin ve kanamisin içeren LB besiyerinde büyüeyebilen

E. coli BL21 (DE3) hücre kolonilerinin recombinant plazmit içerip içermediklerinin saptanması için mavi-beyaz koloni seçimi yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Mavi-Beyaz koloni seçimi.

Mavi renk; recombinant plazmit içermeyen koloniler, beyaz renk; recombinant plazmit içeren koloniler.

Bu koloniden elde edilen rekombinant pEcoli-Cterm-6xHN-lipaz plazmit varlığı SalI ile HindIII restriksiyon ve pD451-SR:219414-lipaz plazmid varlığı SapI ile Tip IIs restriksiyon endonükleaz kesimleri ile de doğrulanmıştır. Buna göre Şekil 4.4' de görüldüğü gibi pEcoli-Cterm-6xHN-lipaz DNA'sı, yaklaşık 5769 bç pEcoli-Cterm-6xHN ve 1251 bç BTL2-lipaz toplam uzunluğunda yaklaşık 7020 bç uzunluğunda tek bant ve pD451-SR:219414-lipaz DNA sı yaklaşık 4653 bç ve 648 bç *B. pumilus* MBB03-lipaz toplam yaklaşık 5201 bç uzunluğunda tek bant görüntülenmiştir.

Koloni BTL2-lipaz ve *B. pumilus* MBB03-lipaz genini içerdiği belirlenen rekombinant pEcoli-Cterm-6xHN-BTL2-lipaz ve pD451-SR:219414-*B. pumilus* MBB03-lipaz plazmiti sonraki ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri transforme olmuştur. Ayrıca bu kolonilerden enzim izolasyonu yapılarak lipaz aktivitesi kontrol edildi. Aktivitesi gözlemlendikten sonra enzim çalışmalarına başlandı.

4.6 Klonlanan Lipaz DNA'sının Nükleotit Dizilerinin Karşılaştırılması

Lipaz DNA' sını içeren pEcoli-Cterm-6xHN-BTL2-lipaz ve pD451-SR:219414-*B.pumilus* MBB03-lipaz plazmiti, genlerine ait ileri ve geri primerler ile elde edilen diziler BLAST yapılarak NCBI'daki DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. pEcoli-Cterm-6xHN-BTL2-lipaz ve pD451-SR:219414-*B. pumilus* MBB03-lipaz için DNA dizisi Şekil 4.6a ve 4.6b' de görülmektedir.

```
ATGATGAAAGGCTGCCGGGTGATGGTTGTGTTGCTTGGATTATGGTTTGTGTTTCGGC
CTGTCGGTCCCAGGGAGGGCGGACGGAAGCGGCATCCCCACGCGCCAATGATGCAC
CCATCGTGCTTCTCCATGGGTTTACAGGATGGGGGCGAGAGGAAATGCTTGGATTC
AAATATTGGGGCGGCGTGC GTGGCGATATCGAACAAATGGCTGAACGACAACGGAT
ATCGTACGTATACGCTGGCGGTTCGACCGCTCTCGAGCAACTGGGACCGGGCGTGT
GAAGCGTACGCCAGCTTGTCGGCGGAACGGTCGATTATGGCGCGGCCCATGCGGC
GAAGCACGGTCATGCGCGGTTTGGCCGCACGTATCCGGGCTTGCTGCCGGAATTGA
AAAGAGGCGGCCGCGTCCATATCATCGCTCATAGCCAAGGAGGACAGACGGCCCG
CATGCTTGTGTCTCTCCTAGAGAACGGAAGCCAAGAAGAGCGGGAGTACGCCAAG
GCGCATAACGTGTCGTTGTCGCCGTTGTTTGAAGGCGGACATCATTTTGTGTTGAGT
GTGACAACCATTGCCACTCCTCATGACGGGACGACACTTGTCAATATGGTCGATTTTC
ACTGATCGCTTCTTTGACCTGCAAAAAGCGGTGTTGAAAGCGGGCGGCTGTCGCCAG
CAATGTGCCGTACACGAGTCAAGTATACGATTTTAAGCTCGACCAATGGGGGCTGC
GCCGCCAGCCGGTGAATCGTTTCGACCATTATTTGAAACGGCTCAAACGATCCCCT
GTTTGGACGTCGACGGATACTGCCCGCTACGATTTATCCATTCCCGGAGCTGAGAA
GTTGAATCAATGGGTGCAAGCCAGCCGAATACGTATTATTTGAGCTTTTCCACCG
AACGGACGCACCGCGGAGCGCTCACCGGCAACTATTATCCCGAACTCGGAATGAAT
GCATTACGCGCGGTTCGTATGCGCCCCGTTTCTCGGCTCGTACCGCAATGAGGGCGCTC
GGCATTGACGACCGCTGGCTGGAGAACGATGGCATCGTCAACACGGTTTTCGATGAA
CGGTCCAAAGCGTGGATCAAGCGATCGGATCGTGCCGTATGACGGGACGTTGAAA
AAAGGAGTTTGAATGATATGGGGACGTGCAACGTCGACCATTTGGAAGTGATCGG
CGTTGACCCGAATCCGTCATTTGATATCCGCGCCTTTTATTTGCGACTTGCCGAGCA
GTTGGCGAGTTTGC GGCCCT
```

Şekil 4.6a BTL2-lipaz genine ait anlamlı DNA zinciri.

```
ATGAAAGTGATGTTTGTAAAGAAAAGGAGTTTGCAAATTCTCATTGCGCTTGCATTG
GTGATTGGTTCAATGGCTTTTATCCAGCCGAAAGAGGTGAAGGCGGCTGAGCATAA
TCCGGTTGTGATGGTACACGGCATTGGCGGTGCCTCTTATAACTTTTTTCTATTAA
AAGTTATTTGGCCACACAAGGCTGGGATCGAAACCAATTGTATGCTATCGATTTC
TAGACAAAACAGGAAATAACCGCAACAATGGTCCGCGTCTATCCAGATTCGTCAA
GATGTGTTAGACAAAACGGGTGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGCTCATAGTATGGG
CGGAGCGAACACATTATACTATATTAAGAATCTAGATGGCGGCGATAAAATTGAAA
ACGTTGTCACAATTGGTGGAGCAAACGGACTCGTTTCAAGCAGAGCATTACCAGGC
ACAGATCCAAATCAAAAAATTCTTTACACATCTGTCTACAGCTCAGCTGATCTCATC
GTCGTCAACAGCCTCTCTCGTTTAATTGGCGCAAGAAACGTTCTGATCCATGGCGTT
GGCCATATCGGTCTATTAACCTCAAGCCAAGTGAAAGGCTACATTAAGAAGGACT
GAACGGCGGA GGACAGAATACGAATTAA
```

Şekil 4.6b *B. pumilus* MBB03-lipaz genine ait anlamlı DNA zinciri.

Analizler sonucu klonlanan BTL2 lipaz genine ait DNA'nın daha önce Schmidt-Dannert ve arkadaşları [61] tarafından rapor edilen *B. thermocatenulatus* genomundaki (NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) lipaz (Gen ID:1321705:106-1374) nolu *B. thermocatenulatus* triaçilglicerol lipase geni dizisine benzerlik gösterdiği açığa çıkarılmıştır. Saflaştırılan PCR ürünleri Sanger dizileme yöntemiyle çift yönlü dizilenmiştir. Dizi analizleri ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizilerin kalitesi 4 peaks yazılımı (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>) ile kontrol edilmiştir. Dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlenmiştir. Bu dizi, GenBank'te bulunan 1321705:106-1374 nolu *B. thermocatenulatus* triaçilglicerol lipase geni dizisine % 100 benzerlik göstermektedir.

B. pumilus MBB03- lipaz genine ait DNA'nın daha önce Kim ve arkadaşları tarafından [129] rapor edilen *B. pumilus* genomundaki (NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) lipaz (Gen ID:215414329:121-768) nolu *Bacillus pumilus* triaçilglicerol lipaz geni dizisine benzerlik gösterdiği açığa çıkarılmıştır. Dizi

analizleri ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizilerin kalitesi 4peaks yazılımı (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>) ile kontrol edilmiştir. Dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen DNA dizisi yukarıda verilmiştir. Bu dizi, GenBank'te bulunan 215414329:121-768 nolu *Bacillus pumilus* triacylglycerol lipase geni dizisine % 100 benzerlik göstermektedir.

4.7 Lipaz Gen Ekspresyonu

Protein ekspresyonu için lipaz genini taşıyan pEcoli-Cterm-6xHN-BTL2-lipaz ve pD451-SR:219414-*B. pumilus* MBB03-lipaz ekspresyon vektörü *E. coli* BL21 (DE3) konakçı hücrelerine transforme edilmiştir. Lipaz genini içeren rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) kolonilerinden LT ve KT için ayrı ayrı yürütülecek şekilde rekombinant kolonilerden bir tanesini alındı ve 1mL LB-Amp ve LB-kanamisin sıvı besi yerinde 37 °C' de çalkalayarak gece aşırı inkübe edildi. Gece aşırı kültür 20 mL LB-Amp ve 20 mL LB-kanamisin sıvı besi yerine transfer edildi. İkincil kültürler, 37 °C' de, OD₆₀₀=0.6 oluncaya kadar inkübasyona bırakıldı. Protein ekspresyonunun en yüksek olduğu zamanı belirlemek amacıyla hücreler IPTG ile uyarıldıktan sonra farklı zamanlarda örnekler alındı. OD₆₀₀=0.6' a ulaştığında 200 µL (100 mM) IPTG eklenerek uyarıldı. Uyarılan hücreler 5 saat boyunca 37 °C' de çalkalayarak inkübasyona bırakıldı.

4.8 Lipaz Saflaştırılması

E. coli BL21 (DE3) konakçı hücrelerinde eksprese edilen BTL2-lipaz ve *B. pumilus* MBB03-lipaz proteinini bulandıran hücre özütleri 5 mL hacimli His60 Ni Gravity kolonunda 5 mL hacimli Ni-NTA kolonu kullanılarak tek basamakta hücre özütünden saflaştırılmıştır. Lipaz proteini içeren 10 mL hücre özütü kolona yüklendikten sonra kolona bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kolon yıkama tamponu ile yıkanmış ve kolona bağlı 6xHis-lipaz proteinleri 20-200 mM imidazol

içeren tampon yardımı ile Ni-NTA kolonundan toplanmıştır. Saflaştırma işlemlerinde toplanan fraksiyonlar % 12.5' lik SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Saf olarak elde edilen proteinler aktivite deneylerinde kullanılmak üzere -80 °C' de saklanmıştır.

4.9. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

Elde edilen proteinlerin miktarları Bradford yöntemi ile Bölüm 3.2.10' da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Protein miktar tayininde BTL2-lipaz protein konsantrasyonu 0.240 mg/mL, özgül aktivitesi 10.9 U/mg ve *B. pumilus* MBB03-lipaz protein konsantrasyonu ise 0.224 mg/mL özgül aktivitesi 4.6 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 *B. thermocatenulatus* BTL2 ve *B. pumilus* MBB03' ten saflaştırılan lipaz enzimine ait saflaştırma tablosu.

		Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Özgül Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
A	Ham Enzim Özütü	300	8.23	2468.4	1.61	483	0.196	1	100
	Ni-NTA Afinite Kolon	126	0.240	30.24	2.619	329.9	10.91	55.67	68
B	Ham Enzim Özütü	300	7.54	2262.6	0,57	171	0.076	1	100
	Ni-NTA Afinite Kolon	118	0,224	26.432	1.023	120.753	4,57	60,43	70,6

A: *B. thermocatenulatus* BTL2, B: *B.pumilus* MBB0

4.10 Elektroforez

Saflaştırma işlemlerinde toplanan fraksiyonlar Laemmli [125] yöntemine göre % 5' yığıma jeli ve % 12' lik ayırma jeli kullanılarak SDS-PAGE' de yürütülmüştür (Çizelge 3.2.11). Kullanılan standart markerlar referans alınarak BTL2 lipazının molekül ağırlığı

~43 kDa *B. pumilus* MBB03 lipazının molekül ağırlığı ~22 kDa olarak belirlendi (Şekil 4.10).

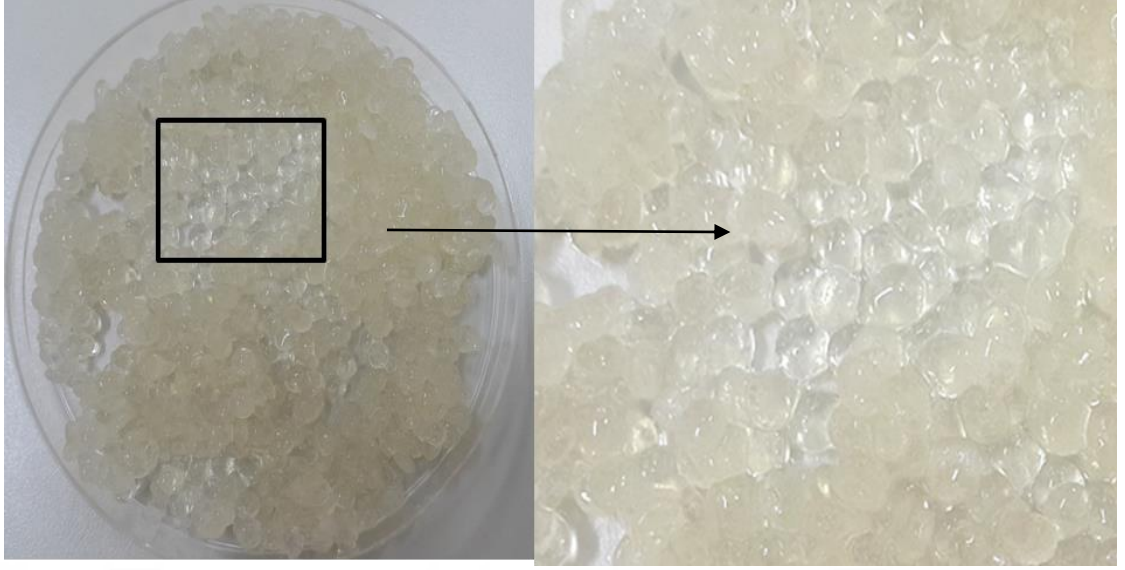


Şekil 4.10 BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 lipaz SDS-PAGE elektroforezi.

M) Protein belirteci 1) BTL2-lipazın Ni-NTA kolon saflaştırma öncesi 2) saflaştırma sonrasındaki SDS-PAGE görüntüsü. 3) *B. pumilus* MBB03-lipazın Ni-NTA kolon saflaştırma öncesi 4) saflaştırma sonrasındaki SDS-PAGE görüntüsü.

4.11 Alginat+Jelatin Jelde Tutuklanma

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jelde tutuklanma Bölüm 3.2.13' de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Şekil 4.11' de *B.thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklanması ile elde edilen boncuklar görülmektedir.



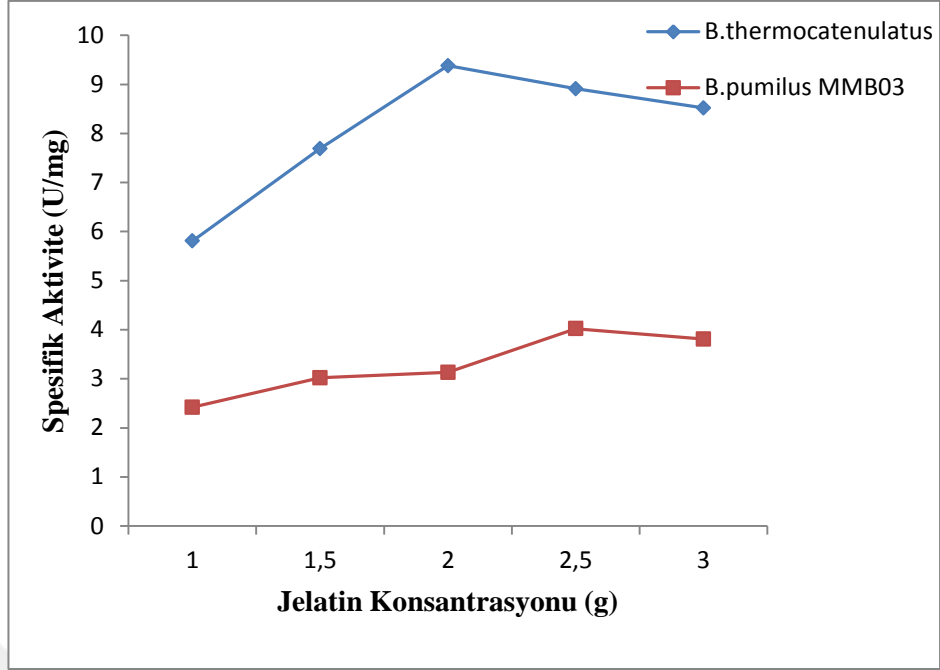
Şekil 4.11 *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklanması ile elde edilen boncuklar.

4.12 İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

4.12.1 Jelatin Konsantrasyonunun Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının immobilizasyonunda kullanılacak optimum jelatin konsantrasyonunun belirlenmesi için % 10, 15, 20, 25, 30 (w/v) konsantrasyonlarda hazırlanan jelatin jellerde immobilizasyonlar Bölüm 3.2.14.1’ de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen boncuklarla yapılan aktivite tayinlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.12.1’ de verilmiştir.

Yapılan protein tayini ve immobilize lipazın aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; en yüksek enzim aktivitesi *B. thermocatenulatus* % 20 (2 g) jelatin ve *B. pumilus* MBB03 için % 25 (2.5 g) jelatin konsantrasyonunda gözlemlendi. Bundan sonraki immobilizasyonlarda jelatin konsantrasyonunun % 20 ve % 25 olarak çalışılmasına karar verildi.

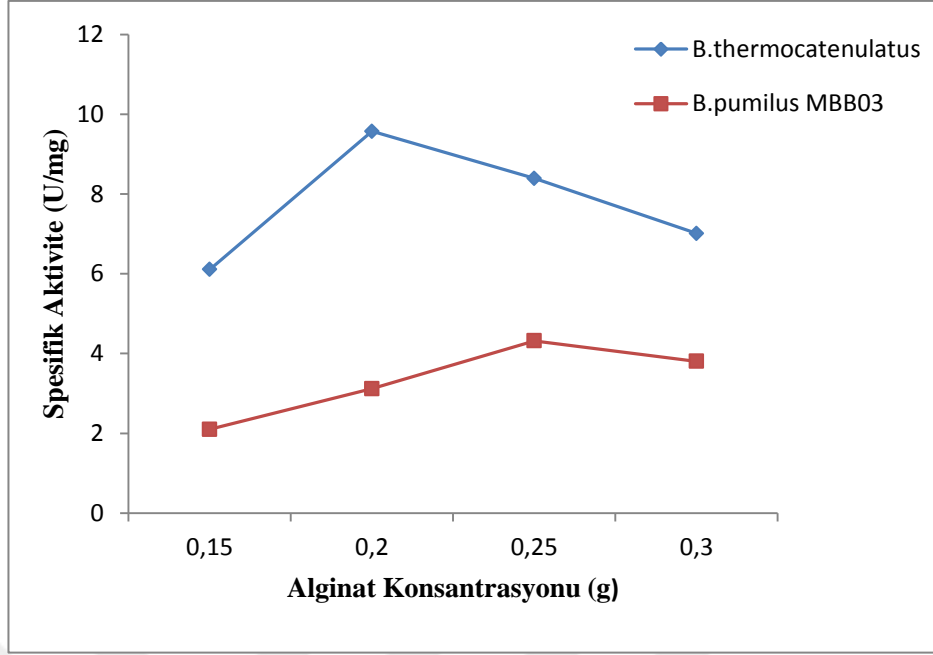


Şekil 4.12.1 *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna jelatin konsantrasyonunun etkisi.

4.12.2 Alginat Konsantrasyonu Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazı immobilizasyonunda kullanılacak optimum sodyum alginat miktarını belirlemek için % 1.5, % 2, % 2.5, % 3 (w/v) konsantrasyonlarda hazırlanan alginat jellerde immobilizasyonlar Bölüm 3.2.14.2' de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen boncuklarla yapılan aktivite tayinlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.12.2' de verilmiştir.

Yapılan protein tayini ve immobilize lipazın aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; en yüksek enzim aktivitesi *B. thermocatenulatus* için % 2 (0.2 g) ve *B. pumilus* MBB03 için % 2.5 (0.25 g) alginat konsantrasyonunda gözlemlendi. Bundan sonraki immobilizasyonlarda alginat konsantrasyonunun % 2 ve % 2.5 olarak çalışılmasına karar verildi.

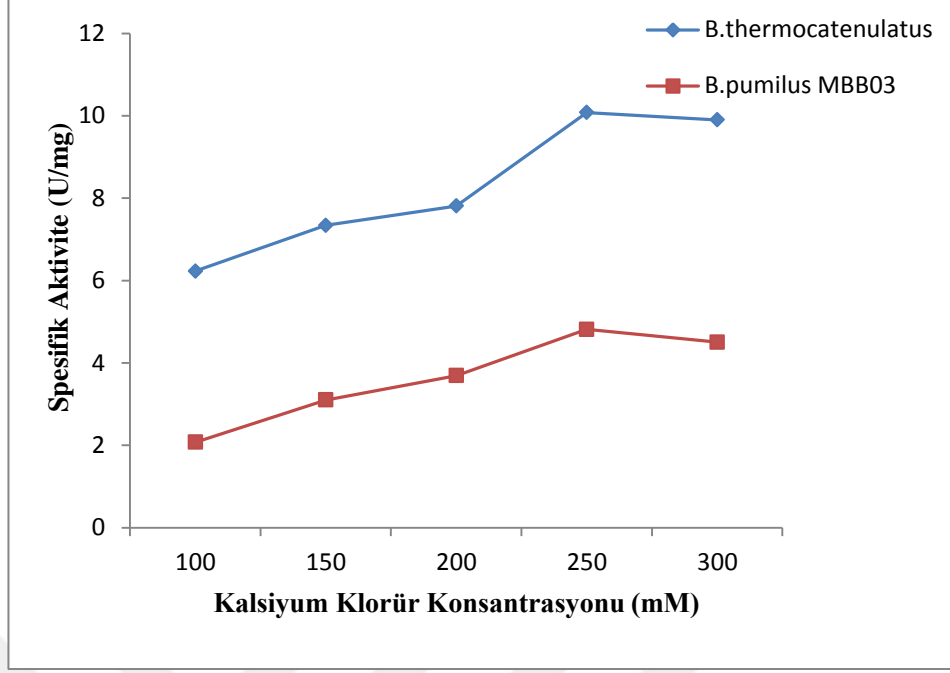


Şekil 4.12.2 *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna alginat konsantrasyonunun etkisi.

4.12.3 Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımları immobilizasyonunda kullanılacak optimum kalsiyum klorür konsantrasyonunun belirlenmesi için 100, 150, 200, 250, 300 mM konsantrasyonlarda hazırlanan CaCl_2 damlatma çözeltileri ile oluşturulan jelatin jellerde immobilizasyonlar Bölüm 3.2.14.3' de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen boncuklarla yapılan aktivite tayinlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.12.3' de verilmiştir.

Yapılan protein tayini ve immobilize lipazın aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazları için en yüksek enzim aktivitesi 250 mM kalsiyum klorür konsantrasyonunda gözlemlendi. Bundan sonraki immobilizasyonlarda kalsiyum klorür konsantrasyonunun 250 mM olarak çalışılmasına karar verildi.

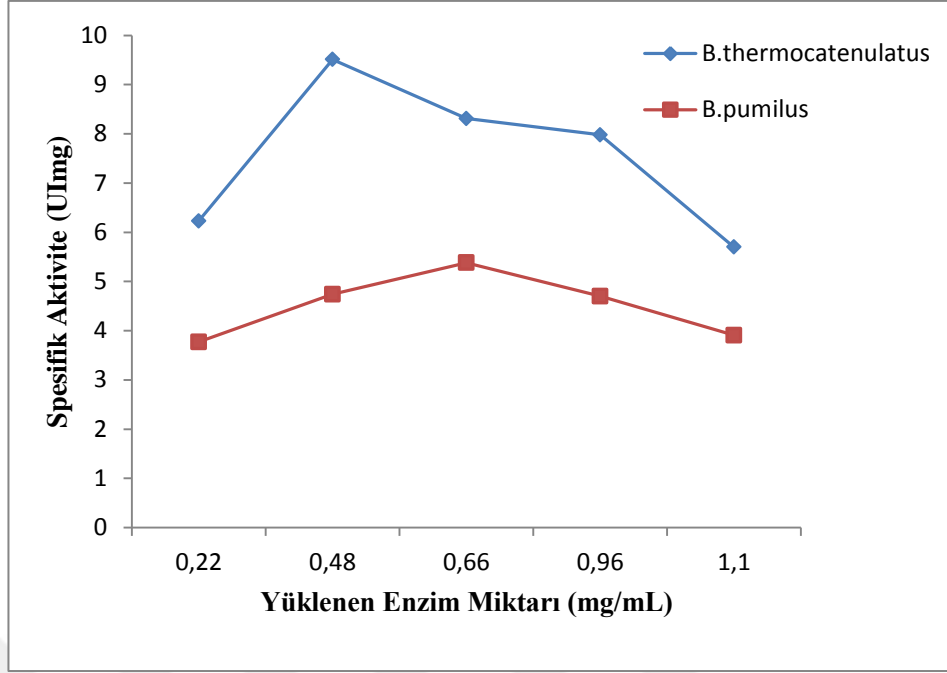


Şekil.4.12.3 *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna CaCl₂ konsantrasyonunun etkisi.

4.12.4 Enzim Miktarı Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonunda optimum enzim konsantrasyonunun belirlenmesi için sırasıyla (0.48 mg/mL, 0.44 mg/mL) olacak şekilde enzim çözeltisinden 1, 2, 3, 4, 5' er mL alınarak immobilizasyonlar Bölüm 3.2.14.4' de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Elde edilen boncukların aktivitelerini gösteren grafikler çizildiğinde en yüksek aktivite *B. thermocatenulatus* 2 mL ve *B. pumilus* MBB03 3 mL enzim kullanılarak yapılan immobilizasyonda gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12.4' de verilmiştir.

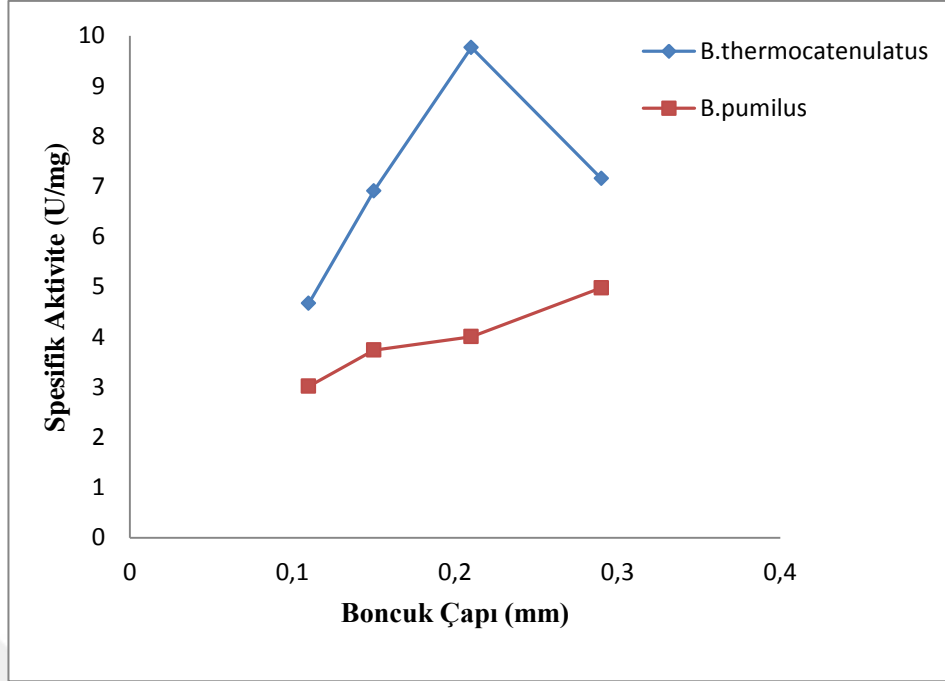


Şekil 4.12.4 *B.thermocatenulatus* ve *B.pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna enzim konsantrasyonunun etkisi.

4.12.5 Boncuk Boyutu Optimizasyonu

B.thermocatenulatus ve *B.pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımları immobilizasyonunda boncuk boyutu optimizasyonu için; farklı iğne çaplarına sahip 0.45x13 mm (insülin enjektör), 0,60x32 mm (mavi enjektör), 0.70x32 mm (siyah enjektör) ve 0.80x38 mm (yeşil enjektör) iğne ucu kullanılarak Bölüm 3.2.14.5' de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Elde edilen boncukların kumpasla yapılan ölçümlerde 10 adet boncuk çapının ortalaması alınarak boncukların çapları *B.thermocatenulatus* için sırasıyla 0.11 mm, 0.15 mm, 0.19 mm ve 0.25 mm olarak, *B. pumilus* MBB03 için sırasıyla 0.15 mm, 0.2 mm, 0.21 mm ve 0.29 mm olarak berilendi. En yüksek enzim aktiviteleri *B.thermocatenulatus* için 0.70x32 mm (siyah uçlu enjektör), *B. pumilus* MBB03 0.80x38 mm (yeşil uçlu enjektör) kullanılarak elde edilen boncuklarla elde edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12.5' de verilmiştir.

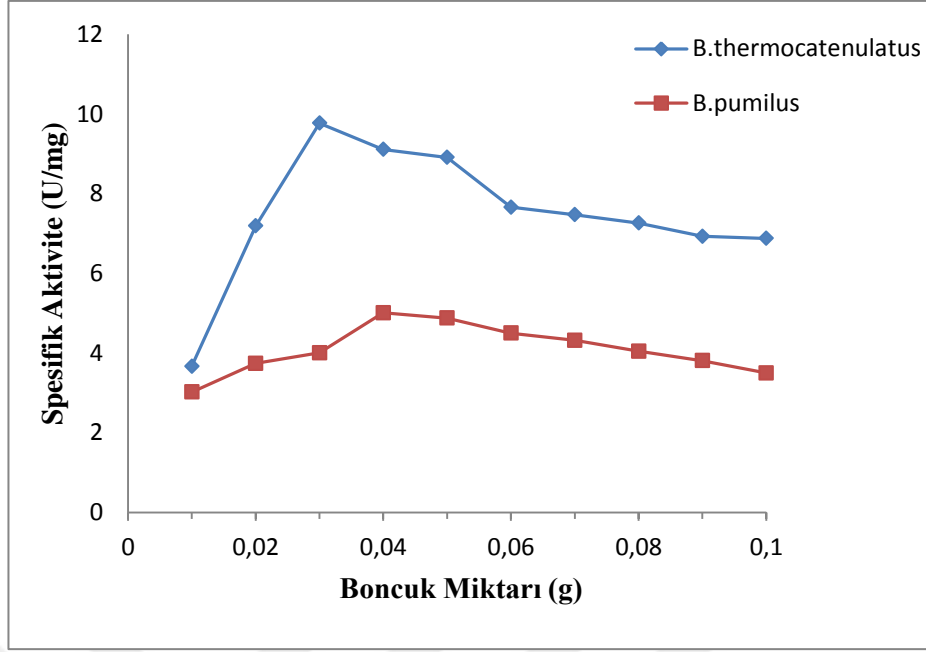


Şekil 4.12.5 *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna boncuk boyutunun etkisi.

5.12.6 Boncuk Miktarı Optimizasyonu

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımları immobilizasyonunda elde edilen boncukların lipaz aktivite tayinleri yapılırken kullanılacak olan optimum boncuk miktarını belirlemek için; 0.01-0.1 g arasında boncuk kullanılarak Bölüm 3.2.14.6' da belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlarda optimum boncuk miktarı *B. thermocatenulatus* 0.03 g, *B. pumilus* MBB03 0.04 g olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12.6'da verilmiştir.



Şekil 4.12.6 *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonuna boncuk miktarı etkisi.

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyon koşulları Çizelge 4.12’ de gösterildiği gibi optimize edilmiştir.

Çizelge 4.12. *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklanmasının optimizasyon sonuçları

Optimize Edilen İmmobilizasyon Koşulu	<i>B. thermocatenulatus</i> Optimum Sonuç	<i>B. pumilus</i> MBB03 Optimum Sonuç
Jelatin Konsantrasyonu	% 20	% 25
Alginat Konsantrasyonu	% 2	% 2.5
CaCl ₂ Konsantrasyonu	250 mM	250 mM
Enzim Miktarı	2mL (0.48 mg/mL)	3 mL (0.66 mg/mL)
Boncuk Boyutu	0.19 mm	0.29 mm
Boncuk Miktarı	0.03g	0.04g

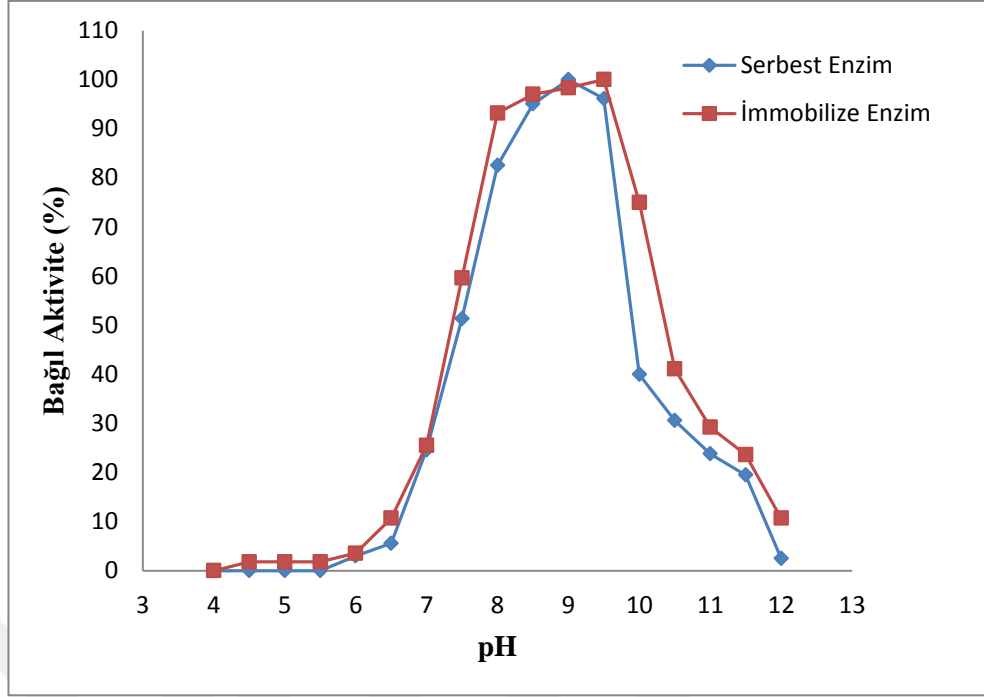
Alginat+jelatin jelde *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazları immobilize edilirken de boncuklar yukarıdaki optimizasyon koşullarında hazırlandı. Çalışmanın devamında bu optimum koşullarda elde edilen immobilize boncukların optimum pH, optimum sıcaklık, termal ve depo kararlılığı, substrat konsantrasyonu, yeniden kullanılabilirlik gibi bazı biyokimyasal özellikleri çalışıldı ve serbest enziminki ile karşılaştırıldı.

4.13 Serbest ve Alginat+jelatin jelde Tutuklu *B. thermocatenulatus* (BTL2) ve *B.pumilus* MBB03 Lipazının Biyokimyasal Karakterizasyonu

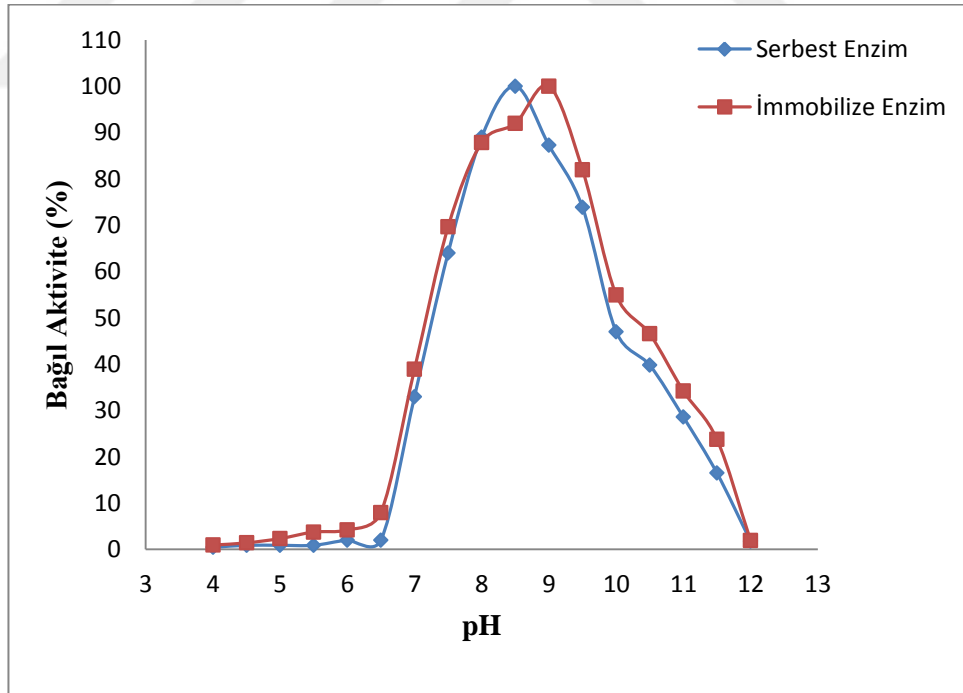
Serbest ve alginat-jelatin karışımında immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* lipazının optimum pH, sıcaklık, termal kararlılık, substrat spesifitesi, depo kararlılığı, Km ve Vmax kinetik sabitleri gibi bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi, ayrıca immobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği araştırıldı.

4.13.1 pH' ın Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipazının optimum pH değerini belirlemek üzere farklı pH' larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak *B. thermocatenulatus* lipazı için *p*-nitrofenil dekonat ve *B.pumilus* MBB03 lipazı için *p*-nitrofenil oktaonat kullanılarak Bölüm 3.2.15.1' de belirtildiği şekilde belirlendi. Elde edilen aktivite sonuçları doğrultusunda serbest ve immobilize enzim için aktivite-pH grafiği oluşturuldu (Şekil 4.13.1a-Şekil 4.13.1b). *B. thermocatenulatus* lipazının serbest enzim için optimum pH 9.0 immobilize enzim için optimum pH 9.5 olarak belirlendi. *B. pumilus* MBB03 lipazının serbest enzim için optimum pH 8.0 immobilize enzim için optimum pH 8.5 olarak belirlendi.



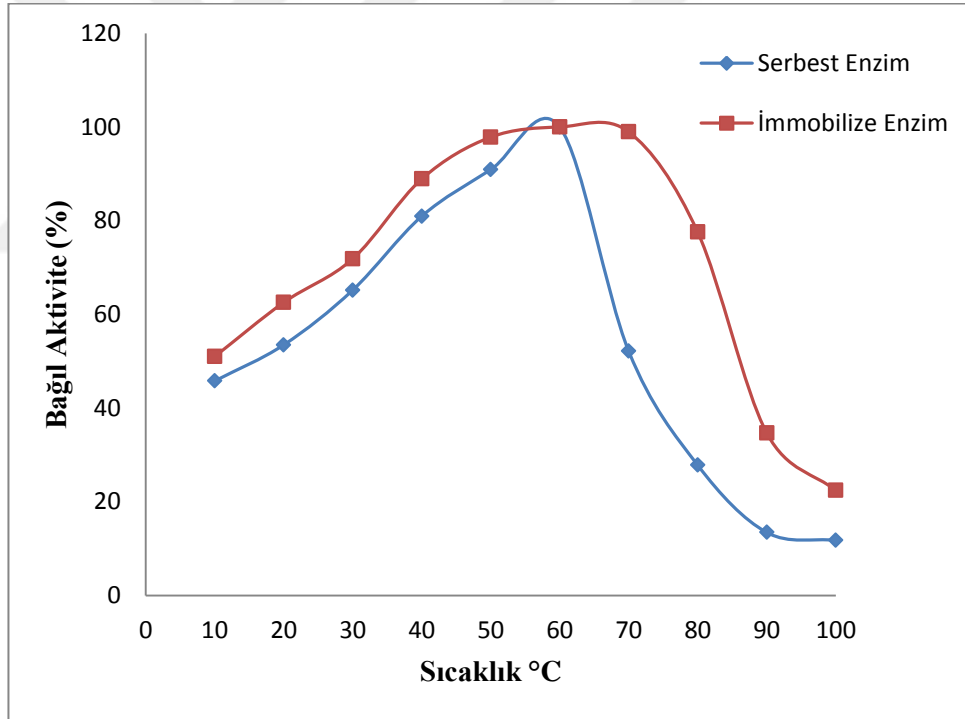
Şekil 4.13.1a *B. thermocatenulatus* serbest ve immobilize lipaz enzim aktiviteleri üzerine pH' ın etkisi.



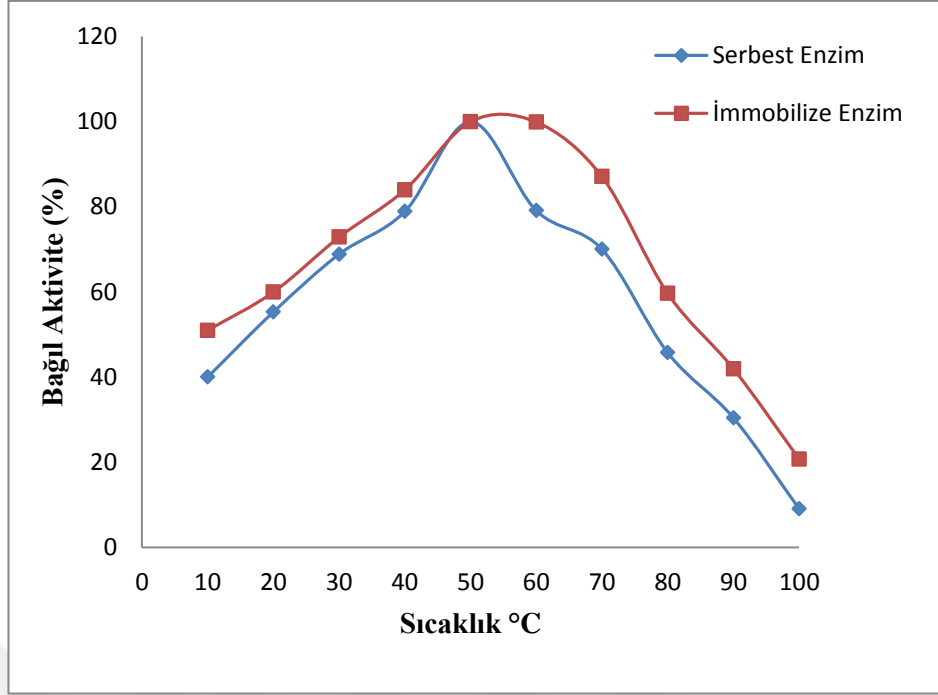
Şekil 4.13.1b. *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz enzim aktiviteleri üzerine pH' ın etkisi.

4.13.2 Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla belirlenen optimum pH değerlerinde substrat olarak *B. thermocatenulatus* lipazı için *p*-nitrofenil dekonat ve *B. pumilus* MBB03 lipazı için *p*-nitrofenil oktaonat kullanılarak Bölüm 3.2.15.2’ de belirtildiği şekilde ölçümler yapıldı ve yapılan 10 dakika inkübasyon sonucunda elde edilen veriler sıcaklığın fonksiyonu olarak grafiğe aktarılarak optimum sıcaklık değeri belirlendi. Optimum çalışma sıcaklığı *B. thermocatenulatus* lipazının serbest enzim için 60 °C immobilize enzim için 60-70 °C olarak belirlendi. *B. pumilus* MBB03 lipazının serbest enzim için optimum sıcaklık 50 °C immobilize enzim için optimum optimum sıcaklık 55 °C olarak belirlendi (Şekil 4.13.2a-Şekil4.13.2b).



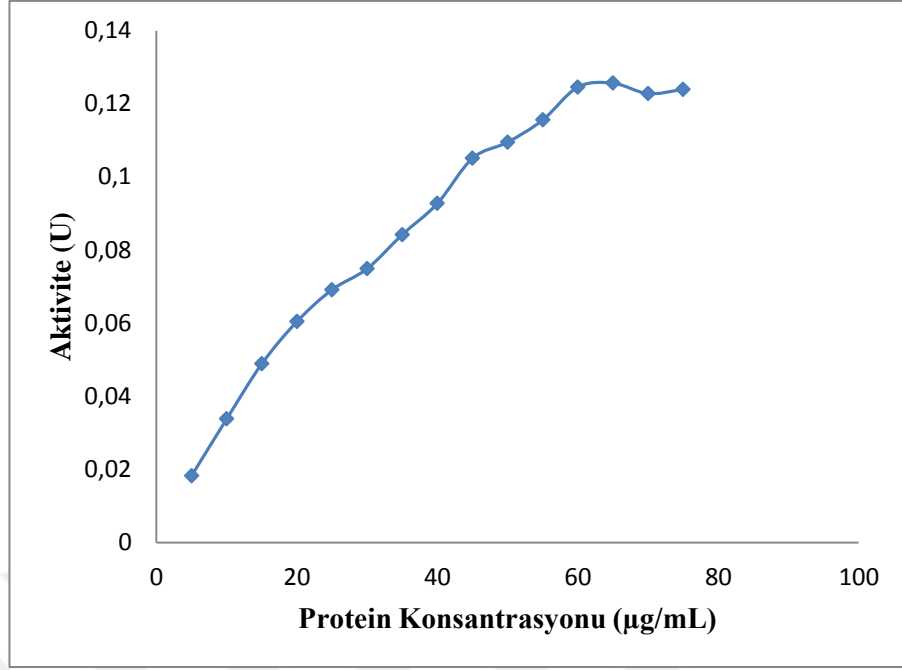
Şekil 4.13.2a. *B. thermocatenulatus* serbest ve immobilize lipaz enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi.



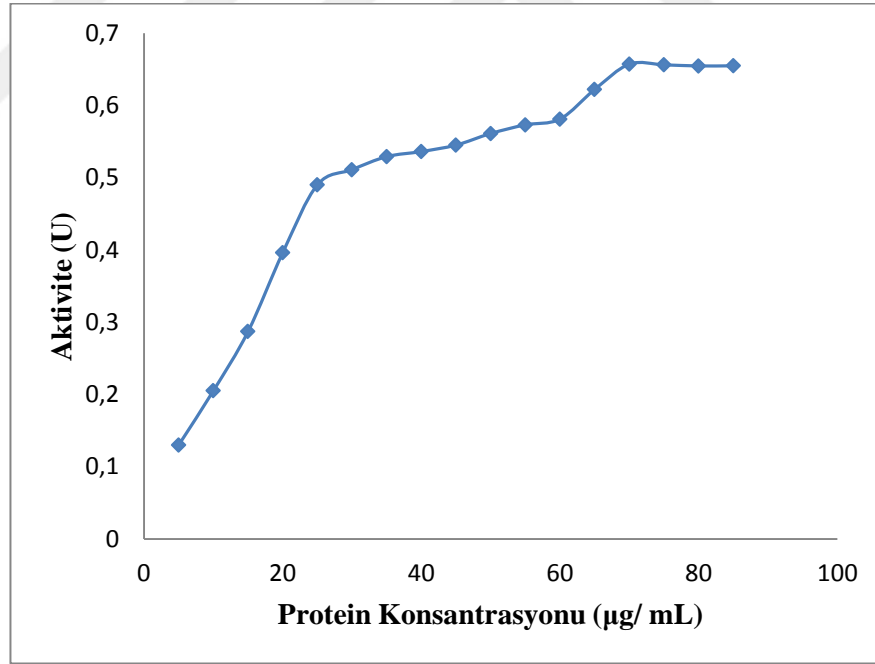
Şekil 4.13.2b *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi.

4.13.3 Protein Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 serbest lipazının protein konsantrasyonunun değiştirilmesiyle enzim aktivitesinin değişimini incelemek ve aktivenin en yüksek olduğu optimum protein miktarını belirlemek amacıyla, Bölüm 3.2.15.3’ de belirtildiği şekilde ölçümler yapıldı ve aktivite değişimi grafiğe geçirildi (Şekil 4.13.3a-Şekil 4.13.3b). *B. thermocatenulatus* lipazının serbest enzim için en iyi aktivite gösterdiği protein miktarı 65µg/mL olarak belirlendi. *B. pumilus* MBB03 lipazının serbest enzim için en iyi aktivite gösterdiği protein miktarı 75µg/mL, olarak belirlendi.



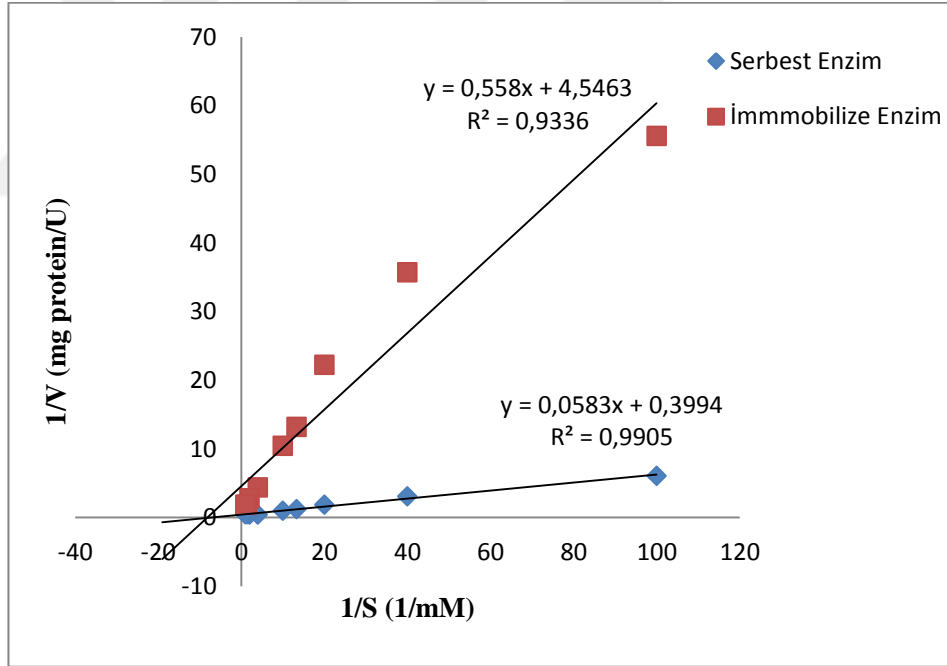
Şekil 4.13.3a *B. thermocatenuatus* serbest lipaz enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.



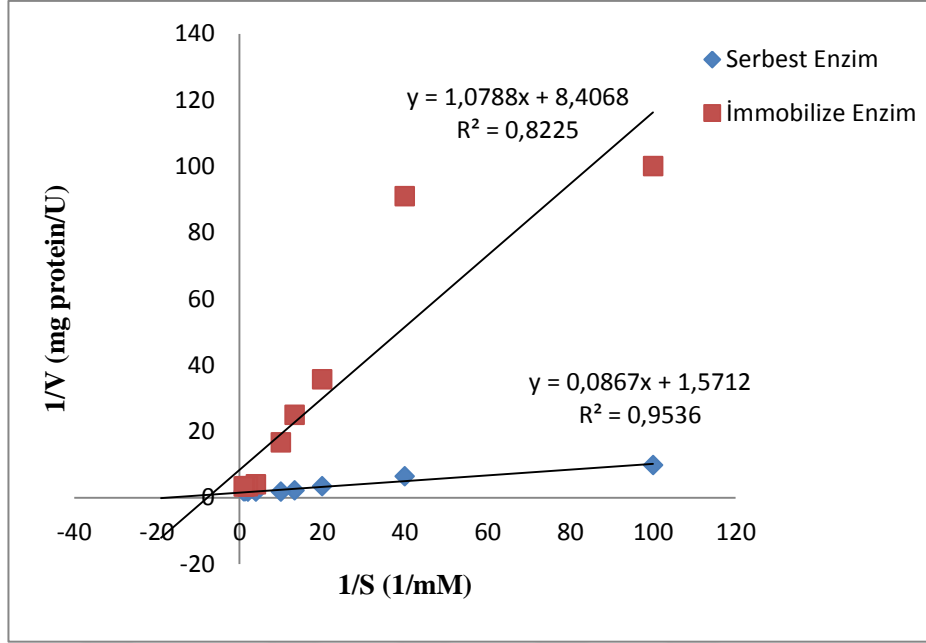
Şekil 4.13.3b *B. pumilus* MBB03 serbest lipaz enzim aktiviteği üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.

4.13.4 Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi

B. thermocatenuulatus ve *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz enziminin aktivite gösterdiği en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, Bölüm 3.2.15.4’ de belirtildiği şekilde belirlendi. Enzim konsantrasyonu ise reaksiyon karışımlarında serbest enzim için nihai konsantrasyon 30 µg/mL, immobilize enzim için 0.003g olacak şekilde ayarlandı. Lineweaver-Burk (1934) eğrisi yardımıyla her bir substratın K_m (Michaelis sabiti) ve V_{maks} (maksimum hız) değerleri hesaplandı [128] (Şekil 4.13.4a-Şekil 4.13.4b). *B. thermocatenuulatus* serbest ve immobilize lipaz K_m değerleri *p*-nitrofenil dekonat için sırasıyla 0.146 mM, 0.123 mM olarak belirlendi. *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz K_m *p*-nitrofenil oktaonat için sırasıyla 0,055 mM, 0,128 mM olarak bulundu. V_{maks} değerleri ise sırasıyla 2.504 U/mL, 0.220 U/mL, 0.636 U/mL ve 0.119 U/mL olarak belirlendi.



Şekil 4.13.4a *B. thermocatenuulatus* serbest ve immobilize lipazı Lineweaver-Burk eğrisi.

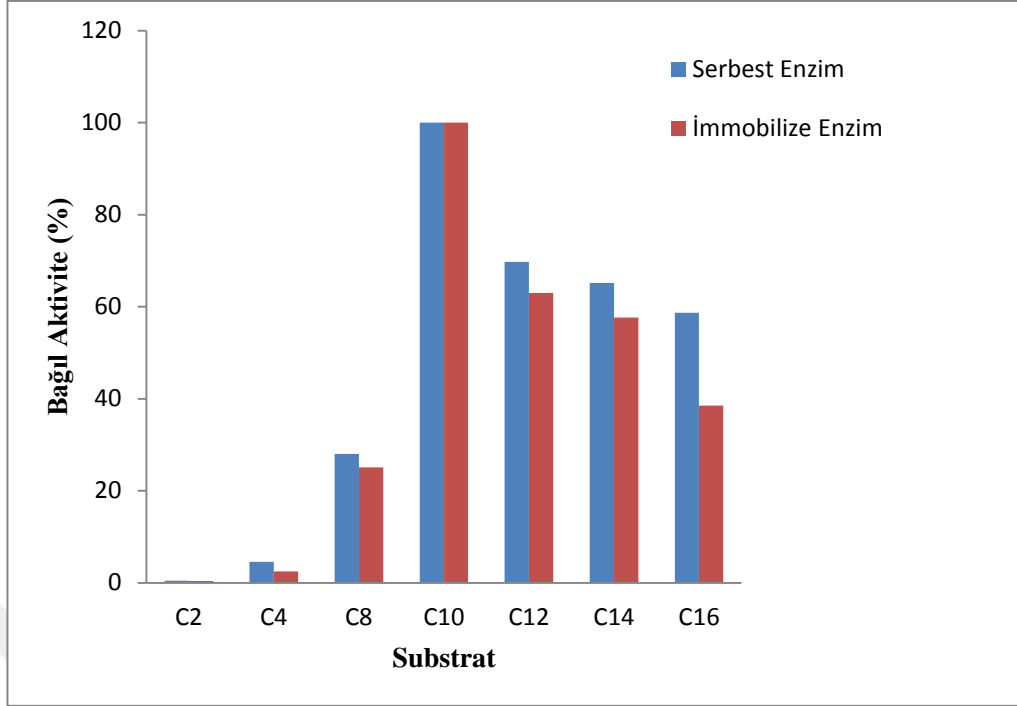


Şekil 4.13.4b *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipazı Lineweaver-Burk eğrisi.

4.13.5 Serbest ve İmmobilize Lipazın Farklı Substratlar Üzerine Etkisi

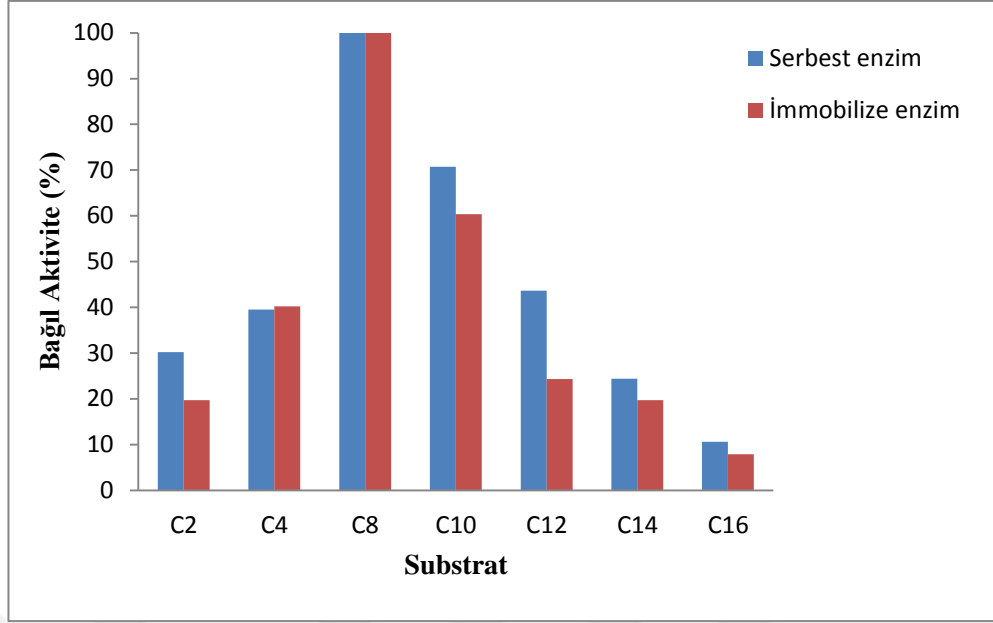
B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03' e ait serbest ve immobilize lipaz enziminin substrat özgüllüğü farklı karbon uzunluğundaki paranitrofenol türevleri substrat olarak kullanılarak Bölüm 3.2.15.5' de belirtildiği şekilde incelenmiştir.

B. thermocatenulatus serbest ve immobilize lipaz enzimi en yüksek aktiviteyi 10C' lu pNP-dekonata sırasıyla % 100 (10.9 U/mL), % 100 (8.0 U/mL) karşı göstermiştir. *B. thermocatenulatus* serbest ve immobilize lipaz 2C' lu pNP-asetata sırasıyla % 0.45 (0.05 U/mL) ve % 0.37 (0.03 U/mL), 4C' lu pNP-bütirata sırasıyla % 4.5 (0.5 U/mL) ve % 2.5 (0.2U/mL) spesifite gösterdiği belirlendi. *B. thermocatenulatus* serbest enzim 8C'lu pNP-oktanata % 28 (3.05 U/mL), immobilize lipaz enzimi % 25 (2.01 U/mL) spesifite gösterdiği gözlemlendi. 12C' lu pNP-laurata serbet enzim % 69 (7.6 U/mL), immobilize enzim % 63 (5.04 U/mL) spesifite gösterdiği belirlendi. 14 C' lu pNP-meristat'a serbest enzim % 65 (7.1 U/mL), immobilize enzim % 57 (4.61 U/mL), 16 C' lu pNP-palmitata serbest enzim % 58 (6.4 U/mL), immobilize lipaz % 38.5 (3.08 U/mL) olarak spesifite gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.13.5a).



Şekil 4.13.5a *B. thermocatenuulatus* serbest ve immobilize lipazı substrat spesifite aktivite grafiği.

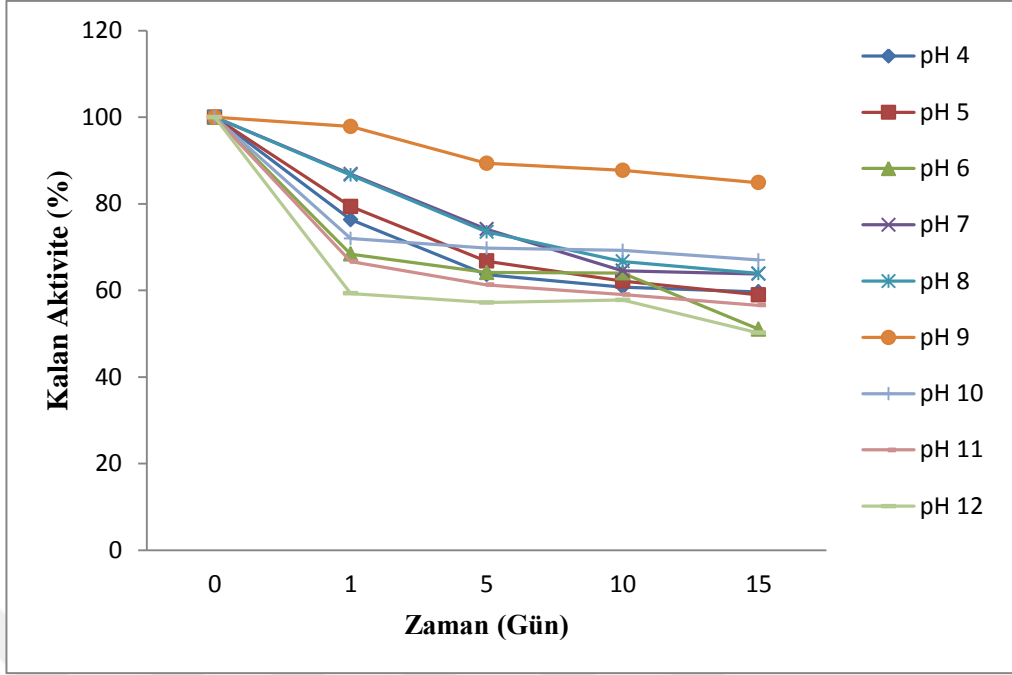
B. pumilus serbest ve immobilize lipaz enzimi en yüksek aktiviteyi 8C' lu pNP-oktanata sırasıyla % 100 (0.582 U/mL) ve % 100 (0.517 U/mL) karşı göstermiştir. *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz 2C' lu pNP-asetata sırasıyla % 30 (0.176 U/mL) ve % 0.19 (0.102 U/mL), 4C' lu pNP-bütirata sırasıyla % 39 (0.230 U/mL) ve % 40 (0.208 U/ml) spesifite gösterdiği belirlendi. *B. pumilus* MBB03 serbest enzim 10C' lu pNP-dekonata % 83 (0.487 U/mL), immobilize lipaz enzimi % 60 (0.312 U/mL) spesifite gösterdiği gözlemlendi. 12C' lu pNP-laurata serbet enzim % 28 (0.167 U/mL), immobilize enzim % 24 (0.126U/mL) spesifite gösterdiği belirlendi. 14 C' lu pNP-meristata serbest enzim % 24 (0.142 U/mL), immobilize enzim % 19 (0.102 U/mL), 16 C' lu pNP-palmitata serbest enzim % 10 (0.062 U/mL), immobilize lipaz % 7.9 (0.041 U/mL) olarak spesifite gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.13.5b).



Şekil 4.13.5b. *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipazı substrat spesifite aktivite grafiği.

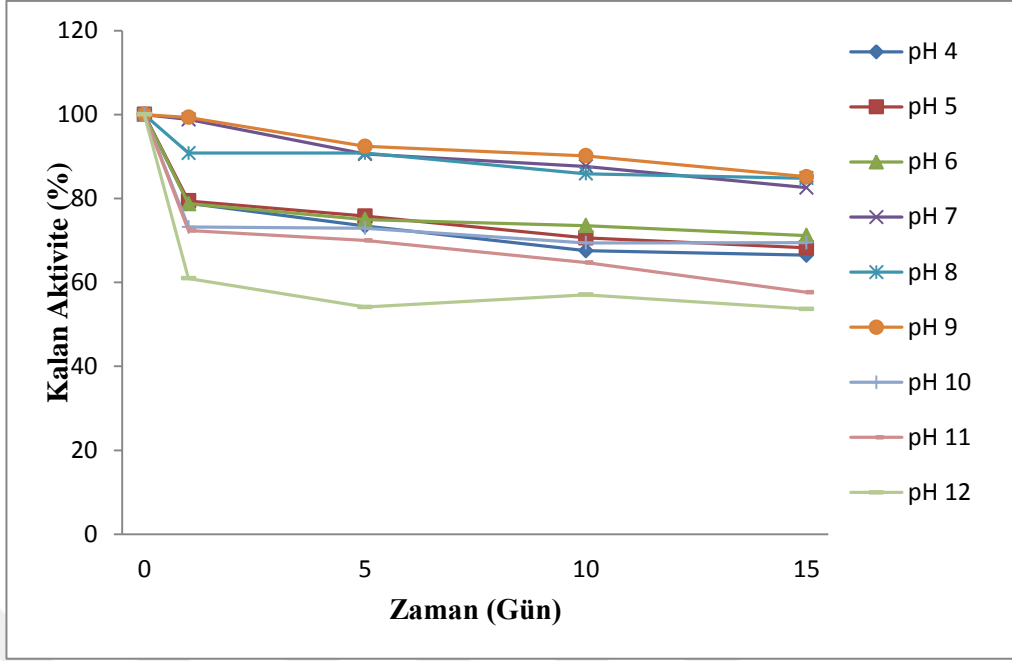
4.13.6 pH Kararlılığın İncelenmesi

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03' e ait serbest ve immobilize lipaz enziminin pH kararlılığını incelemek amacıyla, Bölüm 3.2.15.6' da belirtildiği şekilde inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında ve *p*-nitrofenil dekonat ve *p*-nitrofenil oktanat substratları varlığında aktivite tayinleri yapıldı. *B. thermocatenulatus* hem serbest hemde immobilize lipazının geniş bir pH aralığında yüksek kararlılık gösterdiği gözlemlendi. *B. thermocatenulatus* serbest enzimin 1 günün sonunda pH 4.0 de enzimin başlangıçtaki aktivitesinin % 76' sını korunduğu, pH 7.0 ve 8.0' da % 86' sını ve pH 9.0' da ise hemen hemen tamamının korunduğu gözlemlendi. 5 günün sonunda pH 4.0, 4.5, 5.0 ve 6.0' da enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 60' nı, pH 7.0 ve 8.0' de % 70' ini, pH 9.0 % 80' i, pH 10.0, 11.0' de % 60' ı, pH 12.0' de % 57' unu korunduğu belirlendi. 10 günün sonunda pH 8.0' de % 80' i, korunduğu gözlemlendi. 15. gün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0, 11.0, 12.0' da enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50, pH 7.0, 8.0 ve 10.0' da % 60' ı, pH 9.0' da ise % 80' i korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.6a).



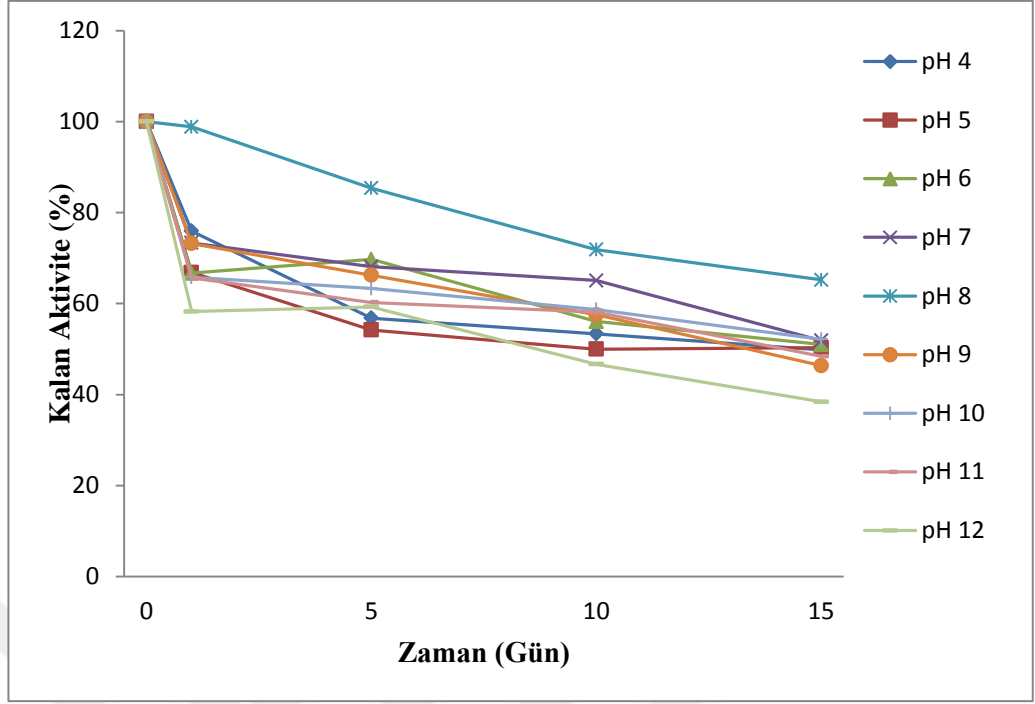
Şekil 4.13.6 a *B. thermocatenulatus* serbest lipazının +4 °C’ deki pH 4.0, 5.0,6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0’ de pH kararlılığının zamana göre değişim grafiği.

B. thermocatenulatus immobilize enzimin ise 1 günün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0’ da başlangıçtaki aktivitesinin % 70’ sını korunduğu, pH 7.0, 8.0 ve 9.0’ da hemen hemen tamamına yakınının korunduğu, pH 10.0 ve 11.0’ de % 70 korunduğu gözlemlendi. 5 günün sonunda pH 7.0 8.0 ve 9.0’ da hemen hemen tamamına yakınının korunduğu belirlendi. 10 günün sonunda pH 4.0’ de enzimin başlangıç aktivitesinin % 60’ ı, pH 5.0 ve 6.0’ da % 70’ i, pH 7.0 ve 8.0’ de % 80’ i, pH 9.0’ da % 90’ ı, 10.0, ve 11.0’ de başlangıçtaki aktivitenin yaklaşık % 60’ ı korunduğu gözlemlendi. 15. gün sonunda pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0’ de ise enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 80’ i korunduğu gözlemlendi. (Şekil 4.13.6 b).



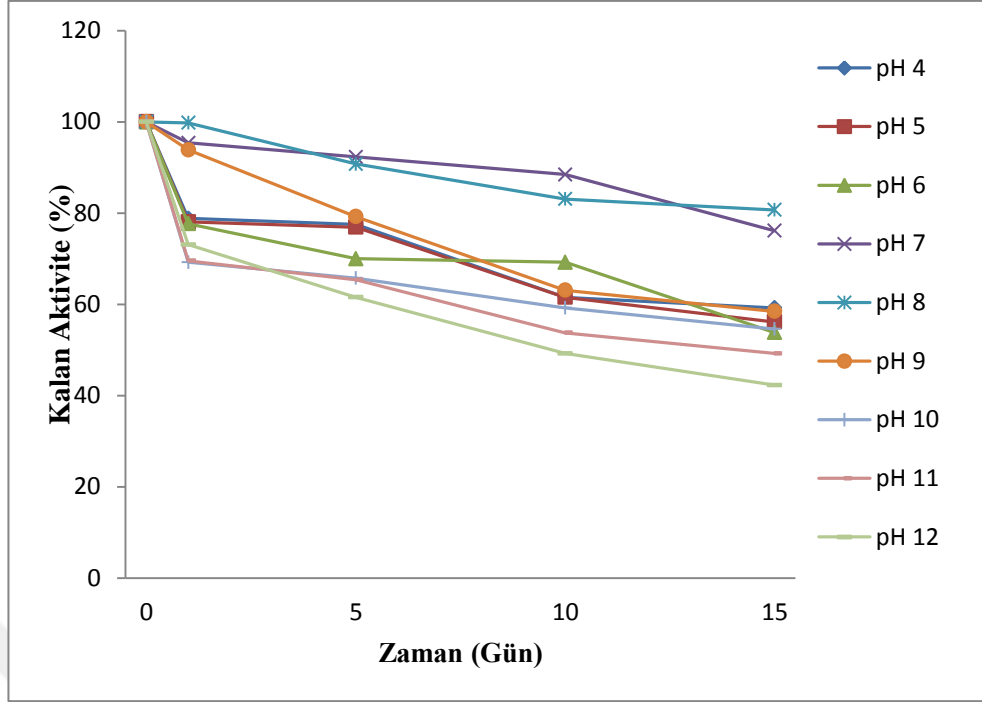
Şekil 4.13.6 b *B. thermocatenuatus* immobilize lipazının +4 °C’ deki pH 4.0, 5.0,6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0’ de pH kararlılığının zamana göre değişim grafiği.

B. pumilus MBB03 serbest enzimin 1 günün sonunda pH 4.0 de enzimin başlangıçtaki aktivitesinin %75’ sini korunduğu, pH 7.0 ve 9.0’ da % 73’ sini, pH 8.0’da ise hemen hemen tamamının korunduğu gözlemlendi. 5. günün sonunda pH 4.0 ve 5.0 da enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50’ nı, pH 6.0 ve 7.0’ de % 60’ ı, pH 8.0’ de % 85’ i, pH 9.0, pH 10.0 ve 11.0’ de ise % 60’ı korunduğu belirlendi. 10. günün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 9.0, 10.0, ve 11.0’ de başlangıçtaki aktivitenin yaklaşık % 50’ i, pH 8.0’ de % 80’ i, korunduğu gözlemlendi. 15. gün sonunda pH 9.0’ da ise % 80’ i korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.6 c).



Şekil 4.13.6 c *B. pumilus* MBB03 serbest lipazının +4 °C’ deki pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0’ de pH kararlılığının zamana göre değişim grafiği.

B. pumilus MBB03 immobilize enzimin 1 günün sonunda pH 4.0 pH 5.0 ve 6.0’ da enzimin başlangıçtaki aktivitesinin % 70’ ini koruduğu, pH 7.0, 8.0 ve 9.0’ da neredeyse tamamının korunduğu gözlemlendi. 5 günün sonunda pH 4.0, 5.0 ve 6.0’ da enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %70’ i, pH 7.0 ve 8’ de % 90’ ı, pH 9.0’ de % 79’ u korunduğu belirlendi. 10 günün sonunda pH 7.0 ve 8.0’ de % 80’ i korunduğu gözlemlendi. 15. gün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0, 9.0 ve 10.0’ de enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50, pH 7.0, % 76’ ı pH 8.0 80’ i korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.6 d).

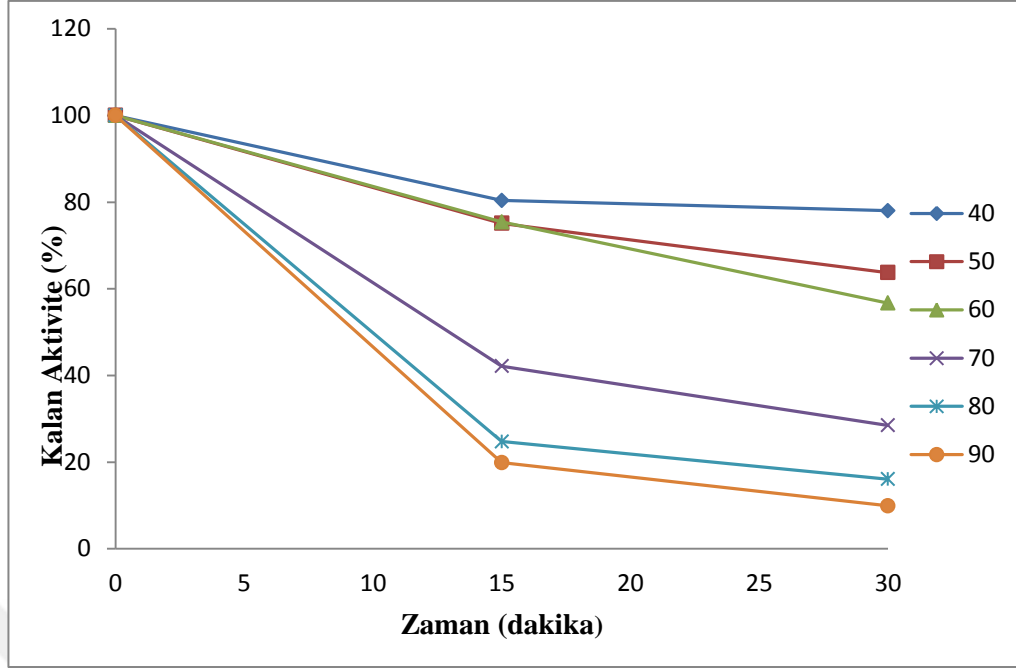


Şekil 4.13.6 d *B. pumilus* MBB03 immobilize lipazının +4 °C’ de pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0’ de pH kararlılığının zamana göre değişim grafiği.

4.13.7. Isıl Kararlılığın İncelenmesi

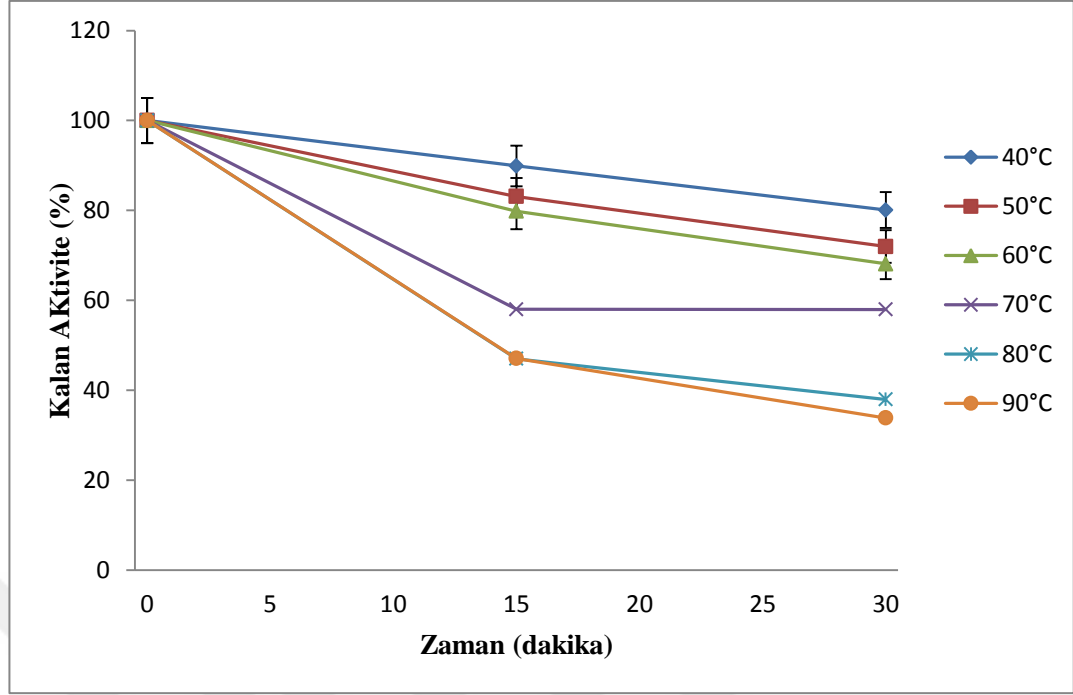
B. thermocatenulatus ve *B. pumilus*’ a ait serbest ve immobilize lipaz enziminin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla Bölüm 3.2.15.7 de belirtildiği şekilde enzim; oda sıcaklığı, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda enzimin aktivitesine bağlı olarak 15 ve 30 dakikadan 30 güne kadar değişen sürelerde inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03’ e ait serbest ve immobilize lipazının kalan yüzde aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı.

B. thermocatenulatus serbest enzimin 40 °C’ de 15 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık % 80’ ini, 30 dakika sonunda % 78’ ini koruduğu belirlendi. 50 ve 60 °C’ lerde 15 dakika sonunda yaklaşık % 75’ ini koruduğu gözlemlendi. 70 °C’ de ise 15 ve 30 dakika sonunda sırasıyla yaklaşık % 42 ve % 28’ ini koruduğu belirlendi. 90 °C’ de 30 dakika inkübasyon sonucunda enzimin aktivitesinin % 91’ ini kaybettiği belirlendi (Şekil 4.13.7 a).



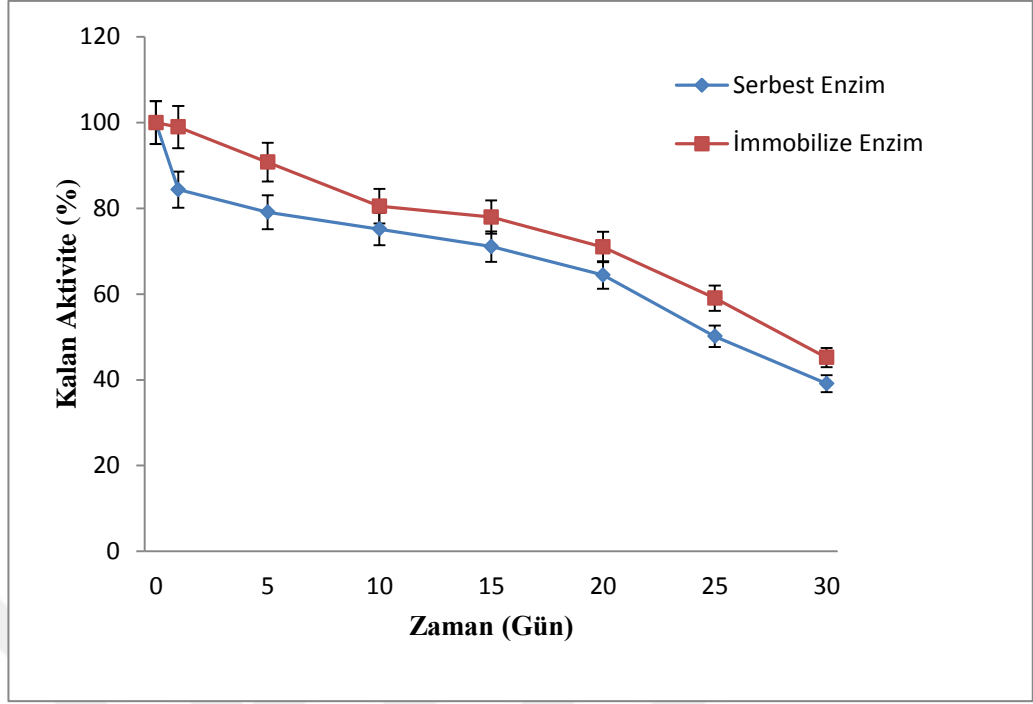
Şeki 4.13.7 a. *B. thermocatenulatus* serbest lipazının 40,50, 60, 70, 80, 90 °C’ deki ısıl kararlılık eğrisi.

B. thermocatenulatus immobilize enzimin 40 °C’ de, 15 ve 30 dakika sonunda aktivitesinin sırasıyla yaklaşık % 89 ve % 80’ ini koruduğu belirlendi. 50 °C’ de 15 ve 30 dakika inkübasyon sonunda sırasıyla yaklaşık % 83 ve % 71’ini koruduğu gözlemlendi. 60 °C’ de 15 ve 30 dakika inkübasyon sonunda yaklaşık sırasıyla % 79 ve % 68’ ini koruduğu belirlendi. 80 °C’ de 15 ve 30 dakika sonunda sırasıyla yaklaşık % 47 ve % 37’ sini koruduğu gözlemlendi. 90 °C’ 15 inkübasyon sonucunda enzimin aktivitesinin sırasıyla yaklaşık % 47’ ini koruduğu belirlendi (Şekil 4.13.7b).



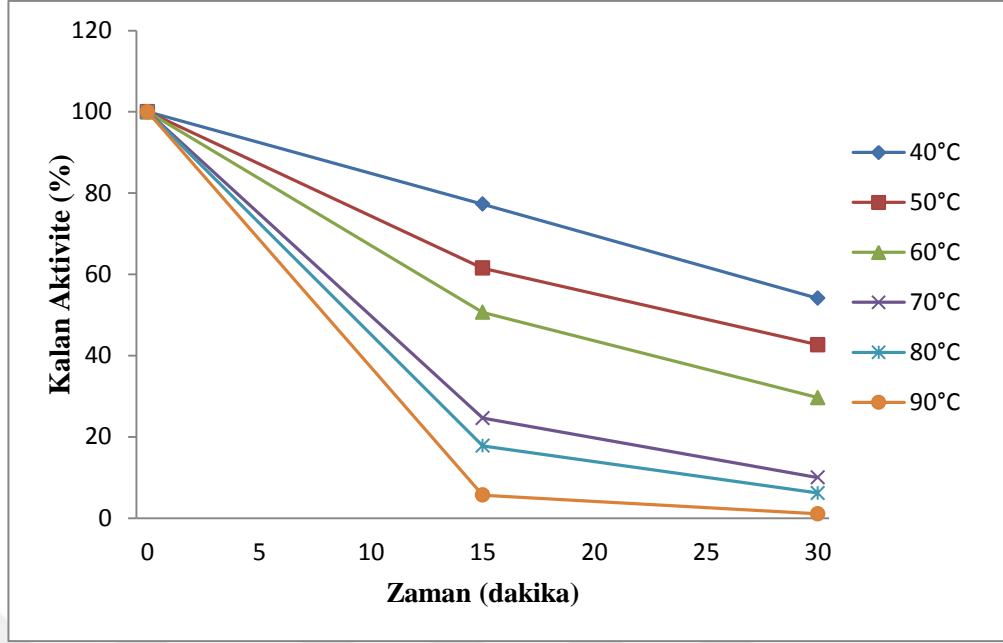
Şekil 4.13.7 b *B. thermocatenulatus* immobilize lipazının 40,50, 60, 70, 80, 90 °C’ deki ısıl kararlılık eğrisi.

B. thermocetenulatus serbest ve immobilize enzim oda sıcaklığında ise; 1günün sonunda serbest enzim yaklaşık % 84’ ini, immobilize enzim ise hemen hemen tamamına yakını koruduğu belirlendi. 5. günün sonunda serbest enzim % 79, immobilize enzim % 90’ ını koruduğu gözlemlendi. 10 ve 15. günün sonunda serbest enzim % 75 ve 71’ini, immobilize enzim sırasıyla % 80 ve % 77’sini koruduğu belirlendi. 20 ve 25. günün sonunda serbest enzim yaklaşık % 64 ve % 50’ ını koruduğu, immobilize enzim yaklaşık %70 ve 59’unu, 30. günün sonunda serbest enzim % 39’ unu, immobilize enzim % 45’ini koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.7c).



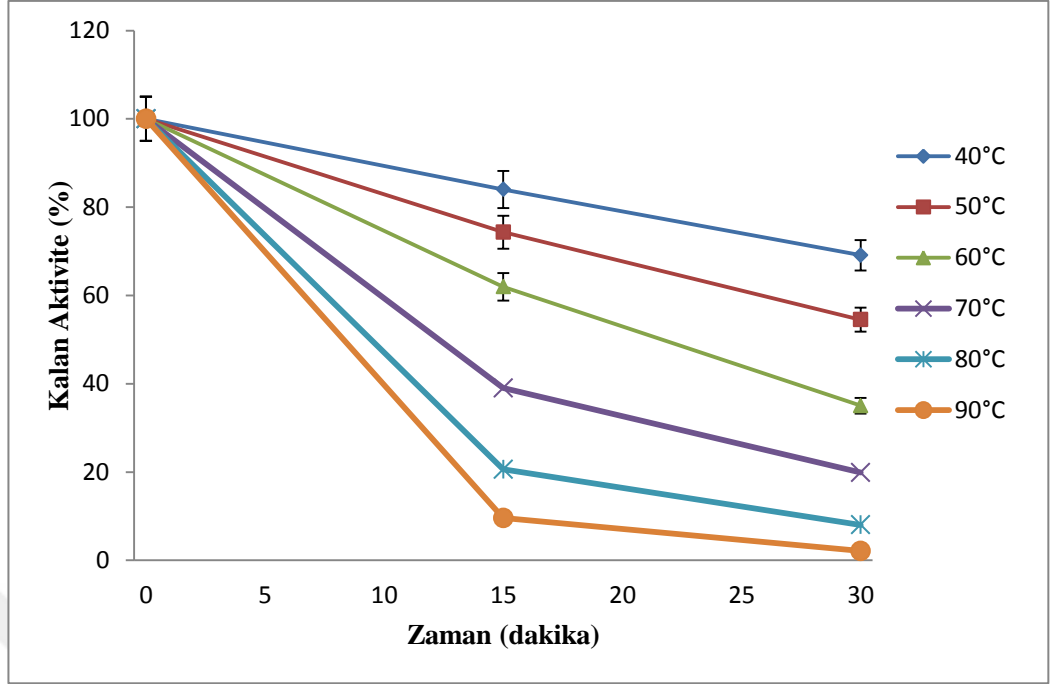
Şekil 4.13.7 c *B. thermocatenuulatus* serbest ve immobilize lipazının oda ısısında ısıl kararlılık eğrisi.

B. pumilus MBB03 serbest enzimin 40 °C' de 15 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık % 77' ini, 30 dakika sonunda % 54' ini koruduğu belirlendi. 50 ve 60 °C'lerde 15 dakika sonunda yaklaşık % 61 ve % 50'sini koruduğu, 30 dakika sonunda ise sırayla % 58 ve % 71'ini kaybettiği gözlemlendi. 70 °C' de ise 15 ve 30 dakika sonunda sırasıyla yaklaşık % 76 ve % 90' ini kaybettiği belirlendi. 90 °C' 15 inkübasyon sonucunda enzimin aktivitesinin % 95 ve ve 30 dakika inkübasyona sonunda hemen hemen tamamını kaybettiği belirlendi (Şekil 4.13.7d).



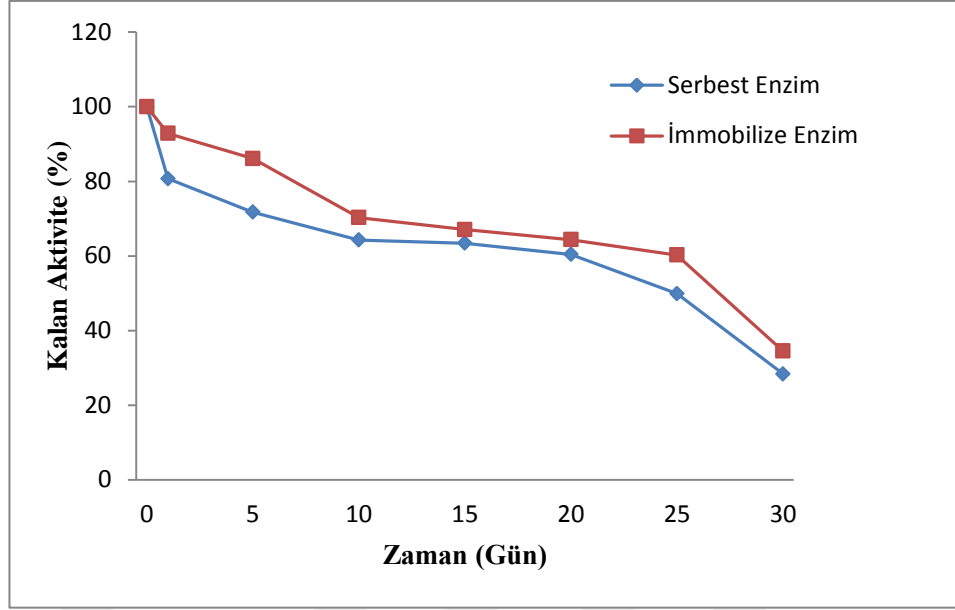
Şekil 4.13.7 d *B. pumilus* MBB03 serbest lipazının 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C’ deki ısıl kararlılık eğrisi.

B. pumilus MBB03 immobilize enzimin 40 °C’ de 15 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık % 84’ünü, 30 dakika sonunda % 69’ ini koruduğu belirlendi. 50 ve 60 °C’ lerde 15 dakika sonunda yaklaşık % 74 ve % 61’ ini koruduğu, 30 dakika sonunda ise sırayla % 46 ve % 65’ ini kaybettiği gözlemlendi. 70 °C’ de ise 15 ve 30 dakika sonunda sırasıyla yaklaşık % 61 ve % 81’ ini kaybettiği belirlendi. 80 °C’ de 15 ve 30 dakika sonunda sırasıyla yaklaşık % 80 ve % 92 kaybettiği gözlemlendi. 90 °C’ 15 inkübasyon sonucunda enzimin aktivitesinin % 91 ve ve 30 dakika inkübasyona sonunda %98’ ini kaybettiği belirlendi (Şekil 4.13.7 e).



Şekil 4.13.7e *B. pumilus* MBB03 immobilize lipazının 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C’ deki ısıl kararlılık eğrisi

B. pumilus MBB03 serbest ve immobilize enzim oda sıcaklığında ise; 1. günün sonunda serbest enzim yaklaşık % 80’ ini, immobilize enzim ise % 92’ sini koruduğu belirlendi. 5. günün sonunda serbest enzim % 71, immobilize enzim % 86’ ını koruduğu gözlemlendi. 10 ve 15. günün sonunda serbest enzim sırasıyla % 64 ve 61’ ini, immobilize enzim sırasıyla % 70 ve % 67’ sini koruduğu belirlendi. 20 ve 25 günün sonunda serbest enzim yaklaşık % 60 ve % 49’ unu koruduğu, immobilize enzim yaklaşık % 64 ve % 60’ ini, 30 günün sonunda serbest enzim % 28’ unu, immobilize enzim % 34’ ini koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.7f).



Şekil 4.13.7 *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipazının oda ısısında ısı kararlılık eğrisi.

4.13.8 Bazı Metal İyonlarının Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus*' a ait serbest ve immobilize lipazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, Bölüm 3.2.15.8' de belirtildiği şekilde metal iyonları 0.1, 0.5 ve 1.0 mM' lık konsantrasyonlarında çalışıldı. *B. thermocatenulatus* serbest enzim üzerine, metal iyonları içinde etkili bir şekilde enzim aktivitesini CuCl_2 , ZnSO_4 , HgCl_2 , NiCl_2 ve CuSO_4 iyonları hariç diğer metal iyonlarının enzim aktivitesini farklı miktarlarda artırdığı ya da büyük miktarda etkilemediği gözlemlendi. CuCl_2 , ZnSO_4 , HgCl_2 , NiCl_2 iyonlarının 1 mM' lık konsantrasyonunda sırasıyla % 12, % 11, % 22 ve % 13 oranında, CuSO_4 iyonunun 0.1 mM konsantrasyonunda % 14 oranında enzim aktivitesini kontrole oranla azalttığı belirlendi. KCl_2 iyonun 0.5 ve 1 mM' lık konsantrasyonunda aktiviteyi sırasıyla % 40 ve 25 oranında, BaCl_2 ve FeSO_4 iyonun 1 mM' lık konsantrasyonunda aktiviteyi sırayla % 29 ve % 25 oranında kontrole oranla artırdığı tespit edildi (Çizelge 4.13.8a). *B. thermocatenulatus* immobilize enzim aktivitesini BaCl_2 , CoSO_4 , NiCl_2 ve MgSO_4 , CuSO_4 metal iyonlarının farklı miktarlarda etkilediği gözlemlendi. BaCl_2 , CoSO_4 , metal iyonlarının 0.1 mM' lık konsantrasyonunda sırasıyla % 19, % 13 oranında, NiCl_2 metal

iyonunun 0.1 mM'lık konsantrasyonunda %19 ve 1mM'lık konsantrasyonunda % 15 oranında, MgSO₄ metal iyonunun 1mM'lık konsantrasyonunda aktiviteyi % 25 oranında kontrole oranla azalttığı belirlendi. CuCl₂ ve ZnSO₄ metal iyonlarını 1 mM'lık konsantrasyonunda aktiviteyi sırasıyla % 63, % 32 oranında, HgCl₂ metal iyonunun 0.5 mM'lık konsantrasyonunda aktiviteyi % 18 ve 1mM'lık konsantrasyonunda aktiviteyi % 61 oranında kontrole oranla artırdığı tespit edildi. FeSO₄, MnCl₂, MgCl₂ metal iyonlarının ise immobilize enzim aktivitesini kontrole oranla genel olarak artırdığı tespit edildi (Çizelge 4.13.8a).

Çizelge 4.13.8a Bazı metal iyonlarının *B. thermocatenulatus* serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.

Metal İyonları	Bağıl Aktivite (%) (<i>B.thermocatenulatus</i> Serbest enzim)			Bağıl Aktivite (%) (<i>B.thermocatenulatus</i> İmmobilize enzim)		
	0.1 mM	0.5 mM	1mM	0.1 mM	0.5 mM	1Mm
Kontrol	100	100	100	100	100	100
CaCl ₂	92	92	95	99	109	102
NaCl ₂	92	91	91	105	104	100
CuCl ₂	91	90	88	97	94	163
KCl ₂	97	140	125	100	108	106
BaCl ₂	94	92	129	81	104	100
ZnSO ₄	89	91	89	101	109	132
HgCl ₂	96	92	78	102	118	161
FeSO ₄	93	102	125	125	147	165
CuSO ₄	86	100	100	104	94	80
CoSO ₄	92	96	99	87	105	103
NiCl ₂	93	92	87	81	113	85
MgCl ₂	92	93	95	106	126	107
MnCl ₂	93	94	96	130	178	191
MgSO ₄	96	98	96	108	111	75

B. pumilus MBB03 serbest ve immobilize enzim üzerine, metal iyonlarının enzim aktivitesini farklı miktarlarda genel olarak azalttığı gözlemlendi. Serbest enzim aktivitesini ZnSO₄ ve HgCl₂ metal iyonunun 0.5 mM'lık konsantrasyonunda sırasıyla % 40 ve %

30 oranında, 1 mM'lık konsantrasyonunda sırasıyla % 26 ve % 37 oranında kontrole oranla azalttığı belirlendi. FeSO₄ ve NiCl₂ metal iyonlarının 0.5 mM'lık konsantrasyonlarının sırasıyla % 18 ve % 47 oranında azalttığı tespit edildi. CoSO₄ metal iyonunun 0.1mM, 0.5mM ve 1mM'lık konsantrasyonunu sırasıyla % 28, % 27 ve % 25 oranında azalttığı belirlendi. MnCl₂ metal iyonunun 0.1 mM ve 1mM'lık konsantrasyonunun sırasıyla % 20 ve % 28 oranında, MgSO₄ metal iyonunun 0.1mM, 0.5mM ve 1mM'lık konsantrasyonunu sırasıyla % 21, % 33 ve % 38 oranında kontrole oranla azalttığı gözlemlendi (Çizelge 4.13.8b). *B. pumilus* MBB03 immobilize enzim aktivitesini HgCl₂, NiCl₂ metal iyonlarının 1 mM'lık konsantrasyonlarının sırasıyla kontrole oranla % 90 ve % 66 oranında önemli miktarda azalttığı belirlendi. Ancak *B. pumilus* MBB03 immobilize enzim aktivitesini CoSO₄, FeSO₄ metal iyonları kontrole oranla etkili bir şekilde artırdığı gözlemlendi. (Çizelge 4.13.8b).

Çizelge 4.13.8b Bazı metal iyonlarının *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.

Metal İyonları	Bağıl Aktivite (%) (<i>B. pumilus</i> Serbest enzim)			Bağıl Aktivite (%) (<i>B. pumilus</i> İmmobilize enzim)		
	0.1 mM	0.5 mM	1mM	0.1 mM	0.5 mM	1mM
Kontrol	100	100	100	100	100	100
CaCl ₂	99	105	114	61	51	65
NaCl ₂	122	106	105	102	73	67
CuCl ₂	108	111	90	89	69	81
KCl ₂	94	97	103	75	71	62
BaCl ₂	102	92	94	69	59	75
ZnSO ₄	122	60	74	75	100	95
HgCl ₂	102	70	63	114	67	30
FeSO ₄	82	113	98	83	161	348
CuSO ₄	72	73	75	89	55	110
CoSO ₄	58	63	59	153	202	289
NiCl ₂	53	122	98	106	116	44
MgCl ₂	102	103	95	91	85	79
MnCl ₂	80	91	72	104	81	95
MgSO ₄	79	67	62	102	102	114

4.13.9 Bazı Deterjanların Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03' e ait serbest ve immobilize lipazının aktivitesi üzerine bazı deterjanlar etkisini incelemek için yapılan deneysel çalışma Bölüm 3.2.15.9'da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kimyasal ve deterjan içermeyen reaksiyon karışım aktivitesi ile kıyaslanarak % bağıl aktiviteler hesaplandı (Çizelge 4.13.9a, Çizelge 4.13.9b).

B. thermocatenulatus serbest enzim üzerine, bazı deterjanlar içinde enzim aktivitesini % 0.1(w/v) oranında sodyum deoksikolat ve sodyum taurokolat enzim aktivitesini kontrole oranla % 20 artırdığı gözlemlendi. *B. thermocatenulatus* immobilize enzim aktivitesini bazı deterjan ve kimyasalların genellikle etkili bir şekilde kontrole ve serbest enzime kıyasla artırdığı saptandı.

Çizelge 4.13.9a Bazı deterjan, yüzey aktif maddeler ve kimyasalların *B. thermocatenulatus* serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.

Bazı Deterjan, Yüzey Aktif Maddeler ve Kimyasallar	Konsantrasyon (%)	Bağlı Aktivite (%)	
		<i>B. thermocatenulatus</i> Serbest Enzim	<i>B. thermocatenulatus</i> İmmobilize Enzim
Kontrol	-	100	100
Triton X-100	0.1	100	164
	0.5	100	136
	1.0	97	130
Tween 80	0.1	98	143
	0.5	98	148
	1.0	97	143
Tween 20	0.1	102	147
	0.5	100	144
	1.0	99	121
CHAPS	0.1	101	135
	0.5	98	133
	1.0	97	130
Sodyum deoksikolat	0.1	120	128
	0.5	119	123
	1.0	114	123
Sodyum taurokolat	0.1	120	125
	0.5	117	118
	1.0	115	111
SDS	0.1	106	183
	0.5	101	136
	1.0	100	135

B. pumilus MBB03 serbest enzim üzerine, bazı deterjanlar içinde etkili bir şekilde enzim aktivitesini CHAPS, sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat deterjanları hariç diğer deterjan ya da kimyasalların enzim aktivitesini farklı miktarlarda azalttığı gözlemlendi. Triton X-100 deterjanının % 0.1 (w/v) konsantrasyonda % 37 oranında, % 0.5 (w/v) konsantrasyonda % 46 oranında, % 1 (w/v) konsantrasyonda enzim aktivitesini % 64 oranında kontrole kıyasla azalttığı belirlendi. Tween 80, Tween 20 ve SDS deterjanlarının % 0.1 (w/v), % 0.5 (w/v) ve % 1 (w/v) konsantrasyonda enzim aktivitesini Tween 80 sırasıyla % 55, % 70 ve % 75 oranında, Tween 20 sırasıyla % 78,

% 81 ve % 86 oranında, SDS sırasıyla % 43, % 44 ve % 57 oranında kontrole kıyasla etkili bir şekilde inhibe ettiği tespit edildi (Çizelge 4.13.9b). *B. pumilus* MBB03 immobilize enzim aktivitesini bazı deterjan ve yüzey aktif maddelerin genellikle kontrole kıyaslandığında artırdığı belirlendi. Ancak Tween 20 deterjanının % 0.1 (w/v), % 0.5 (w/v) ve % 1.0 (w/v) konsantrasyonda enzim aktivitesini sırasıyla % 55, % 75 ve % 78 oranında, sodyum taurokolat deterjanının % 1.0 (w/v) konsantrasyonda enzim aktivitesini kontrole oranla % 13 oranında azalttığı tespit edildi (Çizelge 4.13.9b).

Çizelge 4.13.9b Bazı deterjan, yüzey aktif maddeler ve kimyasalların *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.

Bazı Deterjan, Yüzey Aktif Maddeler ve Kimyasallar	Konsantrasyon (%)	Bağıl Aktivite (%) <i>B. pumilus</i> Serbest Enzim	Bağıl Aktivite (%) <i>B. pumilus</i> İmmobilize Enzim
Kontrol	-	100	100
Triton X-100	0.1	63	210
	0.5	54	210
	1.0	36	150
Tween 80	0.1	45	255
	0.5	30	115
	1.0	25	112
Tween 20	0.1	22	45
	0.5	19	25
	1.0	14	22
CHAPS	0.1	127	227
	0.5	105	187
	1.0	84	160
Sodyum deoksikolat	0.1	109	127
	0.5	103	120
	1.0	94	115
Sodyum taurokolat	0.1	105	110
	0.5	96	90
	1.0	92	87
SDS	0.1	57	160
	0.5	56	147
	1.0	43	135

4.13.10 Bazı Organik Çözücülerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz enzimleri üzerine bazı organik çözücü etkisini incelemek için yapılan deneysel çalışma Bölüm 3.2.15.10' da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Organik çözücü ve kimyasal içermeyen reaksiyon karışım aktivitesi ile kıyaslanarak % bağıl aktiviteler hesaplandı (Çizelge 4.13.10a, Çizelge 4.13.10b).

B. thermocatenulatus serbest enzim üzerine, organik çözücülerin etkili bir şekilde enzim aktivitesini farklı miktarlarda etkilediği, ancak anlamlı artış ya da azalışların olmadığı gözlemlendi. Organik çözücülerden % 1.0 mM konsantrasyonda DMSO enzim aktivitesini % 12 oranında kontrole kıyasla azalttığı belirlendi. Fakat % 0.1 ve 0.5 mM konsantrasyonda asetonun sırasıyla % 17 ve % 12 oranında enzim aktivitesini artırdığı tespit edildi (Çizelge 4.13.10a). *B. thermocatenulatus* immobilize enzim üzerine, organik çözücülerin bütün konsantrasyonlarda % 1.0 mM konsantrasyonda gliserol hariç etkili bir şekilde enzim aktivitesini farklı miktarlarda artırdığı belirlendi. % 1.0 mM konsantrasyonda gliserolün enzim aktivitesini kontrole kıyaslandığında % 24 oranında azalttığı belirlendi (Çizelge 4.13.10a).

Çizelge 4.13.10a Bazı organik çözücü ve kimyasalların *B. thermocatenuulatus* serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.

Bazı Organik Çözücü ve Kimyasallar	Konsantrasyon (%)	Bağlı Aktivite (%)	
		<i>B.thermocatenuulatus</i> Serbest enzim	<i>B.thermocatenuulatus</i> İmmobilize enzim
Kontrol	-	100	100
Etanol	0.1	103	144
	0.5	101	138
	1.0	98	116
Metanol	0.1	98	143
	0.5	97	140
	1.0	95	136
İzopropanol	0.1	98	152
	0.5	97	130
	1.0	96	123
n- Bütanol	0.1	94	149
	0.5	93	113
	1.0	93	113
Aseton	0.1	117	124
	0.5	112	124
	1.0	92	118
DMSO	0.1	98	156
	0.5	98	156
	1.0	86	143
Ksilen	0.1	100	163
	0.5	92	161
	1.0	91	152
DMF	0.1	99	155
	0.5	95	130
	1.0	93	129
Gliserol	0.1	105	138
	0.5	99	133
	1.0	95	76

B. pumilus MBB03 serbest enzim üzerine, organik çözücülerin enzim aktivitesini farklı miktarlarda etkidiği, bütün organik çözücülerin konrolle kıyaslandığında enzim aktivitesini ksilen ve gliserol hariç azalttığı gözlendi. % 0.1mM konsantrasyonda gliserolün % 25 oranında kontrole karşılaştırıldığında enzim aktivitesini artırdığı

belirlendi. % 1.0 mM konsantrasyonda etanol % 24, metanol % 28, isopropanol ve gliserol % 30, n-bütanol % 20, aseton % 11, DMSO % 25, ksilen % 23, DMF % 34 oranında enzim aktivitesini azalttığı belirlendi (Çizelge 5.13.10b). *B. pumilus* MBB03 immobilize enzim aktivitesini bütün organik çözücülerin kontrolle kıyaslandığında isopropanol, n-bütanol, aseton, DMSO, ksilen ve gliserol hariç anlamlı derecede artırdığı tespit edildi. Etanolün % 0.1, 0.5 mM ve % 1.0 mM konsantrasyonda sırasıyla % 87, % 55, % 22 oranında enzim aktivitesini kontrole kıyasla artırdığı gözlemlendi. % 0.1 mM konsantrasyonda metanol enzim aktivitesini % 35, % 0.5 mM konsantrasyonda % 15 oranında artırdığı saptandı. % 0.1 mM konsantrasyonda isopropanol enzim aktivitesini % 57, % 0.5 mM konsantrasyonda % 45 oranında artırdığı belirlendi. % 0.1 mM konsantrasyonda DMF enzim aktivitesini % 57, % 0.5 mM konsantrasyonda % 55 oranında kontrole kıyasla artırdığı gözlemlendi. Ancak % 0.1 mM konsantrasyonda izopropanol, n-bütanol, aseton sırasıyla % 23% 38, % 25 oranında, DMSO ve gliserol %15 oranında enzim aktivitesini azalttığı belirlendi (Çizelge 4.13.10b).

Çizelge 4.13.10b Bazı organik çözücü ve kimyasalların *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.

Bazı Organik Çözücü ve Kimyasallar	Konsantrasyon (%)	Bağlı Aktivite (%) <i>B.pumilus</i> Serbest enzim	Bağlı Aktivite (%) <i>B.pumilus</i> İmmobilize Enzim
Kontrol	-	100	100
Etanol	0.1	89	187
	0.5	82	155
	1.0	76	122
Metanol	0.1	80	135
	0.5	77	115
	1.0	72	102
İsopropanol	0.1	82	157
	0.5	81	145
	1.0	70	77
n- Bütanol	0.1	88	135
	0.5	87	80
	1.0	80	62
Aseton	0.1	92	102
	0.5	89	85
	1.0	89	75
DMSO	0.1	79	142
	0.5	76	97
	1.0	75	85
Ksilen	0.1	107	177
	0.5	89	122
	1.0	77	95
DMF	0.1	96	157
	0.5	80	155
	1.0	66	115
Gliserol	0.1	125	127
	0.5	108	90
	1.0	70	85

4.13.11 Bazı Kimyasal ve İnhibitör Maddelerin Lipaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize *B.thermocatenulatus* ve *B. pumilus* lipaz enzimleri üzerine bazı kimyasal ve inhibitör madde etkisini incelemek için yapılan deneysel çalışma Bölüm 3.2.15.11'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. İnhibitör ve kimyasal içermeyen reaksiyon karışım aktivitesi ile kıyaslanarak % bağıl aktiviteler hesaplandı (Çizelge 4.13.11a, Çizelge 4.13.11b).

B. thermocatenulatus serbest enzim üzerine, inhibitör ve kimyasal maddelerin önemli oranda enzim aktivitesini ekilemediği, ancak *B. thermocatenulatus* immobilize enzim aktivitesini kontrole oranla önemli miktarda artırdığı saptandı. (Çizelge 4.13.11a).

Çizelge 4.13.11a Bazı kimyasal ve inhibitör maddelerin *B.thermocatenulatus* serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Bazı Kimyasal ve İnhibitör Maddeler	Konsantrasyon (mM)	Bağıl Aktivite (%) <i>B.thermocatenulatus</i> Serbest Enzim	Bağıl Aktivite (%) <i>B.thermocatenulatus</i> İmmobilize Enzim
Kontrol	-	100	100
	0.1	101	123
	0.5	97	116
PMFS	1.0	95	106
	0.1	105	240
	0.5	103	200
β -merkaptotanol	1.0	100	140
	0.1	105	310
	0.5	102	209
DTT	1.0	101	140
	0.1	102	120
	0.5	100	113
EDTA	1.0	97	110

B. pumilus MBB03 serbest ve immobilize enzim üzerine, inhibitör ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesini farklı miktarlarda genellikle azaltıcı etki gösterdiği belirlendi. PMFS 0.1 mM konsantrasyonda serbest enzim aktivitesini % 15, 0.5 mM

konsantrasyonda % 14, 1.0 mM konsantrasyonda % 36 oranında kontrole kıyasla azalttığı belirlendi. β -merkaptoetanol 0.1 mM konsantrasyonda serbest enzim aktivitesini % 30, 0.5 mM konsantrasyonda % 38, 1.0 mM konsantrasyonda % 30 azalttığı saptandı. DTT 0.1 mM konsantrasyonda serbest enzim aktivitesini % 32, 0.5 ve 1.0 mM konsantrasyonda % 43 azalttığı saptandı. *B. pumilus* MBB03 immobilize enzim üzerine, PMSF ve β -merkaptoetanol hariç enzim aktivitesini kontrole oranla azalttığı saptandı. PMSF' nin immobilize enzim aktivitesi üzerine 0.1 mM konsantrasyonda % 10 arttırıcı, 1.0 mM konsantrasyonda % 33 azaltıcı etki gösterdiği belirlendi. Benzer şekilde β -merkaptoetanol' ün 0.1 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini % 25 oranında artırdığı 1.0 mM konsantrasyonda % 20 oranında azalttığı saptandı. DTT' nin farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesini azalttığı, EDTA' nın 1.0 mM konsantrasyonda enzim aktivitesi % 33 azalttığı belirlendi. (Çizelge 4.13.11b)

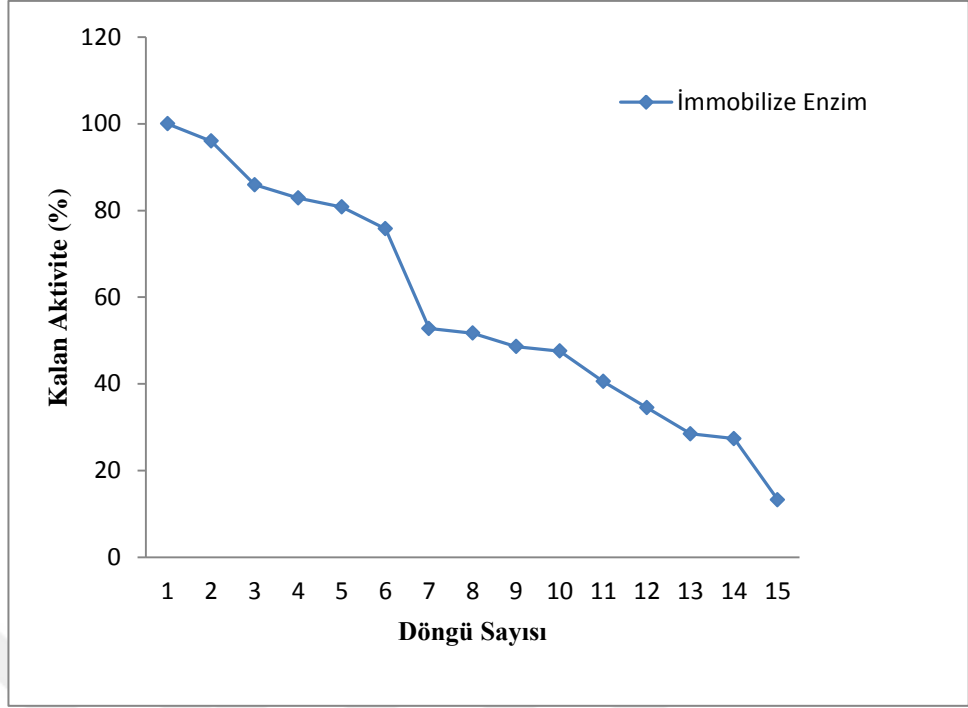
Çizelge 4.13.11b Bazı kimyasal ve inhibitör maddelerin *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipaz aktivitesi üzerine etkisi.

Bazı Kimyasal ve İnhibitör Maddeler	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%) <i>B.pumilus</i> Serbest Enzim	Bağlı Aktivite (%) <i>B.pumilus</i> İmmobilize Enzim
Kontrol	-	100	100
PMSF	0.1	85	110
	0.5	84	92
	1.0	64	67
β -merkaptotanol	0.1	70	125
	0.5	62	90
	1.0	60	80
DTT	0.1	67	92
	0.5	57	92
	1.0	57	80
EDTA	0.1	106	93
	0.5	102	77
	1.0	100	67

4.13.12 İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği

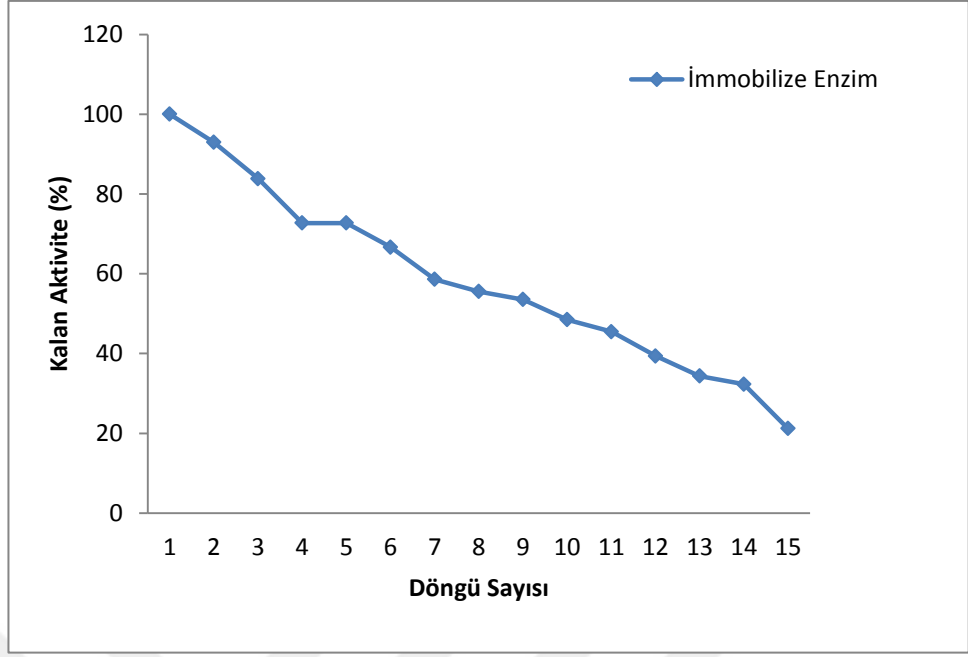
Alginat-jelatin jel karışımında immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* lipazlarının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için sırasıyla; 0.003 ve 0.004 g boncuk kullanılarak boncukların lipaz aktivitesi kayboluncaya aynı boncuklarla 15 döngü olarak gerçekleştirildi.

Alginat+jelatin boncuklara immobilize *B. thermocatenulatus* lipazı, 1. döngüde tamamen, 2. döngüde % 96' sını, 5. döngüde aktivitenin yaklaşık % 80'ının korunduğu daha sonraki döngülerde aktivitenin azaldığı görüldü. 15. Döngü sonunda yaklaşık % 13oranında aktivitenin korunabildiği belirlendi (Şekil 4.13.12a).



Şekil 4.13.12a *B.thermocatenulatus* immobilize lipazının yeniden kullanılabilirliği

Alginat+jelatin boncuklara immobilize *B. pumilus* MBB03 lipazı, 1. döngüde tamamen, 2. döngüde % 92' sını, 3. döngüde aktivitenin yaklaşık % 80' inin korunduğu, 6. döngüye kadar yaklaşık % 70' ini, daha sonraki döngülerde aktivitenin azaldığı görüldü. 15. döngü sonunda yaklaşık % 20' i oranında aktivitenin koruyabildiği belirlendi (Şekil 4.13.12b).

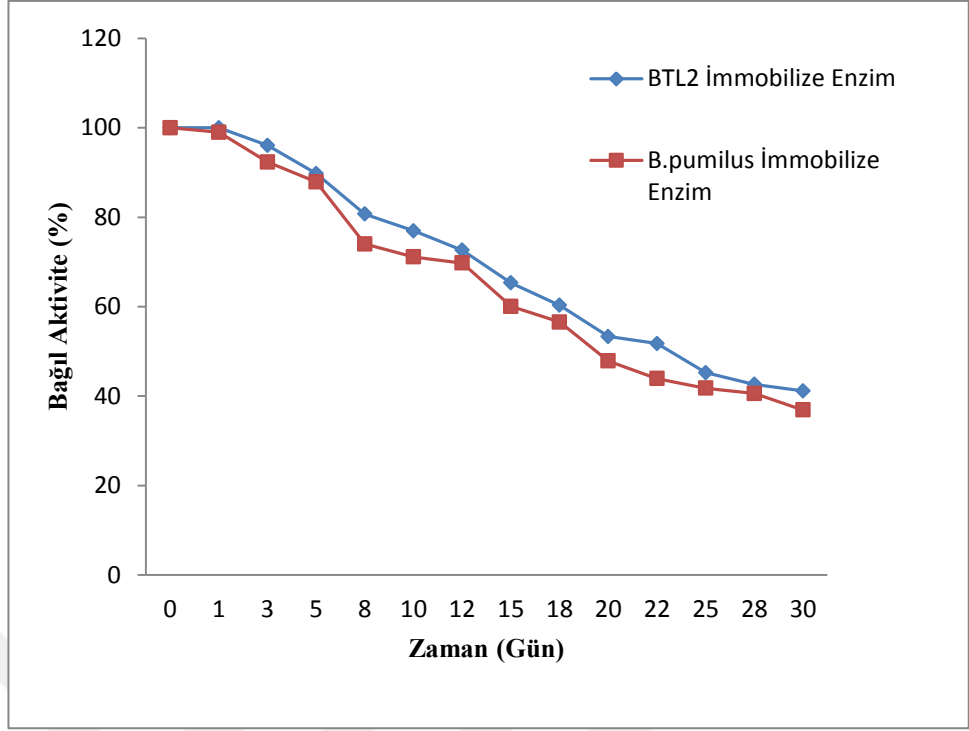


Şekil 5.13.12b *B. pumilus* MBB03 immobilize lipazının yeniden kullanılabilirliği

4.13.13 İmmobilize Enzimlerin Depo Kararlılığı

Alginat+jelatin boncuklara immobilize BTL2 ve *B. pumilus* lipazının depo kararlılığını belirlemek amacıyla; serbest ve immobilize enzimin aktivite tayinleri 2 gün aralıklarla gerçekleştirildi.

B.thermocatenulatus ve *B.pumilus* MBB03 immobilize lipazın 1. günün sonunda aktivitesinin hemen hemen tamamını koruduğu, 8. günde sırasıyla aktivitenin % 80 ve % 73' ünü koruduğu, ancak daha sonraki günler aktivite de azalmalar olduğu ve 30. gün sonunda sırasıyla aktivitenin yaklaşık % 40 ve % 36' sının korunduğu belirlendi (Şekil 4.13.13).



Şekil 4.13.13 Alginat+jelatin boncuklara immobilize *B.thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazının depo kararlılığı grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojik endüstriyel enzimler ile ilgili yapılan çeşitli araştırmalar önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojilerinin başka bir ifade ile genetik ve protein mühendisliğinin uygulamalarından yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır [22]. Enzimlerin kullanıldığı pek çok alanda lipazların önemi giderek artmaktadır. Endüstriyel enzim pazarında önemli yeri olan, *Bacillus* soylarından elde edilen lipazlar kullanıldığı birçok endüstriyel sürecin yanı sıra biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir role sahiptir [6]. Lipazlar, geniş kapsamlı önemi nedeniyle, yoğun bir çalışma konusu olmaya devam etmektedir. Lipaz üzerine araştırmalar, özellikle lipaz genini klonlama ve sıralama, kinetik, eylem mekanizmasının aydınlatılması, genel karakterizasyon performansı ve yapısal karakterizasyonu üzerine odaklanmıştır [21].

Endüstriyel uygulamalarda enzim tarafından katalizlenmiş reaksiyonlarda hem teknik hem de ekonomik nedenlerden dolayı kullanılan biyokatalizörün yeniden veya sürekli olarak kullanımı gerekmektedir. Enzim immobilizasyonu çözülmüş durumdaki bir enzimin tekrar ve sürekli kullanımını mümkün kılmak, kararlılığını artırmak için endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğinin artmasına olanak sağlamaktadır [72, 80]. İmmobilizasyon tekniklerinden biri olan tutuklama tekniği, bir boşluğa veya ağ içine enzimin fiziksel olarak hapsedilmesi olarak tanımlanabilir. [130].

Bacillus thermocatenuatus-BTL2 ve *Bacillus pumilus* MBB03 tarafından üretilen termofilik lipazlar alginat+jelatin jel karışımında tutuklama yöntemi ile immobilize edilmiş ve bazı biyokimyasal özellikleri serbest enzimle karşılaştırılmıştır. Sodyum alginat jelde immobilizasyon, hızlı ve kolay uygulanabilir bir metot olması nedeniyle immobilizasyon çalışmalarında büyük kolaylık sağlamaktadır. Alginat jel, enzim kaçışını önleyecek fakat substratın enzime erişimini engellemeyecek gözenek yapısına sahiptir. Jelatin jeller ise ılımlı immobilizasyon koşulları sağlar. Her iki polimer

maddenin karışımı kullanılarak ideal bir tutuklama materyali oluşturulmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada, birçok endüstriyel ve çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılan lipaz enziminin *B.thermocatenulatus* ve *B.pumilus* MBB03 lipazı rekombinanat olarak üretilmiş ve elde edilen rekombinanat lipazlar alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklama yöntemi kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen immobilize boncuklar için optimum alginat konsantrasyonu, jelatin konsantrasyonu, CaCl₂ yüzdesi, enzim miktarı, boncuk boyutu, boncuk miktarı gibi immobilizasyon koşulları optimize edilmiştir. Ayrıca serbest ve immobilize lipazın bazı biyokimyasal karakterizasyon parametreleri incellenmiştir.

BTL2 lipazı natif promoter kontrolü altında *E. coli* içinde Schmidt-Dannert tarafından ifade edilmiştir [58, 61]. *B. pumilus* I.4 altfamilyasına ait lipaz üretir. Bu lipazlar rasemik substrat seçiciliklerinden dolayı dikkate değer bir biyoteknolojik potansiyel sergilediği gösterilmiştir. Şu ana kadar, bazı *B. pumilus* lipazı topraktan izole edilerek karakterize edilmiştir. Ancak, bunların kültür ortamı içinde hücre dışı lipaz etkinlikleri çok düşük olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, bazı araştırma grupları rekombinant *B. pumilus* lipazını ifade etmeye ve aynı zamanda katalitik aktivitelerini geliştirmek için çalışmalar yapılmıştır [69, 129, 131, 132, 133, 134].

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 DNA'sından klonlama çalışmalarında kullanılan restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini de taşıyan ileri ve geri primerlerin kullanıldığı PCR ile elde edilen sırasıyla ~1251 bp ve ~648 bp uzunluğundaki her bir lipaz geni doğrudan sırasıyla pEcoli-Cterm-6xHN ve pD451-SR:219414' ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Uygun restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri, ilgili genlerin NCBI veri tabanındaki DNA dizisinden yola çıkılarak elde edilen restriksiyon kesim haritasına göre seçilmiştir.

pEcoli-Cterm-6xHN/lipaz plazmitindeki *B. thermocatenulatus* lipaz'a ait gen dizisi ve pD451-SR:219414/lipaz plazmitindeki *B.pumilus* MBB03 lipaz' a ait gen dizisi, GenBank'te bulunan 1321705:106-1374 nolu *B.thermocatenulatus* triaçilgliserol lipaz

geni ve 215414329:121-768 nolu *Bacillus pumilus* triaçilgliserol lipaz geni dizisine dizisine %100 benzerlik göstermektedir.

pEcoli-Cterm-6xHN/lipaz ve pD451-SR:219414/lipaz plazmitini içeren *E.coli* BL21(DE3) hücreleri IPTG ile uyarılmasıyla yüksek derecede eksprese edilmiştir.

Lipaz enzimini saflaştırmak için çalışmada, Ni-NTA afinite kolonu kullanılmıştır. Mikrobiyal kaynaklı lipazları saflaştırılması sırasında farklı teknikler kullanılmaktadır. Lipaz saflaştırılmasında kullanılan önemli tekniklerden biri Ni-NTA afinite kolonu ile tek basamakta saflaştırma tekniğidir. Schlieben ve ark. (2004) *B.thermocatenulatus*' a ait lipazı saflaştırmak için bu yöntemi kullanmıştır [135]. Bununla birlikte lipaz enzimini saflaştırmak için iyon değişim kromatografisi [57], jel filtrasyon kromatografisi [129], DEAE-selüloz, Sephadex G200, amonyum Persülfat [136], HiTrap SP FF kolonu ve Süperoz 12 kolon kromatografisi [69] gibi farklı yöntemler de kullanılmıştır.

B.thermocatenulatus BTL2 ve *B.pumilus* MBB03 suşundan 300 ml ham enzim kaynağı 3.000xg, +4' de 15 dk santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrasında elden edilen her bir protein peletine His60 NixTractor Tamponu eklenerek Ni-NTA afinite kolonuna tatbik edildi ve lipaz enzimi saflaştırıldı. Ham enzim ekstratında *B.thermocatenulatus* enzimin özgül aktivitesi 0.196 U/mg protein ve *B.pumilus* enziminin özgül aktivitesi 0.076 U/mg protein olarak belirlendi. Ni-NTA afinite kolonu sonrası, *B.thermocatenulatus* 10.9 U/mg protein, *B.pumilus* 4.6 U/mg protein olarak bulundu (Çizelge 4.9). Bu sonuçlara göre *B.thermocatenulatus* lipazı % 68.3 verimle 55.67 kat, *B.pumilus* lipazı % 70.6 verimle 60.43 kat saflaştırıldı. *Bacillus pumilus* B26' dan lipaz enzimi Amonyum sülfat çöktürmesi, CM Sefaroz, Jel filtrasyon kullanılarak % 34 verimle 4.3 kat saflaştırılmıştır [129]. Başka bir çalışmada *B.pumilus* BPL1' den amonyum sülfat çöktürmesi, HiTrap SP FF ve Seperose 12 aşamaları kullanılarak % 18.2 verimle 3.87 kat saflaştırılmıştır [69]. Bunlardan farklı olarak, *Bacillus pumilus* RK31' den lipaz enzimini santrifüj işleminden sonra % 60' lık amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyonu (Sephadex G-200), iyon değişimi (DEAE selüloz) kromatografisi kullanılarak 186 kat saflaştırılmıştır [136]. *B. thermocatenulatus*' dan

lipaz enzimi hücre parçalama işleminden sonra Bütil sefaroz, ultrafiltrasyon ve gel filtrasyonu kullanılarak % 32 verimle 125 kat [137], *B. thermocatenulatus*' dan lipaz enzimi kalsiyum sabunu, Hekzan-ekstraksiyonu, metanol çöktürmesi ve Q-Sefaroz kullanılarak % 11 verimle 67.4 kat [57] saflaştırılmıştır. Ayrıca bizim çalışmamızda kullandığımız gibi *B. thermocatenulatus*' dan lipaz enzimi Ni-NTA affinite kolonu kullanılarak % 60 verimle 6.7 kat saflaştırılmıştır [135]. Bu veriler ışığında, Ni-NTA affinite kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma lipaz saflaştırması için uygun bir yöntem olduğu ve diğer araştırmacıların [57, 62, 69, 129,136, 137] elde ettikleri verimden daha yüksek bir verime sahip olduğu söylenebilir.

Uygulanan saflaştırma işleminden sonra elde edilen enzim elüatları elektroforetik olarak analiz edildi. Hazırlanan %12.5' lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezine enzim elüatlarının uygulanması ve ardından Commassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucu mevcut protein bantlarının tek bant halinde görülmesi enzimin saflaştırıldığını desteklemektedir (Şekil 4.10).

pEcoli-Cterm-6xHN/lipaz ve pD451-SR:219414/lipaz plazmitini içeren *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinde IPTG ile uyarılmasıyla yüksek derecede eksprese edilen örneklerin SDS-PAGE jeli sonucunda *B.thermocatenulatus*-BTL2-lipaz moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 43 kDa ve *B.pumilus* MBB03-lipazın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 22 kDa olarak tespit edilmiştir.

Bacillus pumilus BPL1 soyundan izole edilen lipaz enziminin molekül kütlesi yaklaşık 23 kDa olarak saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz molekül kütlesi ile benzer sonuç göstermektedir [134]. Daha önce yapılan çalışmalarla, bu tez çalışmasında bulunan *B.pumilus* lipaz proteinin boyutları uyumlu olsa da farklı boyutlardaki lipazlar da ifade edilmiştir. Kim ve ark. (2002) nın *Bacillus pumilus* B26' da yaptığı çalışmada yaklaşık 19,225 kDa boyutunda lipaz varlığı tespit etmiştir [129] Litantra ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarında *Bacillus pumilus* (BPL1 ve BPL3) lipazlarının sırasıyla 23 kDa ve 19 kDa olduğunu rapor etmişlerdir [69]. Bununla birlikte, Kumar ve ark.(2012)' nın *B.pumilus* RK31 ile yaptıkları çalışmada DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile saflaştırdıkları lipaz boyutunun 62.2 kDa olduğunu belirlemişlerdir [136]. Başka bir

çalışmada, *Bacillus sp strain 398*' den elde edilen lipazın moleküler ağırlığının 50 kDa olduğu belirtilmiştir [138]. Bunlara ek olarak yapılan başka çalışmalarda ise *Bacillus strain A30-1* (ATCC 53841)'a ait 65 kDa boyutunda [138], *Bacillus sp. THLO27*'e ait 69 kDa [140] lipaz varlığı rapor edilmiştir.

Schmidt-Dannert ve arkadaşlarının 1994 yılında *B.thermocatenulatus* (DSM 730) yaptıkları çalışmalarında, iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırılan lipaz moleküler kütlelerini 16 kDa olarak belirlemişlerdir [57]. Bu çalışmadan sonra yine Schmidt-Dannert ve arkadaşlarının 1996 yılında *B. thermocatenulatus* lipazını *E.coli DH5α*' da ekspresse ettikleri çalışmalarında 43 kDa moleküler kütlelerinde lipaz varlığını rapor etmişlerdir [61]. Rua ve arkadaşlarının 1997 yılında *B. thermocatenulatus*'da yaptığı çalışmada, *E. coli BL321*' de zayıf bir şekilde ekspresse ettikleri BTL2 lipazının 32 kDa, aşırı ekspresse ettikleri lipazın 40 kDa molekül kütlelerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [137]. Bununla birlikte, Quyen ve arkadaşlarının 2003' de *B.thermocatenulatus* ile yaptıkları çalışmada *Pichia pastoris*' de ifade ettikleri BTL2-lipazının pH 7,5-8,5' de en yüksek tribütirin C4 karbon içeren substrata afinite gösteren 60 °C'da kararlı olan lipaz boyutunun yaklaşık 43 kDa olduğu rapor edilmiştir [62]. Başka bir çalışmada ise Karkhane ve arkadaşlarının 2009 yılında *B.thermocatenulatus* lipazı aktif bölge substrat spesifite ve stabilizesi üzerine yaptıkları çalışmada yaklaşık 43 kDa molekül kütlelerinde lipaz rapor edilmiştir [141]. Bu çalışmalara ek olarak Schlieben ve ark. (2004)' nin bizim çalışmamıza benzer His-tag saflaştırma tekniği kullanarak *B. thermocatenulatus* ile yaptığı çalışmada 44.020 kDa moleküler kütleyle sahip lipaz varlığını saptamışlardır [135]. Bu veriler doğrultusunda elde edilen lipazların molekül ağırlıkları bakteri türüne veya alt türlerin özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Yapılan bu çalışmada *B. thermocatenulatus* BTL2 ve *B. pumilus* MBB03 suşlarından saflaştırılan lipaz enzimlerinin molekül kütleleri bu sonuçlarla uyumludur.

Numunelerdeki protein düzeyleri Bradford metodu ile yapılmıştır. Bradford yönteminde standart protein olarak 0.2 mg/ml sığır serum albümini (BSA) kullanılmış, standart grafik çizilmiştir (Şekil 3.2.10). Çalışmada lipaz çözeltilisinin ve immobilize enzimin

damlatıldığı CaCl_2 çözeltilerinin ve yıkama sularının protein miktarları bu standart grafiklerden yararlanılarak belirlenmiştir. Bulunan protein miktarlarından, tutunmayan protein ve tutunan protein miktarları hesaplanarak immobilizasyon yüzdesi tayin edilmiştir. *B. thermocatenulatus* için immobilizasyon yüzdesi % 73 immobilizasyon verimi % 63 *B.pumilus* MBB03 için immobilizasyon yüzdesi % 82 verimi % 74 olarak belirlenmiştir. İmmobilize *B.thermocatenulatus* lipaz enzimi spesifik aktivitesi 6.9 U/mg protein olarak belirlenmiştir. *B. pumilus* MBB03 lipaz enzimin spesifik aktivitesi ise 3.4 U/mg proteindir. Elde edilen bu sonuçlardan *B.pumilus* MBB03 lipazı immobilizasyon yüzdesinin ve % veriminin daha iyi olduğu görülmektedir. Bu durum *B. pumilus* MBB03 lipazının immobilize formda aktif bölge yapısının daha iyi korunmasıyla açıklanabilir.

Tutuklama materyali olarak kullanılan polimerin yani jelin konsantrasyonu ve tutuklama çözeltilisinin konsantrasyonu enzimin tutuklamasında önemli parametrelerdir. Bu nedenle öncelikle lipazın aktivitesi üzerine alginat ve jelatin konsantrasyonunun etkisi, CaCl_2 konsantrasyonu ayrıca enzim miktarı, boncuk boyutu ve boncuk miktarının etkileri de araştırılmış ve optimum değerleri belirlenmiştir. Sırasıyla; % 10, 15, 20, 25, 30 (w/v) olacak şekilde jelatin jellere immobilize enzimin spesifik aktivite tayinleri yapılarak, jelatin konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan aktivite tayini sonucunda optimum jelatin konsantrasyonu *B. thermocatenulatus* lipazı ve *B. pumilus* MBB03 lipazı için sırasıyla % 20, % 25 olarak belirlendi (Şekil 4.12.1). Alginat+jelatin jel boncuklara tutuklu lipaz enzim immobilizasyon çalışmasında, artan jelatin konsantrasyonu immobilizasyon verimini artırmıştır. Ancak *B. thermocatenulatus* lipazı % 20 (w/v) ve *B. pumilus* lipazı % 25 (w/v) jelatin konsantrasyonu ve daha yüksek konsantrasyonlarda boncuk yapımının zorlaştığı gözlemlendi. Bu nedenle optimum jelatin konsantrasyonları olan % 20, % 25 (w/v) jelatin kullanılmasına karar verildi. % 1.5, % 2, % 2.5, %3 (w/v) olacak alginat konsantrasyonlarında immobilizasyonlar gerçekleştirilmiş ve aktivite tayinleri yapılarak, alginat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Optimum alginat konsantrasyonu *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipaz için sırasıyla % 2 ve % 2.5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.12.2).

Sodyum alginat+ jelatin karışımı ile gerçekleştirilen tutuklamalarında jel indükleyici sistem olarak CaCl_2 katyonik çözeltisi kullanılmaktadır. Won ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada belirtildiği gibi alginat+jelatin jeller için CaCl_2 damlatma çözeltisi kullanmışlardır [142]. Bizde yapılan çalışmada CaCl_2 damlatma çözeltisi kullandık ve optimum kalsiyum klorür konsantrasyonu *B. thermocatenuatus* lipazı ve *B. pumilus* MBB03 lipazı için 250 mM olarak belirlendi (Şekil 4.12.3).Yapılan çalışmada CaCl_2 konsantrasyonu arttıkça immobilizasyon veriminin arttığı, fakat 250 mM CaCl_2 konsantrasyonundan sonra immobilizasyon veriminin değişmediği görülmüştür. Bu verilerde doğrultusunda elde edilen immobilize jel formlarının en uygun jel yapısının 250 mM konsantrasyonda kazandığı söylenebilir. CaCl_2 ' ün düşük konsantrasyonlarında elde edilen jelin gözenek yapısının büyük olmasından dolayı enzim kaçışlarının olabildiği, CaCl_2 ' ün yüksek konsantrasyonlarında ise sıkı bir jel yapısının oluşmasından dolayı substratın jel içine nüfus etmesinin zorlaştığı düşünülebilir. Litaratür araştırmaları sonucunda elde edilen bu bilgiler yapılan bu çalışmayı destekler niteliktedir. Ca-alginat jel boncuklara tutuklu lipaz enzimi immobilizasyonu çalışmasında, yapılan çalışmaya benzer % 1-2 (w/v) konsantrasyonda kullandıkları alginat konsantrasyonu arttıkça immobilizasyon veriminin arttığı fakat 50-300 mM konsantrasyonda kullanılan CaCl_2 konsantrasyonu arttıkça immobilizasyon veriminin değişmediği görülmüştür. [142]. Ozyılmaz ve Gezer 2010 yılında yaptıkları çalışmada kalsiyum-alginat jel üzerine immobilize ettikleri *Candida rugosa* ve domuz pancreatic lipazı en iyi sonuçları *Candida rugosa* için % 2.5 Na-Alg ve 2.5 M CaCl_2 iken domuz pancreatic lipazı için % 2.5 Na-Alg ve 2.0 M CaCl_2 olarak belirlemişlerdir [143]. Yapılan çalışmaya benzer şekilde *Pseudomonas sp* lipazının alginat boncuklara immobilize edilen çalışmada, % 1.5-2.5 (w/v) arasında alginat konsantrasyonu ve 50-200 mM arasında CaCl_2 konsantrasyonu kullanılmıştır. Çalışmada alginat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin arttığını ve CaCl_2 konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir [144]. Rakmai ve ark. (2015), % 1-3 (w/v) sodyum alginat ve % 1-3 (w/v) jelatin konsantrasyonu ve 100-300 mM CaCl_2 konsantrasyonu kullanmışlardır [145]. Mondal ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları *Pseudomonas cepacia* lipazı immobilizasyon çalışmalarında % 20 w/v alginat konsantrasyonu ve 60 mM CaCl_2 konsantrasyonu belirlemişlerdir [146]. Bunlara

ilaveten yapılan çalışmalarda, Trabelsi ve ark.(2014) alginat konsantrasyonunu %1, 2 ve 3 konsantrasyonlarda, Vujciv ve ark.(2011) gelatin konsantrasyonunu % 20 (w/v) olarak kullanmışlardır [147, 148].

Alginat+jelatin boncuklara yüklenen enzim miktarının katalitik aktivite üzerine etkisi beş farklı enzim konsantrasyonu çalışılarak incelenmiştir. Enzim miktarıyla orantılı olarak aktivitenin de arttığı ancak belli bir miktardan sonra azaldığı gözlenmiştir. Boncuklara yüklenecek enzim miktarının optimizasyon çalışmasında *B.thermocatenulatus* lipaz 2 mL (0.048 mg/mL), *B.pumilus* 3 mL (0.066 mg/mL) enzim konsantrasyonunun optimum enzim miktarı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12.4). Cheirsilp ve ark. (2009) yüklenen enzim konsantrasyonu arttıkça, lipaz aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir [144]. Ayrıca Vaidya ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmalarında benzer şekilde yüklenen enzim miktarı arttıkça, lipaz aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir [149]. Bu çalışmada ise belli bir orandan sonra yüklenen enzim miktarı arttıkça lipaz aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Boncuk boyutunun aktivite üzerine etkisi çalışıldığında; en yüksek aktivite *B.thermocatenulatus* lipazı için 0.70x32 mm çapında (siyah uçlu enjektörle), *B.pumilus* MBB03 lipazı için 0.80x38 mm çapında (yeşil uçlu enjektörle) hazırladığımız boncuklarda belirlenmiştir. Siyah ve yeşil uçlu enjektör kullanılarak elde edilen 10 adet boncuk ortalaması alınarak 0.19 mm ve 0.29 mm'lik boncukların çapı optimum boncuk boyutu olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12.5). Won ve ark. (2005) Ca-alginat jel boncuklara tutuklu lipaz enzimi immobilizasyonu çalışmasında, farklı iğne çapı kullanılarak elde edilen boncuk boyutu optik mikroskopla ölçülmüş ve boncuk boyutu arttıkça spesifik aktivitenin azaldığı görülmüştür [142]. *Pseudomonas sp.* lipazının sodyum alginat ile immobilizasyon çalışmasında elde 2.03, 2.53, ve 3.02 mm çapında boncuk elde edilmiş ve boncuk boyutu arttıkça immobilize lipaz aktivitesinde azalma olduğu belirtilmiştir [144]. Yapılan başka çalışmalarda kütle transfer direnci nedeniyle boncuk boyutu arttıkça immobilize enzim aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir [150,151]. Bu çalışmada ise siyah ve yeşil uçlu enjektör kullanıldığında maksimum aktivite gözlemlenmiştir.

Kullanılacak optimum boncuk miktarını belirlemek için gerçekleştirilen çalışmada 0.01-0.1g aralığında olmak üzere farklı boncuk miktarı ile çalışılmış; *B. thermocatenulatus* immobilize lipaz için 0.003 g boncuk miktarının, *B. pumilus* immobilize lipaz için 0.004 g boncuk miktarının en yüksek enzimatik aktiviteyi gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.12.6). Yapılan çalışmada boncuk miktarı arttıkça enzim aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlardan ortmada bulunan substratı katalizleyen enzim miktarının boncuk yapısında tutuklanabildiği ve boncuk ağırlının artmasıyla ortamda fazla miktarda enzim bulunmasından dolayı kirlilik unsurunun oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasının ikinci kısmında; alginat+jelatin jellerde tutuklanan *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazına ait optimum pH ve sıcaklık, substrat spesifitesi, Km ve Vmaks değerleri, termal ve pH kararlılık, yeniden kullanılabilirlik, depo kararlılığı, metal iyon etkisi organik çözücü etkisi gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Optimum pH değeri enzim aktivitesinin ifade edilmesinde önemli bir faktördür. Enzimin endüstriyel olarak kullanıldığı birçok alan mevcuttur. Enzimin pH'ya duyarlı olması ve optimum pH değeri endüstride kullanım alanın genişlemesi ve kullanım potansiyelinin artmasına sağlar. İmmobilizasyon işlemi enzimin çalışma koşullarını daha ılımlı hale getiren bir metottur ve enzimin pH çalışma aralığını değiştirebilir veya genişletebilir.

B. thermocatenulatus BTL2 ve *B. pumilus* MBB03' den saflaştırılan lipaz için aktivitenin pH'ya olan bağılılığı serbest ve immobilize lipaz için optimum pH çalışması pH 4.0-12.0 aralığında *p*-nitrofenil türevleri kullanılarak gerçekleştirildi. Lipazların genellikle alkali pH'larda aktivite gösterdikleri bilinmektedir [152]. *B. thermocatenulatus* lipazı *p*-nitrofenil dekonat kullanılarak yapılan aktivite tayiniyle incelendi ve inceleme sonucunda serbest enzimin en iyi aktiviteyi pH 9.0' da, immobilize enzimin en iyi aktiviteyi pH 9.5'de gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.13.1a). *B. pumilus* MBB03 lipazı *p*-nitrofenil oktanat kullanılarak yapılan aktivite tayiniyle incelendi ve inceleme sonucunda serbest enzimin en iyi aktiviteyi pH 8.5' da immobilize enzimin en iyi aktiviteyi pH 9.0'da gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.13.1b).

pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren bu grafiklere göre enzimin asidik pH' larda çok düşük aktivite gösterdiği ve hafif alkali pH'larda *p*-nitrofenil ester substratlarını hidroliz etme yeteneğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte literatüre göre *B. termocatenulatus*' dan saflaştırılan BTL2- lipazının pH-stat yöntemiyle optimum pH değeri 9.0 olarak belirlenmiş ve enzimin pH 9.0 ile 11.0 arasında aktivitesinin stabil olduğu tespit edilmiştir [58]. Quyen ve ark. (2003) *B. termocatenulatus*' dan elde ettikleri lipazın *pH-stat* metoduyla substrat olarak tribütirin ve triolein kullandıkları çalışmada maksimum aktiviteyi pH 7.5 ve pH 9.0 gösterdiği rapor edilmiştir [62]. *Bacillus pumilus* B26 soyundan elde edilen lipaz için optimum dengesinin 8,5 olduğu [129], *Bacillus pumilus* BPL1 ve BPL3 soylarından elde edilen lipazlar için sırasıyla pH 8.5 ve pH 8.0 olduğu ve aktivitelerini % 60 ve % 50' sinden fazlasını koruduğu rapor edilmiştir [69]. Farklı bakteri soylarından *B. pumilus* [134], *B. termocatenulatus* [61] *Bacillus sp suşu* 398 [138], *B. termocatenulatus* [137] elde edilen lipazların optimum pH değerleri bakımından benzerlik göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda *B. termocatenulatus* ve *B. pumilus* lipazı optimum pH bakımından literatürle uyumlu olduğu söylenilebilir. Ayrıca yapılan çalışmada *B.thermocatenulatus* lipazı ve alginat+jelatin jellerde tutuklanan lipazının optimum pH değeri 9.5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.13.1a). *B.pumilus* MBB03 lipazı ve alginat+jelatin jellerde tutuklanan lipazının optimum pH değeri 8.5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.13.1b). Bu durum gerçekleştirilen immobilizasyon uygulamasının her iki lipaz'ın optimum pH'ı değerini artırdığı ancak üzerinde önemli bir değişiklik yapmadığını göstermektedir. Serbest enzimlere oranla immobilize enzimlerin pH değerinde meydana gelen bu artışın oluşturulan boncuk yapısından dolayı enzimin bocuk içinde tutuklanmasıyla daha yüksek pH değerlerinde optimum aktivite göztermesiyle açıklanabilir. Chiou ve Wu, (2004) *Candida rugosa* enzimi immobilizasyonu çalışmasında, optimum pH'ı belirlemek için pH 3 ile 11 arasında çalışmışlar ve serbest enzim için de, immobilize enzim için de optimum pH'ını 7 olarak belirlemişlerdir [153]. *Candida rugosa* lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum pH 8.0 iken immobilize lipaz için optimum pH 9.0 bulunmuştur [154]. Lipaz enzimi PVC, kitosan, kitin, agaroz, sefaroze, ve trisakril üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için

optimum pH 7.5 iken immobilize lipaz için optimum pH 8.5 bulunmuştur [155]. Elde edilen literatür bilgileriyle çalışmanın verileri birbirini destekler niteliktedir.

Bakteriyal lipazların genellikle optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 30-60 °C aralığındadır. Serbest ve alginat+jelatin jellere tutuklanmış immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazı üzerine aktivitesinin sıcaklıkla değişimi *p*-nitrofenil dekonat ve *p*-nitrofenil oktanat substratları kullanılarak 10-90 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde incelendi. *B.thermocatenulatus* serbest enzimin optimum sıcaklığı 60 °C, tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 65-70 °C olarak belirlendi (Şekil 4.13.2a). *B.pumilus* serbest enzimin optimum sıcaklığı 50 °C, immobilize enzimin optimum sıcaklığı 55°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13.2b). *B.thermocatenulatus* lipaz aktivitesinin büyük bir kısmının oldukça geniş bir sıcaklık aralığında korunmuş olması, bu enzimin 40'dan 70 °C' ye kadar herhangi bir sıcaklıkta kolaylıkla kullanılabileceğini ve çeşitli endüstriyel uygulamalar açısından büyük avantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan literatür araştırmalarında, *Bacillus stearothermophilus* P1 ve *Bacillus licheniformis* lipazının optimum sıcaklığı 55 °C [156, 157], *Bacillus stearothermophilus* L1, *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Bacillus thermoleovorans* CCR11, *Bacillus thermocatenulatus* ve *Bacillus thermocatenulatus* Δα-BTL-2 lipazlarının optimum sıcaklığının 60 °C olduğu kaydedilmiştir [61, 64,158, 159, 160]. Bunların dışında *Bacillus licheniformis* RSP 09 ve *Bacillus pumilus* B26 lipazının optimum sıcaklığının 40°C ve *Bacillus subtilis* lipazının optimum sıcaklığının 45 °C olduğu rapor edilmiştir [129, 161, 162]. Ca-alginatla immobilize edilen lipaz için optimum sıcaklık 50°C, kitosan üzerine immobilize edilen *Candida rugosa* serbest lipazın 30°C' nin üstünde yüksek aktiflik gösterdiği, immobilize lipazın ise 40°C' nin üstünde yüksek aktiflik gösterdiği bildirilmiştir. 60 °C' de serbest lipazın % 12 imobilize lipazın ise % 23 aktifliğini koruduğu gözlenmiştir [154, 163]. Lipaz enzimi PVC, kitosan, kitin, agaroz, sefaroze, ve trisakril üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum sıcaklık 35°C iken immobilize lipaz için optimum sıcaklık 45 °C bulunmuştur [155]. Yapılan bu çalışmada immobilize enzimlerin serbest enzimlere kıyasla daha yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermeleri elde edilen alginat jelatin jel yapısı içinde enzimin artan sıcaklıklardan etkilenmediği ve enzim yapısının

korunduğu kanaatindeyiz. Elde edilen enzimlerin serbest ve immobilize formlarının optimum pH ve sıcaklık özellikleri dikkate alındığında optimum sıcaklıkların 40 °C' nin üzerinde ve alkali pH sahip olmaları enzimlerin organik sentez çalışmalarında ve deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilme özelliği olacağı düşünülebilir.

B. thermocatenulatus ve *B. pumilus* lipazı için aktivitenin protein konsantrasyonuna bağlılığı incelendiğinde sırasıyla 60 µg/mL' ve 75 µg/mL' lik konsantrasyona kadar reaksiyon karışımındaki enzim miktarının aktiviteyi arttırdığı görüldü (Şekil 4.13.3a, Şekil 4.13.3b). Daha yüksek konsantrasyon değerlerinde ise lipaz aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu ve maksimum enzim miktarına ulaşıldıktan sonra aktivitenin enzim miktarından etkilenmediği belirlendi. *Geobacillus stearothermophilus* AH22 lipazı için aktivitenin protein konsantrasyonuna bağlılığı incelendiğinde 75 µg/mL'lik konsantrasyona kadar reaksiyon karışımındaki enzim miktarının artması aktiviteyi arttırmaktadır [164].

Serbest ve alginat + jelatin jellerde tutuklanan *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* lipazı için en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla *Vmaks* reaksiyon hızı ve *Km* Michaelis-Menten sabiti Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulunmuştur. *Km* enzimin substrata olan ilgisiyle ters orantılı bir parametredir [165]. Serbest ve alginat + jelatin jellerde tutuklanan *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazı için en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla protein konsantrasyonu sabit tutularak değişen konsantrasyonlarda substrat içeren bir dizi reaksiyon karışımında aktivite ölçümleri yapıldı. Substrat olarak *p*-nitrofenil dekonat ve *p*-nitrofenil oktaonat kullanıldı. Bu substratlar için elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.13.4a, Şekil 4.13.4b). *Km* ve *Vmaks* değerleri hesaplandı. *B. thermocatenulatus* serbest enzim *p*-nitrofenil dekonat substratı için *Km* ve *Vmaks* kinetik sabitleri sırasıyla 0.146 mM ile 2.504 U/mL iken alginat+jelatin boncuklarda tutuklanan enzim aktivitesine ait *Km* ve *Vmaks* kinetik sabitleri sırasıyla 0.123 mM ile 0.220 U/mL olarak bulundu. *B. pumilus* MBB03 serbest enzim *p*-nitrofenil oktaonat substratı için *Km* ve *Vmaks* kinetik sabitleri sırasıyla 0.055 mM ile 0.636 U/mL iken alginat+jelatin boncuklarda tutuklanan enzim aktivitesine ait *Km* ve *Vmaks* kinetik sabitleri sırasıyla

0.128 U/mL ile 0.119 U/mL olarak hesaplandı. K_m değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür ve ne kadar küçük olursa enzimin substrata olan ilgisinin o kadar büyük olduğunu gösterir. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda *Bacillus* sp.' den elde edilen lipazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.5 mM ve 0.139 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ [166], diğer bir *Bacillus* sp. lipazının K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.19 mM ve 0.032 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ [167], *Bacillus stearothermophilus* MC 7 lipazı için K_m , V_{max} değerleri, 0.33 mM ve 188 $\mu\text{M}\ \text{dak}^{-1}\ \text{mg}^{-1}$ [168], *Candida rugosa* lipazı substrat olarak pNPP kullanıldığında serbest enzimin 0.9 mM ve 2.43 U/mg iken immobilize lipazının K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1.6 mM ve 1.93 U/mg [169], *Pseudomonas* sp alginata immobilize lipazının substrat olarak palmiye yağı kullanıldığında, K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 0.385 M ve 0.567 m/h [144], *Candida rugosa* enzimini kitosan üzerine immobilizasyonu yaptıkları çalışmalarında reaksiyon hızı ve Michaelis-Menten sabiti değerlerini serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla K_m 0.013-1.669 g V_{maks} 3.98-117.23 U/mg protein olarak hesaplanmıştır [153].

Isıl kararlılık immobilize enzim uygulamalarında önemli karakteristik bilgilerinden biridir. Serbest ve alginat jelatin jelde immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının ısı kararlılığını incelemek amacıyla enzim; 40,50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda 15 ve 30 dk gibi değişen sürelerde ve oda ısısında toplam 30 güne kadar inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. Kalan yüzde serbest ve alginat jelatin jelde immobilize *B.thermocatenulatus* ve *B.pumilus* MBB03 lipazlarının aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı. *B. thermocatenulatus* serbest enzimin 40 °C' de 30 dakika sonunda % 78' ini koruduğu belirlendi. 50 ve 60 °C' lerde 30 dakika sonunda ise sırayla % 63 ve % 56' sını koruduğu gözlemlendi. (Şeki 4.13.7a). *B. pumilus* MBB03 serbest enzimin 30 dakika sonunda % 54' ini koruduğu belirlendi. 50 ve 60 °C'lerde 30 dakika sonunda ise sırayla % 58 ve % 71' ini kaybettiği gözlemlendi. (Şekil 4.13.7d). Konuyla ilgili çalışmalar incelendiğinde, Rua ve ark (1997), *Bacillus thermocatenulatus* serbest lipazının 50 °C' de 30 dk sonunda satabilitesini koruduğunu, zayıf ekspresse edilen BTL-2 lipazının 40 °C' nin altında daha az stabilitesini koruduğunu rapor etmişlerdir [137]. Quyen ve ark (2003) *Pichia pastoris*' de ekspresse edilen rekombinanat BTL-2

lipazının, substrat olarak tribütirin kullanılarak 65 °C’ de % 100 koruduğu ve 75 °C’ de % 48 azalma olduğunu 50 °C’ de pH 8.0’ da 0.1M Tris tamponunda 30 dk inkübasyon sonunda stabilitesini koruduğu kaydetmişlerdir [62]. Substrat olarak PNPP ve yağ kullanılan çalışmada, 40 °C’ da lipaz stabilitesinde aktivite kaybı olmadığı, bununla birlikte 40 °C’ nin üzerindeki sıcaklıklarda bir fosfat tamponu (pH 7.5) içinde 30 dakika inkübasyon sonucunda lipaz stabilitesinin azaldığı, 60 °C’ de aktivitenin % 50 sini koruduğu gözlenmiştir [57]. Goodarzi ve ark (2014) *B. thermocatenulatus* doğal ve $\Delta\alpha 5$ -BTL2 lipazı üzerine yapılan bir diğer çalışmada, delesyon $\Delta\alpha 5$ -BTL2 lipazın 65 °C’ de 30 dk sonunda stabilitesini koruduğu, ancak doğal lipazın termal stabilitesinde azalma olduğu rapor edilmiştir. Bu durumun oksianyon delik oluşumu kolaylaştıran aktif merkezin geometrik yapısındaki değişik ile lipaz aktivitesinde artışa neden olabileceği belirtilmiştir [160]. *Bacillus* RK31 lipazının 30 °C ile 60 °C arasında sıcaklık sabitesini koruduğu belirtilmiştir [136]. Bu çalışmalar dışında *B. pumilus* BPL1 lipazının 30 dakika 25 °C’ de inkübasyon sonunda stabilitesini koruduğu ancak 30 °C’ de aşamalı olarak lipaz aktivite kaybı olduğu, *B. pumilus* BPL3 lipazının 30 °C’ ye kadar stabilitesini koruduğu ancak 30 °C’ nin üstünde stabilitesini kaybettiği saptanmıştır [69]. Genelde immobilize enzimin aktivitesi, özellikle kovalent, sıcaklığa ve denatürasyon ajanlarına karşı serbest enzimden daha dirençlidir. *B.thermocatenulatus* immobilize enzimin 40 °C’ de, 15 ve 30 dakika sonunda aktivitesinin sırasıyla yaklaşık % 89 ve % 80’ ini koruduğu belirlendi. 50 °C’ lerde 15 ve 30 dakika inkübasyon sonunda sırasıyla yaklaşık % 83 ve % 71’ ini koruduğu gözlendi. 60 °C’ de 15 ve 30 dakika inkübasyon sonunda yaklaşık sırasıyla % 79 ve % 68’ ini koruduğu belirlendi. 70 °C’ de ise 15 ve 30 dakika sonunda yaklaşık % 57’ ini koruduğu belirlendi. 80°C’ de 15 ve 30 dakika sonunda sırasıyla yaklaşık % 47 ve % 37’ sini koruduğu gözlendi. (Şekil 4.13.7b). *B.pumilus* MBB03 immobilize enzimin 40 °C’ de 30 dakika sonunda % 69’ ini koruduğu belirlendi. 50 ve 60 °C’ lerde 30 dakika sonunda ise sırayla % 46 ve % 65’ ini kaybettiği gözlendi. 90 °C’ de 15 inkübasyon sonucunda enzimin aktivitesinin % 91 ve ve 30 dakika inkübasyona sonunda % 98’ ini kaybettiği belirlendi (Şekil 4.13.7 e). Vaidya ve arkadaşları [149], 50 °C’ de serbest enzimin aktivitesinin sadece % 62.11’ ini koruduğunu immobilize enzimin ise % 94.76’ sını koruyabildiğini, 70 °C’ de serbest enzimin aktivitesinin % 9.33’ ünü koruyabildiğini, immobilize enzimin ise aynı

sıcaklıkta % 39.10'ünü koruyabildiğini saptamışlardır. Kitosan üzerine immobilize edilen *Candida rugosa* serbest lipazın 60 °C' de serbest lipazın % 12 immobilize lipazın ise % 23 aktifliğini koruduğu gözlenmiştir [154]. Chiou ve Wu [153], *Candida rugosa* enzimini hidroksil grupları aktivasyonu ile kitosan üzerine immobilizasyonu yaptıkları çalışmalarında, termal kararlılık için 25- 60 °C' ye değişen sıcaklıklarda 1 saat boyunca yaptıkları çalışmada, 30 °C' den sonra serbest enzimin aktivitesini kaybetmeye başladığını görmüşlerdir. 60 °C' de ise immobilize enzimin aktivitesinin % 60' ını, serbest enzimin ise sadece % 20' sini koruyabildiğini belirlemişlerdir. Isıl kararlılığın serbest enzim ile ilgili aktivitelerde optimum yada optimuma en yakın olan sıcaklık değerinde daha kararlı olduğu ve optimum sıcaklık aralıklarının dışında serbest enzim üç boyutlu yapısının denatüre olması nedeniyle genel olarak aktivitesini kaybedebileceği düşünülür. Enzim immobilizasyon uygulamaları, immobilize enzimlere ısıl kararlılık kazandıran bir uygulamadır. Bu veriler doğrultusunda bu çalışmada da *B. pumilus* ve *B. thermocatenulatus* serbest ve immobilize lipazının diğer mikroorganizmalardan elde edilen lipazlara göre benzer ısıl kararlılığa sahip olduğu söylenilebilir. Ayrıca immobilize enzimler incelendiğinde 50- 70 °C gibi yüksek sıcaklıklarda genel olarak aktivitelerini serbest enzimden daha iyi korudukları gözlenmiştir. Bu durum immobilize enzimlerin organik çözücülü ortamlarda gerçekleştirilen esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları için kullanılabilmesine imkân sağlamaktadır.

B. thermocatenulatus serbest ve immobilize enzim oda sıcaklığında ise; 30 günün sonunda serbest enzim % 59' unu, immobilize enzim % 65' ini koruduğu gözlendi (Şekil 4.13.7c). *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize enzim Oda sıcaklığında ise; 30 günün sonunda serbest enzim % 48' unu, immobilize enzim % 54' ini koruduğu gözlendi (Şekil 4.13.7f). Yapılan çalışmada hem *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 immobilize enzimlerin 5. gün den sonra jel boncuk yapısından enzim kaçışlarının olduğu gözlendi. 5. gün sonunda enzim aktivitelerinde meydana gelen azalmaların enzim sızıntısından kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Bu veriler doğrultusunda *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize

enzimlerin oda ısısı ısıl kararlılık özellikleri enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilceğini göstermektedir.

Serbest ve alginat gelatin jelde immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 lipazlarının pH kararlılığını incelemek amacıyla, serbest ve immobilize enzimler 50 mM konsantrasyonunda pH 4.0-12.0 arasında enzim-tampon karışımları +4 °C' de 15 gün boyunca inkübe edilerek farklı zaman aralıklarında aktivite ölçümleri yapıldı. *B. thermocatenulatus* hem serbest hemde immobilize lipazının geniş bir pH aralığında yüksek kararlılık gösterdiği gözlemlendi. *B. thermocatenulatus* serbest enzimin 15. gün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 11.0' de enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50, pH 7.0, 8.0 ve 10.0' da % 60' ı, pH 9.0'da ise % 80' i korunduğu gözlemlendi (Şekil 5.13.6a). Yapılan literatür taraması sonucunda, *B. thermocatenulatus* DSM 730' dan elde edilen lipazın zeytin yağının substrat olarak kullanıldığı çalışmada 0,1M fosfat pH 7.0 tamponunda 30 ° C' de 16.5 saat boyunca % 95 aktivitesini koruduğu kaydedilmiştir [57]. p-nitrofenil palmitat kullanıldığı 0.1 M farklı pH değerleri olan tamponlarda (glisin / HCl, pH 4.0-6.0, Tris / HCl, pH 7.0-9.0 veya glisin / NaOH, pH 9.0-12.0) 30°C'de 14 saat inkübasyondan sonra BTL2 lipaz stabilitesi pH 4,0 ile 6,0 (% 30- 80) ve pH 12.0 (% 55) pH aralığında azalma olduğu, pH 7.0' den pH 11.0' e nispeten yüksek bir kararlılık gösterdiği rapor edilmiştir [62]. Başka bir çalışma triolein substratı ile pH 9.0-11.0 aralığında aktivitesini % 90-100 koruduğu, trikaprilin ile 60 dakika pH 9.0-10.0 aralığında oda ısısında inkübe edilen lipazın % 81 ve 84 koruduğu bildirilmiştir [61].

B. pumilus MBB03 serbest enzimin 15. gün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 11.0' de enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50, pH 7.0, 8.0 ve 10.0'da % 60' ı, pH 9.0'da ise % 80' i korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.6c). Ekinci ve ark (2015) *Geobacillus stearothermophilus* AH22' dan elde etikleri lipazının pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4.0-10.0 arasında enzim-tampon karışımları +4 °C' de 30 gün boyunca inkübe edilerek farklı zaman aralıklarında aktivite ölçümleri sonucunda 1 günün sonunda pH 5.0 ve 7.0' de enzimin başlangıçtaki aktivitesinin %90'nın korunduğu, diğer bütün pH değerlerinde ise hemen hemen

tamamının korunduğu gözlemlendi. 5 günün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0' de enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 80' inin, pH 8.0, 9.0 ve 10.0' da ise tamamına yakınının korunduğu belirlendi. 10 günün sonunda pH 4.0, 5.0 ve 6.0' da başlangıçtaki aktivitenin yaklaşık % 65' i, pH 7.0' de % 80' i, pH 8.0, 9.0 ve 10.0' da ise tamamına yakınının korunduğunu rapor etmişlerdir [164].

Buna ek olarak Vaidya ve ark (2008) *Candida rugosa* enzimi immobilizasyonu çalışmasında, pH 9.0 ve pH 10.0' da serbest enzim aktivitesinin % 47.96 ve % 13.28 koruduğu aynı pH' larda immobilize enzimin ise % 86.19 ve % 42.64' ünü koruduğunu belirlemişlerdir [149]. Yaptığımız çalışmada, *B. pumilus* MBB03 immobilize enzimin 15. gün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0,9.0 ve 10.0' de enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50, pH 7.0'de % 76' ı pH 8.0' de 80' i korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.6d). Ayrıca, *B. thermocatenulatus* immobilize enzimin 15. gün sonunda pH 4.0, 5.0' de % 60' ı pH 6.0' da % 70' i, pH 7.0, 8.0 ve 9.0'da % 80' i, pH 10.0 ve 11.0' de ise enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 80' i korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.6b). Çalışmamızda, *B.thermocatenulatus* ve *B.pumilus* MBB03 immobilize boncukların fosfat tamponunda pH 6.0-7.5 aralığında boncuk jel yapısının bozulduğu gözlemlenmiştir. Bu durum boncuk içinde tutuklu enzimin sızmasına neden olmuştur. Boncuk yapısında meydana gelen bu bozulmanın fosfat iyonundan kaynaklandığı kanaatindeyiz. Çünkü kalsiyum alginat boncuklarının en büyük dezavantajı, sodyum veya magnezyum gibi katyonlar, fosfat, laktat gibi kalsiyum şelatlama maddelerine karşı hassastır ve bu şelatör maddelerin Ca-alginatta bulunan Ca iyonları ile yer değiştirmesi sonucunda Ca-alginat kararlılığının bozulmasına ve jelin parçalanıp dağılmasına neden olmasıdır [115, 150]. Bununla birlikte, kalsiyum aljinat+ jelatin boncuklarının aslında Tris / HCl tamponunda dengeli olduğu, lipaz aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca, elde edilen her iki enzimin geniş pH aralığında kararlı olması ve özellikle optimum pH ve alkali pH aralıklarında kararlılıklarını korumuş olmaları deterjan endüstrisinde ve atık su arıtma çalışmalarında kullanım olanağına sahip olduğu söylenebilir.

Serbest ve immobilize *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* lipazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, CaCl₂, NaCl₂, CuCl₂, KCl₂, BaCl₂,

MgCl₂, MnCl₂, HgCl₂, NiCl₂, ZnSO₄, CuSO₄, CoSO₄, FeSO₄, MgSO₄, iyonlarının 0.1, 0.5 ve 1.0 mM'lık konsantrasyonlarında reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0.1-1 mM arasında olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesine göre elde edilen sonuçlar kıyaslanarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı. *B. thermocatenulatus* serebest enzim üzerine, metal iyonları içinde etkili bir şekilde enzim aktivitesini en fazla kontrole oranla 1.0 mM konsantrasyonda HgCl₂'ün azalttığı belirlendi. (Çizelge 4.13.8a). *B. thermocatenulatus* immobilize enzim üzerine, metal iyonları içinde enzim aktivitesini 1.0 mM konsantrasyonda MgSO₄ kontrole oranla azalttığı belirlendi. (Çizelge 4.13.8b). *B. pumilus* MBB03 serebest ve immobilize enzim üzerine, metal iyonları içinde etkili bir şekilde enzim aktivitesini ZnSO₄, HgCl₂, FeSO₄, CuSO₄, CoSO₄, NiCl₂, MgCl₂, MnCl₂, MgSO₄ metal iyonlarının enzim aktivitesini farklı miktarlarda genel olarak azalttığı gözlemlendi. Fakat HgCl₂, NiCl₂ metal iyonlarının 1 mM'lık konsantrasyonlarının sırasıyla immobilize enzim aktivitesini kontrole oranla % 90 ve % 66 oranında önemli anlamda azalttığı belirlendi (Çizelge 4.13.8b). Çalışmamızda hem serbest hem de immobilize enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının sülfatlı ve klorürlü bileşiklerinin farklı etki gösterdiği belirlenmiştir. Aynı metal iyonlarının farklı bileşiklerinin enzim aktivitesini değişen miktarlarda etkilemesi bu bileşiklerin çözünürlüklerinin farklı olmasından kaynaklandığı ileri sürülebilir. *B. stearothermophilus* MC 7 lipazı Cu²⁺ ve Zn²⁺, Co²⁺ ve Hg²⁺ iyonları tarafından sırasıyla yaklaşık % 90, 100, 85, 60 ve 50 oranında inhibe edilirken Ca²⁺ iyonlarının varlığında aktivitenin %10 oranında arttığı bildirilmiştir [168]. Diğer çalışmalarda da lipazın Hg²⁺ tarafından inhibisyona uğradığı bildirilmiştir [166, 170, 171]. *B. thermocatenulatus* doğal ve mutasyona uğramış lipazın Ca²⁺, K, Na⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının 1 mM'lık varlığında oda ısısında aktivitesinin Ca²⁺ varlığında nativ ve mutasyona uğramış lipazlar sırasıyla, maksimum aktivitesini % 76 ve % 77 koruduğu, % 78.1 ve 41.5'ini, 10 mM'lık varlığında ise % 23.7 ve 5.9'ünü koruduğu, aksine Na⁺'un her iki lipaz aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur [160]. Benzer sonuçlar Karkhane ve ark (2009) tarafından da rapor edilmiştir [141]. Başka bir çalışmada, 10 mM CaCl₂ ve MgCl₂, 1 mM NaN₃'ün lipaz enzimi üzerine 30° C' de 0.5 saat inkübasyon sonucunda lipaz ile ilgili herhangi bir etki olmadığı, ancak 1 mM AgNO₃'ün % 28 ve 10 mM MnCl₂'nin % 31 lipaz

aktivitesini düşürdüğü belirtilir [61]. Diğer başka çalışmada 1 mM ve 10 mM CaCl₂, NaN₃, MnCl₂ ve MgCl₂'nin lipaz üzerine etki etmediği, yalnızca MgCl₂'nin 1mM konsantrasyonunun 30 dakika sonunda enzim aktivitesini % 18, 10mM konsantrasyonda ise enzim aktivitesini % 24 azalttığı fakat AgNO₃'ün 30 dakika sonunda lipazı inaktive ettiği bildirilmiştir [57]. Bu çalışmalardan farklı olarak *Bacillus coagulans* BTS-3 [172] ve *Bacillus coagulans* MTCC-6375 [173] lipazlarının Hg⁺² ve Fe⁺³ tarafından aktivite edildiği bildirilmiştir. Kambourova ve arkadaşlarının bildirdiğine göre metaller tarafından inhibisyonla ilgili olarak metal iyonlarının etki mekanizması için, ya katalitik bölgenin direk olarak inhibisyona uğradığı ya da metal iyonlarının açığa çıkan yağ asitleri ile kompleks oluşturarak onların çözünürlüklerini ve ara yüzeydeki davranışlarını değiştirerek bu inhibisyona yol açtığı olabileceğini ileri sürmüştür [168].

Bazı deterjanların *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipazının aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla deterjan olarak; çeşitli iyonik (sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat ve sodyum dodesil sülfat), non-iyonik (Triton X-100, Tween 20, Tween 80) ve zwitteriyonik (CHAPS) deterjanlar kullanıldı. Kimyasal ve deterjan içermeyen reaksiyon karışımının aktivitesi % 100 kabul edilerek kimyasal ve deterjan varlığındaki aktiviteler ile kıyaslanarak % bağıl aktiviteler hesaplandı (Çizelge 4.13.9a, Çizelge 4.13.9b). Deterjanlar içinde *B. thermocatenulatus* serbest enzim aktivitesinin etkilenmediği ancak immobilize enzim aktivitesinin kontrole kıyasla genellikle arttığı belirlendi (Çizelge 4.13.9a). *B. pumilus* MBB03 serbest enzim üzerine, Triton X-100, Tween 80, Tween 20 ve SDS deterjanının % 1.0 (w/v) konsantrasyonda enzim aktivitesini sırasıyla % 64, % 75, % 86 ve % 57 oranında azalttığı, immobilize enzim aktivitesini ise sadece % 1.0 (w/v) konsantrasyonda Tween 20' nin etkili bir şekilde azalttığı tespit edildi (Çizelge 4.13.9b). Çalışmızdan elde edilen sonuçlara göre *B. pumilus* MBB03 serbest enziminin *B. thermocatenulatus* serbest enzimine oranla iyonik ve non-iyonik deterjan varlığında enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Bu durum *B. pumilus* MBB03 serbest enziminin aktif bölge yapısının bu deterjanlar varlığında etkilenmesiyle açıklanabilir. Ayrıca *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 serbest enzimlerine kıyasla immobilize enzim aktivitesini bu

deterjanların varlığında arttığı saptanmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda *B. thermocatenulatus* ve *B. pumilus* MBB03 immobilize enzim formlarının jel yapısı içinde enzimin tutuklu bulunmasıyla bu deterjanların enzim aktif bölgesini büyük oranda etkilemediği söylenebilir.

Bacillus sp. RSJ-1 lipazının non-iyonik deterjanlara karşı oldukça stabil olduğu belirlenmiş ve Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 ile orijinal aktivitenin sırasıyla % 100, 92 ve 82'sinin aksine enzimin anyonik deterjanlara karşı daha az stabil olduğu ve deoksikolat ile aktivitenin % 54' ünün korunduğu bildirilmiştir [174]. *B. thermocatenulatus* lipazının % 0,1 (w/v) eklenen CHAPS ve taurokolik asit enzim aktivitesini hemen arttırdığı, ancak % 0,1 (w/v) eklenen Tween 20, Tween 80'nin enzim aktivitesini düşürdüğü ve % 0,1 (w/v) eklenen Triton X-100'ün enzimi çok az inaktive ettiği gözlenmiştir [57]. *Bacillus thermocatenulatus* lipazı da Tween 20, Tween 80 ve SDS tarafından inaktive edilmiş, bununla beraber, Triton X-100 aktiviteyi % 80, CHAPS ise % 40 oranında artırmıştır [137]. *Bacillus* sp. GK8 lipazıyla yapılan çalışmada Triton X-100 ile enzimin aktivitesini tamamen kaybettiği, % 1' lik SDS'nin ise aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir [175]. Bir başka çalışmada % 0,1 varlığında Triton X-100 ve Tween 80' nin lipaz aktivitesini tamamen inaktive olduğu, % 0.1 CHAPS ve tarokolik asit varlığında % 63-84, Tween 20 varlığında % 6-9 oranında aktivitesi arttırdığı gözlenmiştir [61]. *Bacillus* sp. J 33 lipazıyla yapılan çalışmada enzim aktivitesinin, % 0,1' lik Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 varlığında sırasıyla % 40, 20 ve 60 oranında arttığı, SDS'nin ise enzimi tamamen inaktive ettiği bildirilmiştir [176]. Bu iyonik deterjanların enzimin üç boyutlu yapısını koruyan kuvvetlerle etkileşime girerek enzimi denatüre ettiği ve bu nedenle enzimin stabilitesini koruyamadığı düşünülmektedir. Diğer yandan bu deterjanların daha yüksek konsantrasyonları karşısında geri kalan aktivite daha yüksektir. Bu durumun lipazın ara yüzey aktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu deterjanların yüksek konsantrasyonları lipazın ara yüzey alanını genişleterek substratıyla daha rahat buluşmasını sağlıyor olabilir. Bu deterjanın düşük konsantrasyonda enzimin stabilitesini azaltacak şekilde konformasyonunu değiştirdiği buna karşın yüksek konsantrasyonda bu konformasyonel değişikliğin stabiliteyi artırıcı yönde olduğu düşünülmektedir.

Serbest ve immobilize *BTL2* ve *B. pumilus* lipaz enzimleri üzerine bazı organik çözücü etkisini incelemek üzere, etanol, metanol, isopropanol, n-bütanol, aseton, dimetilsülfoksit (DMSO), ksilen, dimetilformamid (DMF), gliserol kullanılmıştır. Bu organik çözücülerin % 10' luk stok çözeltileri hazırlanarak reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları % 0.01-1 arasında olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Hiçbir organik çözücü içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edildi. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve metal iyonu içeren deney ortamının kontrole göre aktivite değişimleri değişimleri belirlendi ve % bağıl aktiviteler hesaplanmıştır. *B. thermocatenulatus* serbest enzim üzerine, organik çözücülerin etkili bir şekilde enzim aktivitesini farklı miktarlarda etkilediği, ancak anlamlı artış ya da azalışların olmadığı gözlemlendi. *B. thermocatenulatus* immobilize enzim üzerine, organik çözücülerin bütün konsantrasyonlarda % 1.0 mM konsantrasyonda gliserol hariç etkili bir şekilde enzim aktivitesini farklı miktarlarda artırdığı belirlendi. % 1.0 mM konsantrasyonda gliserolün enzim aktivitesini kontrole kıyaslandığında % 24 oranında inhibe ettiği belirlendi. *B. pumilus* MBB03 serbest enzim üzerine, organik çözücülerin enzim aktivitesini az miktarlarda etkilediği, genellikle bütün organik çözücülerin kontrolle kıyaslandığında enzim aktivitesini en fazla % 0.1 mM konsantrasyonda DMF' nin % 34 inhibe ettiği gözlemlendi. *B. pumilus* MBB03 immobilize enzim üzerine, organik çözücülerin enzim aktivitesini farklı miktarlarda etkilediği, genellikle bütün organik çözücülerin kontrolle kıyaslandığında enzim aktivitesini izopropanol, n-bütanol, aseton, DMSO, ksilen ve gliserol hariç anlamlı derecede artırdığı tespit edildi. Ancak % 0.1 mM konsantrasyonda izopropanol % 23, n-bütanol % 38, aseton % 25, DMSO ve gliserol %15, ksilen % 5 oranında enzim aktivitesini azalttığı belirlendi (Çizelge 4.13.10a, Çizelge 4.13.10b).

Lipazların organik çözücüler karşısındaki hassasiyetleri farklılık göstermektedir [177]. *Bacillus* sp. Lipazı üzerinde etanol ve metanolün yaklaşık % 40 inaktivasyona yol açtığı bildirilmiştir [167]. *B. thermocatenulatus* lipaz üzerine % 30 (v/v) metanol, 2-propanol ve aseton eklenmesi *BTL2* aktivitesini bir miktar önlediği belirtilmiştir [61, 137]. Benzer bir diğer çalışmada Quyen ve ark (2003), % 30 (v / v) ilave metanol veya aseton, % 16 oranında, 2-propanol' un ise % 47 oranında *BTL2* lipaz aktivitesi azalttığı

bildirilmiştir [62]. Bu çalışmalar dışında *Bacillus thermoleovorans* CCR11'den elde edilen lipazın bütanol karşısında aktivitesini tamamen kaybettiği bildirilmiştir [159]. Hun ve ark (2003), *Bacillus sphaericus* 205y suşundan elde ettikleri lipaz aktivitesinin DMSO varlığında % 80 kaybolduğunu saptamışlardır [178].

Serbest ve immobilize BTL2 ve *B. pumilus* lipaz enzimleri üzerine bazı kimyasal ve inhibitörün etkisini incelemek üzere, serin inhibitörü olan PMSF, SH-grubu inhibitörü olan β - merkaptoetanol, SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan DTT ve EDTA 10 mM stok çözeltileri hazırlanarak reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0.01-1mM arasında olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve metal iyonu içeren deney ortamının kontrole göre aktivite değişimleri belirlenmiş ve % bağıl aktiviteler hesaplanmıştır (Çizelge 4.13.11a, Çizelge 4.13.11b). *B. pumilus* MBB03 serbest ve immobilize enzim üzerine, inhibitör ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesini farklı miktarlarda genellikle azaltıcı etki gösterdiği belirlendi. β -merkaptoetanol 0.5 mM konsantrasyonda % 38 azalttığı saptandı, DTT 0.5 ve 1.0 mM konsantrasyonda % 43 azalttığı saptandı. *B. pumilus* MBB03 immobilize enzim üzerine, PMSF ve β -merkaptoetanol hariç enzim aktivitesini kontrole oranla azalttığı saptandı. PMSF' nin immobilize enzim aktivitesi üzerine 0.1 mM konsantrasyonda % 10 arttırıcı, 1.0 mM konsantrasyonda % 33 azaltıcı etki gösterdiği belirlendi. Benzer şekilde β -merkaptoetanol' ün 0.1 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini % 25 oranında arttırdığı 1.0 mM konsantrasyonda % 20 oranında azalttığı saptandı. DTT' nin farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesini azalttığı, EDTA' nın 1.0 mM konsantrasyonda enzim aktivitesi % 33 azalttığı belirlendi (Çizelge 4.13.11b). Bu veriler doğrultusunda inhibitör maddelerin serbest ve immobilize enzim aktivitesini farklı miktarlarda etkilediği görülmüştür. Ser-His-Asp/Glu katalitik triada sahip olan lipazlar serin hidrolaz sınıfındadırlar. Serin inhibitörü olan fenilmetilsülfonil florür (PMSF) lipazların aktif bölgesinde bulunan serin aminoasidine bağlanarak aktiviteyi geridönüşümsüz olarak inhibe etmektedir [140]. Bu yüzden PMSF varlığında diğer lipazlara benzer olarak *B.pumilus* MBB03 serbest ve immobilize enzim aktivitesi 1.0 mM konsantrasyonda % 36 ve % 33 oranında azalma göstermiştir. Leow ve ark. [179],

Geobacillus sp.' nin termoalkalifilik T1 lipazının 5 mM EDTA ile % 22' den daha az oranda inhibe olduğunu, bunun aksine 5 mM PMSF ve 1 mM pepstain ile 50 °C' de 30 dakika muamele edildiğinde % 11 ve % 14' lük kalan aktiviteleri ile yüksek oranda inhibe olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde *Bacillus thermoleovorans* ID-1 lipazının [180] ve *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazının da PMSF tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir [159]. *B. stearothermophilus* L1 ve *B.thermoleoverans* ID1 lipazlarının β - merkaptotanol ve DTT' nin lipaz aktivitesini yaklaşık % 15 azalttığı [64, 180] ve *Bacillus licheniformis* lipazını PMFS' nin % 60 oranında inhibe ettiği, aksine 1 mM EDTA varlığında % 125 aktive olduğu belirtilmiştir [157]. *Bacillus* sp. lipazı ise β -merkaptotanol ve DTT ile neredeyse tamamen inhibe olmuştur [166]. Bu çalışmaların dışında Schmidt-Danert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *B. thermocatenulatu*' dan elde edilen lipazın 1mM ve 10mM PMFS ve EDTA' dan etkilenmediği belirtilmiştir [57]. Bu sonuçlar bizim çalışmamızı desterler niteliktedir. *B.pumilus* MBB03-lipaz enzimi proteinlerde bulunan disülfid bağlarını inhibe etme özelliği olan 0.1 mM konsantrasyonda DTT ile muamele edildiğinde serbest enzim aktivitesini % 43 oranında, immobilize enzim % 20 oranında kaybettiği belirlendi (Çizelge 4.13.11b). İmmobilize enzimin jel yapısından dolayı serbest enzime oranla DTT' den daha az miktarda etkilensiği sonucuna varılabilir. Aksine 2001 yılında Nthangeni ve arkadaşlarının *Bacillus licheniformis* lipazında yaptıkları çalışmada 0.5 mM konasantrasyonda DTT varlığında test edilmiş ve lipaz enzim aktivitesi % 142 oranında artırdığı göstermişlerdir [157].

Serbest ve immobilize *BTL2* ve *B. pumilus* lipaz enzimlerin substrat özgüllük çalışmaları öncelikle farklı karbon uzunluğundaki paranitrofenol türevleri (pNP-asetat (C₂), pNP-bütirat, pNP-kaprilat, pNP-dekonat, pNP-laurat, pNP-meristat, pNP-palmitat substrat olarak kullanılarak incelenmiştir. *BTL2*-serbest ve immobilize lipazı en iyi pNP-dekonat (C10), pNP-kaprilata (C8) aktivite gösterdiği belirlendi. *BTL2* hem serbest hem de immobilize lipaz en düşük aktiviteyi pNP-asetat ve daha sonra pNP-bütirat' a gösterdiği belirlenmiştir. *B.thermocatenulatus* serbest ve immobilize lipaz enzimi orta zincir uzunluktaki substratlara yüksek aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.13.5a). Elde edilen sonuçlara benzer Rua ve ark(1997) [137], Schmidt-Dannert ve

ark.(1996) [61] ve Quyen ve ark(2003) [62] tarafından da belirlenmiştir. Bununla birlikte, Goodarzi ve ark.(2014) tarafından nativ ve $\alpha 5$ Helix delesyonu olan *B.thermocatenulas*’ da rapor edilmiştir [160]. *B.pumilus* MBB03 serbest ve immobilize lipazı en yüksek aktiviteyi 8C’lu pNP-oktanata karşı göstermiştir. *B.pumilus* MBB03 hem serbest hem de immobilize lipaz en düşük aktiviteyi pNP-asetat, pNP-meristat’a ve pNP-palmitat’a gösterdiği belirlendi (Şekil 4.13.5b). Elde edilen sonuçlara benzer Kim ve ark (2002) [129], Arild Ranlym ve ark.(2013) [134] ve Litantra ve ark.(2013) [69] tarafından da rapor edilmiştir.

İmmobilize edilen lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacıyla Bölüm 3.2.12. de belirtilen metod kullanılarak aktivite tayin edildi. Biyokatalizör serbest enzim formunda kullanıldığında biyokatalizörün yeniden kullanılabilirliğinden söz edilemez. Bu nedenle endüstriyel açıdan önemli enzimler için immobilizasyon formları tasarlanmakta ve bu formlar ile üretim çalışmaları planlanmaktadır. Serbest enzime göre immobilize enzim birçok kez ve uzun süre kullanılabilir. İmmobilize enzimin bu özelliği endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Çünkü üretim maliyeti sürekli kullanıma bağlı olarak düşer. Sürekli kullanım ile enzim aktifliğinde bir değişim gözlenmiştir [181]. Alginat+jelatin boncuklara immobilize lipazın yeniden kullanılabilirlik çalışmasında immobilize *B. thermocatenulatus* lipazı, 1. döngüde tamamen, 2. döngüde % 96’ sını, 5. döngüde aktivitenin yaklaşık % 80’ inin korunduğu daha sonraki döngülerde aktivitenin azaldığı görüldü. 15. Döngü sonunda yaklaşık % 13 oranında aktivitenin korunabildiği belirlendi (Şekil 4.13.12a). Alginat+jelatin boncuklara immobilize *B. pumilus* MBB03 lipazı, 1. döngüde tamamen, 2. döngüde % 92’ sını, 3. döngüde aktivitenin yaklaşık % 80’ inin korunduğu, 6. döngüye kadar yaklaşık % 70’ ini, daha sonraki döngülerde aktivitenin azaldığı görüldü. 15. döngü sonunda yaklaşık % 20’ i oranında aktivitenin korunabildiği belirlendi (Şekil 4.13.12b).

Won ve arkadaşları (2005), Ca-alginat jel boncuklara tutukladıkları lipaz enzimi immobilizasyonu çalışmalarında, alginat boncukların 3. kullanımda aktivitesinin % 72’sini koruduğunu gözlemlemişlerdir [142]. *Candida rugosa* lipazı hidrofobik polimer destek üzerine adsorpsiyon yolu ile immobilize edildiğinde 15 kez kullanım sonunda

enzim aktifliğinin % 90' ının korunduğu bildirilmiştir [182]. *Candida rugosa* lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde 10 kez kullanım sonunda % 74 aktiflik gösterdiği bildirilmiştir [154]. Chiou ve Wu (2004), hidroksil grupları aktivasyonu ile kitosan üzerine *Candida rugosa* enzimi immobilizasyonu yaptıkları çalışmalarında, 6. kullanım sonunda immobilize enzimin aktivitesinin tamamını, 30 günün sonunda enzimin % 54 aktifliğini koruduğu, serbest enzimin ise 5. gün sonunda aktivitesini % 70' ini kaybettiği belirlenmiştir [153].

B. thermocatenulatus *B. pumilus* MBB03 immobilize lipazın 1. günün sonunda aktivitesinin hemen hemen tamamını koruduğu, 8. günde sırasıyla aktivitenin % 80 ve % 73' ünü koruduğu, ancak daha sonraki günler aktivite de azalmalar olduğu ve 30. gün sonunda sırasıyla aktivitenin yaklaşık % 40 ve % 36' sının korunduğu belirlendi (Şekil 4.13.13).

Sonuç olarak, bu tez kapsamında *B.thermocatenulatus* ve *B.pumilus* MBB03'den rekombinant lipazlar elde edildi ve tutuklama yöntemiyle alginat+jelatin jellere başarıyla immobilize edildi. Elde edilen serbest ve immobilize enzim formları karakterize edilerek optimum çalışma koşulları belirlendi. Buna göre;

- ✓ *B.thermocatenulatus* ve *B.pumilus* MBB03'den elde edilen lipazın, serbest enzimlere göre immobilize enzimlerin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin yüksek olduğu, immobilizasyonun ısı ve pH kararlılığı artırdığı, BTL2 immobilize enzimin serbest enzime göre çeşitli metal iyonları, organik çözücü deterjan formülasyonları içinde stabilitesini koruduğu,
- ✓ BTL2'den elde edilen serbest ve immobilize enzimin *B.pumilus* MBB03'den elde edilen serbest ve immobilize enzime göre optimum çalışma koşullarının daha elverişli olduğu,
- ✓ BTL2 immobilize enzimin *B.pumilus* MBB03 immobilize enzime göre bazı inhibitör maddeler içinde aktivitesini daha iyi koruduğu,
- ✓ *B.pumilus* MBB03 lipazının immobilizasyon veriminin BTL2 lipazına göre daha yüksek olduğu saptandı.

- ✓ İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre spesifik aktivitelerinin daha düşük olduğu,

Bu veriler doğrultusunda, elde edilen serbest ve immobilize lipazların geniş ısıl ve pH kararlılığı, çeşitli metal iyonları, organik çözücü deterjan formülasyonları içinde stabilitesini koruması ve diğer önemli özelliklerinden dolayı çeşitli endüstriyel uygulamalarda (gıda ve deterjan endüstrisi, organik çözücülü ortamlarda gerçekleştirilen esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları) potansiyel olarak kullanımının uygun olabileceği sonucuna varıldı.



6. KAYNAKLAR

- [1] Tüzün, C., “Biyokimya”, 3. baskı, 116- 117, 124-125, Palme Yayınları, Ankara, 1997.
- [2] Telefoncu, A., “Enzimlerin endüstriyel uygulamaları, Enzimoloji”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, 1-305, İzmir, 1997.
- [3] T.G. Park and A.S. Hoffman., “Thermal cycling effects on the bioreactor performances of immobilized b-galactosidase in temperature sensitive hydrogel beads”, *Enzyme Microbial Technology*, 15: 476-556 (1993).
- [4] Catoni, E., “Overexpression and protein engineering of lipase A and B from *Geotrichum candidum* CMICC335426”, Doctorate Thesis, Department of Chemistry in University of Stuttgart, 1999.
- [5] K.E. Jaeger *et al*, “Bacterial lipases”, *FEMS Microbiology Reviews*, 15(1): 29-63 (1994).
- [6] R.K. Saxena *et al*, “Microbial lipases: potential biocatalyst for the future industry”, *Current Science*, 77: 101-115 (1999).
- [7] P. Villeneuve *et al*, “Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches”, *Journal of Molecular Catalysis*, 9: 113-148 (2000).
- [8] K. Bagi *et al*, “İmmobilization and characterization of porcine pancreas lipase”, *Enzyme and Microbial Technology*, 20: 531-535 (1997).
- [9] Nilsson, K. and Mosbach, K., “Peptide synthesis in Aqueous-organic solvent mixtures with α -chymotrypsin immobilized to tresyl chloride activated agarose”, *Biotechnology Bioengineering*, 26: 1146-1154 (1984).
- [10] Bayşu Sözbilir, N., Bayşu, N., “Biyokimya”, ISBN:978-975-277-171-0, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2008.

- [11] Nelson, DL., Cox, MM., “Lehninger Biyokimyanın İlkeleri”, ISBN:975-8982-18-4, Palme yayımları, Ankara, 2005.
- [12] Gözükara, EM., “Biyokimya”, ISBN: 9789754207842, Nobel Tip Kitabevi, 2010.
- [13] Tsai C.S. “Biomacromolecules”, Department of Chemistry, Carleton University, New Jersey, 11: 323-325, 2007.
- [14] Boyce, S and Tifton, FK., “Enzyme classification and nomenclature”, Encyclopedia of Life Science, DOI: 10.1038/npg.els.0000710 (2001).
- [15] A. Wiseman., “Handbook of enzymes biotechnology”, Second Edition, Chapter 3, The Application of Enzymes in Industrys, 274-373, 1987.
- [16] A. Pandey *et al*, “The realm of microbial lipases in biotechnology”, Biotechnology Applied Biochemistry”, 29: 119-131 (1999).
- [17] A. Houde *et al*, “Lipases and their industrial applications”, Applied Biochemistry and Biotechnology”, 118: 155-170 (2004).
- [18] R. Gupta *et al*, “Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties”, Appl Microbiol Biotechnol, 64: 763-781 (2004).
- [19] K.E. Jaeger *et al*, “Bacterial lipases for biotechnological applications”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 3: 3-12 (1997).
- [20] R. Sangeetha *et al*, “Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview”, Research Journal of Microbiology, 6 (1): 1-24 (2011).
- [21] R. Sharma *et al*, “Production, purification, characterization, and applications of lipases”, Biotechnology Advances, 19: 627-662 (2001).
- [22] Ö.E. Kıran *et al*, “Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları”, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9 (1):12-19 (2006).

- [23] C. Schmidt-Dannert., “Recombinant microbial lipases for biotechnological applications”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7: 2123-2130 (1999).
- [24] Salameh, M. and Wiegel, J., “Lipases from extremophiles and potential for industrial applications”, *Advances in Applied Microbiology*, 61: 253-283 (2007).
- [25] Kapoor, M. and Gupta M.N., “Lipase promiscuity and its biochemical applications”, *Process Biochemistry*, 47: 555-569 (2012).
- [26] Dodson, G. and Wlodawer, A., “Catalytic triads and their relatives”, *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 347-352 (1998).
- [27] F. Hasan *et al*, “Industrial applications of microbial lipases”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2): 235-251 (2006).
- [28] Huang, Y., “Lipase production in fungi”, *Doktora Tezi*, Auburn University, Alabama, ABD, 2002.
- [29] R. Verger., “Interfacial activation of lipases: facts and artifacts”, *Trends in Biotechnology*, 15 (1): 32-38 (1997).
- [30] J. Decaro *et al*, “Porcine pancreatic lipase-completion of the primary structure”, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 671(2): 129-138 (1981).
- [31] K.E. Jaeger *et al*, “Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases”, *Annual Review of Microbiology*, 53: 315-351 (1999).
- [32] Sharma, S. and Kanwar, SS., “Organic solvent tolerant lipases and applications”, *The Scientific World Journal*, 15: 625258 (2014).
- [33] R. Gupta *et al*, “Lipase assay for conventional and molecular screening: an overview”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37: 63-71 (2003).

- [34] Schmid, R.D. and Verger, R., "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications", *Angewandte Chemie International Edition*, 37: 1608-1633 (1998).
- [35] Peters, G.H. and Bywater R.P., "Influence of a lipid interface on protein dynamics in a fungal lipase", *Biophysical Journal*, 81: 3052-3065 (2001).
- [36] R.N.Z.R.A. Rahman *et al*, "Lipases: Introduction. New lipases and proteases", ISBN: 1-60021-068-6, Nova Science Publishers Inc, 1-22 (2006).
- [37] C. Carrasco-Lopez *et al*, "Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements", *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (7): 4365-4373 (2009).
- [38] Lang, D.A. and Dijkstra, B.W., "Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases", *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1-2): 115-122. (1998).
- [39] W.A. Hide *et al*, "Structure and evolution of the lipase superfamily", *Journal of Lipid Research*, 33(2): 167-178 (1992).
- [40] Jaeger, K.E. and Reetz, M.T., "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology", *Trends in Biotechnology*, 16(9): 396-403 (1998).
- [41] G. van Pouderooyen *et al*, "The crystal structure of *Bacillus Subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme", *Journal of Molecular Biology*, 309: 215-226, 8 (2001).
- [42] K. Kawasaki *et al*, "Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution", *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58: 1168-1174 (2002).
- [43] A.R. Macrae., "Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats", *Journal of the American Oil Chemists Society*, 60: 291-294 (1983).

- [44] Macrae, A.R. and Hammond, R.C. "Present and future applications of lipases", *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 3: 193-217 (1985).
- [45] Balcao V.M. and Malcata F.X., "Lipase catalyzed modification of milkfat", *Biotechnology Advances*, 16: 2,309-341 (1998).
- [46] Guncheva, M. and Zhiryakova, D., "Catalytic properties and potential applications of bacillus lipases", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1): 1-21 (2011).
- [47] N.N. Gandhi., "Applications of lipases", *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (6): 621-634 (1997).
- [48] S.C. Taneja *et al*, "Rose oxides: A facile chemo and chemo-enzymatic Approach", *Synthetic Communications*, 35: 2297-2303 (2005).
- [49] X.R. Huang *et al*, "A novel method for fabrication of a glass-electrode-based lipase sensor", *Chinese Chemical Letters*, 12 (5): 453-456 (2001).
- [50] Mukherjee, K.D., Hills, M.J. "in Lipases: Their structure, biochemistry and application", (Woolley, P. and Petersen, S. B., eds), Cambridge University Press, Cambridge, 49-75, 1994.
- [51] Brockerhof, H. and Jensen, R.G., "Lipolytic enzymes", Academic Press, London, 1974.
- [52] Harrison, R.G., "Bioseparations science and engineering", ISBN: 9780195391817, Oxford University Press, New York, 2003.
- [53] Buchanan, R.E., Gibbons, N. E., "Bergey's manual of determinative bacteriology", 8th edition, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [54] S Taubman., "Genus Bacillus", *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, 355-356 (1992).

- [55] Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I. and Chambliss, G. H., "Bacillus, topley and Wilson's microbiology and microbial infections, systematic, bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman", Oxford University Press, Ninth Edition, New York, 2:5-193, 1998.
- [56] C.R. Harwood., "*Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses", Trends in Biotechnology, 10: 247-526 (1992).
- [57] C Schmidt-Dannert *et al*, "Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*", Biochimica et Biophysics Acta, 1214: 43-53 (1994).
- [58] C. Schmidt-Dannert *et al*, "Two novel lipase from thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: screening, purification, cloning, overexpression, and properties", Methods Enzymol, 1396, 194-220 (1997).
- [59] T.N. Nazina, *et al*, "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 433446 (2001).
- [60] J. Tyndall *et al*, "Crystal structure of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1", Journal of Molecular Biology, 323: 859-869 (2002).
- [61] C. Schmidt-Dannert *et al*, "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. 1. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties", Biochim. Biophys. Acta, 1301, 105-114 (1996).
- [62] D.T. Quyen *et al*, "High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase", Protein Expression and Purification, 28: 102-110 (2003).

- [63] S.T. Jeong *et al*, “ Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase”, *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 17041-17047(2002).
- [64] H.K. Kim *et al*, “Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62: 66-71 (1998).
- [65] M. Nardini *et al*, “Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275:31219-25 (2000).
- [66] Arpigny, J.L. and Jaeger, K.E., “Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties”. *Biochemical Journal*, 343: 177-183 (1999).
- [67] P. Acharya *et al*, “Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase”, *Journal of Molecular. Biology*, 341: 1271-1281 (2004).
- [68] V. Dartois *et al*, “Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*”, *Applied Environmental Microbiology*, 60: 1670-1673 (1994) .
- [69] R. Litantra *et al.*, “Expression and biochemical characterization of cold-adapted lipases from antarctic *Bacillus pumilus* strains”, *Journal of Microbiology. Biotechnology*, 23: 1221-1228 (2013).
- [70] A.M. Klivanov., “Immobilized enzymes and cell as practical catalysts”, *Science*, 219: 722-727 (1983).
- [71] O. Zaborsky., “Immobilized enzymes”, 1-3 CRC Pres,Cleveland Ohio, 58:287-292, 1974.
- [72] E. Katchalski-Katzir., “Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures”, *Trends in Biotechnology*, 11: 471-478 (1993).

[73] I. Chibata *et al*, “Immobilized tannin-a novel adsorbent for protein and metal ion”, *Enzyme Microbial Technology*, 8: 130-136 (1978).

[74] Tanaka, A., Kawamoto, T., “Cell and enzyme immobilization. In: manual of industrial microbiology and biotechnology”, Ed. Demain A.L and Davies J.E., American Society for Microbiology, ISBN: I-55581-128-0, Washington, 1999.

[75] M.K. Bhat., “Cellulases and related enzymes in biotechnology”, *Biotechnology Advances* 18: 355-383 (2000).

[76] D.S. Clark., “Can immobilisation be exploited to modify enzyme activity?”, *Trends in Biotechnol*, 12: 439-443 (1994).

[77] T. Tosa *et al*, “Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase”. *Enzymologia*, 31: 214-224 (1966).

[78] Tanaka, A., *Industrial application of immobilized biocatalysts*”, Marcel Dekker, New York, NY, 1993.

[79] Tischer, W. and Kasche, V., “Immobilized enzymes: crystals or carriers”, *Trends in Biotechnol*, 17: 326-335 (1999).

[80] G.F. Bickerstaff., “Impact of genetic technology on enzyme technology”. *Genet. Engineer Biotechnologist* 15, 13-30 (1995).

[81] Chaplin, M.F. and Bucke, C., “*Enzyme Technology*”, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.

[82] Edelman, P.G., Wang, J., “Biosensors and chemical sensors”, DC 22-42, Washington, (1992).

[83] Tischer, W. and Wedekind, F., “Immobilized enzymes: Methods and applications”, *Topics in Current Chemistry*, 200: 96-123 (1999).

- [84] G. Bayramoğlu *et al*, “Immobilization of *Candida Rugosa* lipase onto spacer-arm attached (GMA-HEMA-EGDMA) microspheres”, *Food Chemistry*, 92: 261-268 (2005).
- [85] K. Mosbach., “Methods in enzmology”, Acedemic Press, New Yok, 4, 1976.
- [86] Shah, Y. and Shah, D., “Immobilized enzymes: industrial biocatalyst”, *The Industrial Journal of Hospital Pharmacy*, 29: 51-58 (1992).
- [87] Telefoncu, A.,”İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri”,*Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu*, İzmir, 1-16, 193-249, 1986.
- [88] Trevon, M.D., “Tecniques of immobilization in immobilized enzyme”,*John Wiley and Sons*, New York, 1-11, 1985.
- [89] Bickerstaff, G.F., “İmmobilization of enzymes and cells”, *Humana press*, Totowa, New Jersey, 12-32, 1997.
- [90] Chase, HA. and Yang, Y., “Immobilization of α -amilase on poly(vinylalcohol)-coated perluoro polymer supports for use in enzyme reactors”, *Biotechnology and Biochemistry*, 28:145-154 (1998).
- [91] L. Goldstein, “Methods in enzymology”, 19, 935 (1970).
- [92] N.M. Samoshina *et al*, “Studies on the effective kinetic parameters of β -galactosidase immobilized on modified carriers”, *Biotekhnologiya*, 3: 478-480 (1987).
- [93] Brena, BM., Batista-Viera, F., “Immobilization of enzymes”, a literature survey, *methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells*, Second Edition, *Humana Press Inc.*, Totowa, NJ,(Ed.) J.M Guisan, Hardcover, ISBN:978-1-58829-290-2, 2006.
- [94] Sperinde, J.J. and Griffith, L.G., “Synthesis and characterization of enzymatically-crosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels”. *Macromolecules*, 30: 5255-5264 (1997).

- [95] H. Chang *et al*, “Method for immobilization of whole microbial cells in calcium alginate capsules”, Korea Advanced Institute of Science & Technology, ID: lens.org/197-684-114-998-96X (1998).
- [96] James, L. and Alexey H., “Enzyme catalysis in organic synthesis”, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 163-181, 2002.
- [97] R. İnam *et al*, “Polarographic determination of uranyl ion adsorption on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-itaconic acid) hydrogels. Separation Science and Technology, 36: 1451-1461 (2001).
- [98] L. Cao., “Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design”. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 580, 2005.
- [99] H.H. Weethall., “Covalent coupling methods for inorganic support materials”, Methods of Enzymology, 44:134-148 (1976).
- [100] S. Nisha *et al*, “Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme”, Chemical Science Review and Letters, 1: 148-155 (2012).
- [101] Bickerstaff, G.F., “Immobilization of enzymes and cells”, Humana press, Totowa, New Jersey, 12-32, 1997.
- [102] Broun, G.B., Moncke, G., Wingard L.B., “Enzyme engineering”. Plenum Press, New York, 1978.
- [103] R.M. Twyman., “Immobilized enzymes”, Encyclopedia of Analytical Science 523-529 (2005) .
- [104] Kennedy JF., Cbral JMS., “Immobilized Enzymes Cells”, Immobilization of enzyme, (Woodward, 2nd ed.) Oxford Press, UK, 19-37, 1985.
- [105] Kennedy, J.F., White, C.A., “Principles of immobilization of enzymes”. In: handbook of enzyme biotechnology, Chichester, NewYork: Halsted Press, 1985.

- [106] P.J. Worsfold., “Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes” (Technical report), *Pure Applied Chemistry*, 67: 597-600 (1995).
- [107] Gombotz, W.R. and Wee, S.F. “Protein release from alginate matrices”. *Advanced Drug Delivery. Reviews.* 31: 267-285 (1998).
- [108] G. Skjak-Braek., “Alginates: biosynthesis and some structure function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications”, *Biochemical Society Transactions*, 20: 27-33 (1992).
- [109] Remminghorst, U. and Rehm, B.H.A., “Bacterial alginates: from biosynthesis to applications”, *Biotechnology Letter*, 28: 1701-1712 (2006).
- [110] E.D.T. Atkins *et al*, “Structural components of alginic acid. part 1. the crystalline structure of poly β -d-mannuric acid. results of X-ray diffraction and polarized infrared studies”, *Biopolymers*, 12: 1865-1878 (1973).
- [111] Cottrell, I W., Kovacs P., “Algin”.pp.438-463, *Food Colloids* eds. H.D. Graham, The Avi Publishing Company Westport, Connecticut 588, 1977.
- [112] Fraser, J.E. and Bickerstaff, G.F., “Entrapment in Calcium Alginate”, *Methods in enzymology*, Humana Press, New Jersey, 61-65, 1997.
- [113] A. Rosevear., “Immobilised biocatalysts-a critical review”, *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 34:127-150 (1984).
- [114] J.C. Ogbonna *et al*, “Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate”, *Journal of Fermentation Bioengineering*, 67: 92-96 (1989).
- [115] P.S.J. Cheetham *et al*, “Physical studies on cell immobilization using calcium alginate”, *Gels. Biotechnology Bioengineering*, 21: 2155-2168 (1979).
- [116] G. Boran., “Bir gıda katkısı olarak jelatin: yapısı, özellikleri, üretimi, kullanımı ve kalitesi”. *Gıda*, 36: 97-104 (2011).

- [117] Schrieber, R., Gareis, H., "Gelatine handbook. Theory and industrial practice", Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 335, 2007.
- [118] E. Emregul *et al*, "Polyacrylamide–gelatin carrier system used for invertase immobilization", *Food Chemistry* 97: 591–597 (2006).
- [119] Rose, P. J., Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberg, C.G., Menges, G., Kroschwitz, J.I., "Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", 2nd. Ed., Wiley Interscience, New York, 7, 89, 1987.
- [120] K.B. Djagny *et al*, "Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41: 481- 492 (2001).
- [121] N.R. Jones., "Uses of gelatin in edible products. in: the science and technology of gelatin", Ward AG, Courts A (eds), Academic Press, USA, 366-392, 1977.
- [122] V. Scardi., "Immobilization of enzymes and microbial cells in gelatin", *Methods in Enzymology*, 135: 293-294 (1987).
- [123]. Sambrook J., Russell D., "Molecular cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbour Laboratory, 3 rd ed, 2001.
- [124] M.M, Bradford., "A rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72: 248-252 (1976).
- [125] U.K, Laemmli., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680- 685 (1970).
- [126] Winkler, UK. and Stuckman, M., "Glycogen hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*", *Journal of Bacteriology*, 138:663-70 (1979).

- [127] D. Norouzian *et al*, “Immobilization of whole cell penicillin G acylase in open pore gelatin matrix”, *Enzyme and Microbial Technol*, 30: 26-29 (2002).
- [128] Lineweaver, H. And Burk, D., “The determination of enzyme dissociation constants”, *Journal of the American. Chemical. Society*, 56: 658-666 (1934).
- [129] H.K. Kim *et al*, “Expression and characterization of Ca⁽²⁺⁾-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1583: 205-212 (2002).
- [130] Mammarella, E.J., and Rubiola, C.A., “Study of the deactivation of β -galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels”, *Journal of Molecular Catalysis*, 34: 7-13 (2005).
- [131] R. Kumar *et al*, “ Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology”, *New Biotechnology*, 28: (1) (2011).
- [132] N. Akbulut *et al*, “Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution”, *Journal of Biotechnology*, 164: 123-129 (2013).
- [133] I. Bustos-Jaimes *et al*, “Kinetic studies of Gly28Ser mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: changes in kcat and thermal dependence”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804: 2222-2227 (2010).
- [134] A.R. Arifin *et al*, “Isolation and biochemical characterization of *Bacillus pumilus* lipases from the Antarctic”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 661-667 (2013).
- [135] N.H. Schlieben *et al*, “Expression, purification, and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*”, *Protein Expression and Purification*, 34: 103-110 (2004).

- [136] R. Kumar *et al*, “Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, Purification and Some Properties”, *World Applied Sciences Journal*, 16: 940-948 (2012).
- [137] M.L. Rua *et al*, “Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity”, *Journal of Biotechnology*, 56; 89-102 (1997).
- [138] H.K. Kim *et al*, “Occurance of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp strain 398”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58: 961-962 (1994).
- [139] Y. Wang *et al*, “Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC53841)”, *Journal of Fermentation. Bioengineering*, 79: 433-438 (1995).
- [140] Dharmsthiti, S., and Luchai, S., “Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp THL027”, *FEMS Microbiology Letters*, 179: 241-246 (1998).
- [141] A. A. Karkhane *et al*, “The effect of substitution of Phe181 and Phe 182 with Ala on activity, substrate specificity and stabilization of substrate at the active site of *Bacillus thermocatenulatus* lipase”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61: 162-167 (2009).
- [142] K. Won *et al*, “Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads” , *Process Biochemistry*, 40: 2149-2154 (2005).
- [143] Ozyilmaz, G., and Gezer, Esra., “Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64: 140–145 (2010).
- [144] B. Cheirsilp *et al*, “Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis Reaction”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59: 206-211 (2009).

- [145] J. Rakmai *et al*, “Enhanced thermal stability of cyclodextrin glycosyltransferase in alginate–gelatin mixed gel beads and the application for β -cyclodextrin production”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4: 717-726 (2015).
- [146] K. Mondal *et al*, “A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764: 1080-1086 (2006).
- [147] Z. Vujcic *et al*, “Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel”, *Food Chemistry*, 126: 236-240 (2011).
- [148] I. Trabelsi *et al*, “Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 64: 84-89 (2014).
- [149] B.K. Vaidya *et al*, “Immobilization of *candida rugosa* lipase on poly macroporous polymer particles”, *Bioresource Technology*, 99: 3623-3629 (2008).
- [150] Z. Knezevic *et al*, “Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system”, *Process Biochem*, 38: 313–8 (2002).
- [151] N.W. Fadnavis *et al*, “Gelation blends with alginate: gels for lipase immobilization and purification”, *Biotechnology Progress*, 19: 557-64 (2003).
- [152] P. Fojan *et al*, “What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach”, *Biochimie*, 82: 1033-1041 (2000).
- [153] Chiou, S.H., and Wu W.T., “Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups”, *Biomaterials*, 25: 197-204 (2004).
- [154] T.C. Hung *et al*, “Binary immobilization of *Candida Rugosa* lipase on chitosan”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26: 69-78 (2003).

- [155] J.F. Shaw *et al*, “Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials”, *Biotechnology Bioengineering*, 35: 132-137 (1990).
- [156] S. Sinchaikul *et al*, “Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, purification, and characterization”, *Protein Expression and Purification* 22: 388-398 (2001).
- [157] M.B. Nthangeni *et al*, “Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases”, *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 705-712 (2001).
- [158] D.W. Lee *et al*, “Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1”, *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 363-371 (2001).
- [159] L.D. Castro-Ochoa *et al*, “Screening, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11”, *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 648-654, (2005).
- [160] G. Nastaran *et al.*, “Protein Engineering of *Bacillus thermocatenuatus* Lipase via Deletion of the $\alpha 5$ Helix”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174:339-351 (2014).
- [161] Madan, B., and Mishra, P., “Overexpression, purification and characterization of organic solvent stable lipase from *Bacillus licheniformis* RSP-09”, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 17: 118-123 (2009).
- [162] M. Jisheng *et al*, “Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*”, *Protein Expression and Purification* 45: 22-29 (2006).
- [163] I.C. Omar *et al*, “Hydrolysis of triglycerides by immobilized thermostable lipase from *Humicola Lanuginosa*”, *Agricultural Biological Chemistry*, 52: 99-105 (1988).

- [164] A.P. Ekinçi *et al*, “Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31: 325-331 (2016).
- [165] H.B. Yıldız *et al*, “Immobilization of polyphenol oxidase in conducting graft copolymers and determination of phenolic amount in red wines with enzyme electrodes”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 945-948 (2006).
- [166] N. Nawani *et al*, “A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290: 17-22 (2006).
- [167] Nawani, N., and Kaur, J., “Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization”, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 881-887. (2007).
- [168] M. Kambourova *et al*, “Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22: 307-313 (2003).
- [169] G. Ozyilmaz., “The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56: 231-236 (2009).
- [170] E.A. Snellman *et al*, “Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1”, *The FEBS Journal*, 269: 5771-5779 (2002).
- [171] Z. Liu *et al*, “Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils”, *Biochemical Engineering Journal*, 40: 445-451 (2008).
- [172] S. Kumar *et al*, “Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3”, *Protein Expression and Purification*, 41: 38-44 (2005).

- [173] S.S. Kanwar *et al*, “Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate”, *Protein Expression and Purification*, 46: 421-428 (2006).
- [174] R. Sharma *et al*, “Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1”. *Process Biochemistry*, 37: 1075-1084 (2002).
- [175] Dosanj, N.S., and Kaur, J., “Biochemical analysis of a native and proteolytic fragment of a high molecular weight thermostable lipase from a mesophilic *Bacillus* sp”, *Protein Expression and Purification*, 24: 71-75 (2002).
- [176] N. Nawani *et al*, “A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies”, *Biotechnology. Letter*, 20: 997-1000 (1998).
- [177] R.N.Z.R.A. Rahman *et al*, “High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. Strain S5”, *Analytical Biochemistry*, 341: 267-274 (2005).
- [178] C.J. Hun *et al*, “A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase”, *Biochemical Engineering Journal*, 15(2):147-151 (2003).
- [179] T.C. Leow *et al*, “A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1”. *Extremophiles*, 11: 527-535 (2007).
- [180] D.W. Lee *et al*, “Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1”, *FEMS Microbiology Letters*, 179: 393-400 (1999).
- [181] G. Bayramoglu *et al*, “Covalent Immobilization of Lipase onto Hydrophobic group Incorporated Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Based Hydrophilic Membrane Matrix”, *Journal of Food Engineering*, 52: 367-374 (2002).

[182] Ruchenstein, E., and Wang, X., “Lipase Immobilized on Hydrophobic Porous Polymer Supports Prepared by Concentrated Emulsion Polymerization and Their Activity in the Hydrolysis of Triacylglycerides”, *Biotechnology Bioengineering*, 42: 821-828 (1993).



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Kezban YILDIZ DALGINLI

Doğum Yeri: KARS/MERKEZ

Doğum Tarihi: 20.07.1984

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Halkalı Toplu Konut Lisesi (Küçük Çekmece/İSTANBUL)

Lisans: Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2003-2007)

Yüksek Lisans: Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2007-2010)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Erzurum Atatürk Üniversitesi Atateknokent'te "DOĞU BİYO" adlı şirketin sahibi ve TEKNOGİRİŞİM projesinin yürütücüsü olarak görevi yapmıştır. (2014-2015)

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları

Uluslararası SCI, SCI Expanded, SSCI, AHCI Kapsamındaki Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1- Ilgun,T., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Gulmez, C., Atakisi, O., "Changes in the Levels of Liver HSP70, Plasma Nitric Oxide, and Antioxidative System in Experimentally Induced Endotoxemia Mouse Model and the Role of Reduced Glutathione", *Turkish Journal of Biology*, DOI: 10.3906/biy-1601-75.

2- Kart,A., Koc, E., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Gulmez, C., Sertcelik, M., Atakisi, O., "The Therapeutic Role of Glutathione in Oxidative Stress and Oxidative DNA Damage Caused by Hexavalent Chromium", *Biological Trace Element Research*, DOI 10.1007/s12011-016-0733-0, 2016.

3- Atakisi, E., Topcu, B., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Gulmez, C., Atakisi, O., “Acute Effects of N-Acetylcysteine on Total Antioxidant Capacity, Total Oxidant Capacity, Nitric Oxide Level and Gammaglutamyl Transpeptidase Activity in Rabbits”, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, DOI: 10.9775/kvfd.2016.15518, 2016.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

1- Atakişi, O., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Atakişi E., Kaya, R., Gülmez, C.: “The Effect of Boron Compounds on the levels of L- Carnitine, Leptin, IGF-I and HSP70 in Rat Fed with High-Fat Diet”. 1st International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, 27 October - 01 November Bosnia and Herzegovina, Sarajevo, 2015.

2- Atakişi E., Atakişi, O., Topcu B., **Yıldız Dalgınlı, K.:** “Investigation of Antioxidant Effects of N-acethylcysteine Injection in Rabbits” 1st International Congress on Applied Biological Sciences , 16-20 September 2015.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

1-Kanııcı, A., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Atakişi, O., Harmankaya, A Sertçelik, M., Şener, M., Aydın, Y.:“Yüksek Doz Metotreksatın Serbest Radikal Oluşumu ve Karaciğer Enzim Aktivitesine Etkisinin Araştırılması” 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran, 2013.

2-Atakişi, O., Kanııcı, A ., Aydın, Y., Ersan, Y., Şener, M., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Özbek, FE., Kaya. M.: “Nikotinamidin Antioksidan Etkisinin Araştırılması”. 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran, 2013.

3-Harmankaya, A., Özcan, A., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Erdağ, D., Aydın, Y., Mert, B.:“Trolox’ un Oksidatif Stres İndeksi ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi”. 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran, 2013.

4-Harmankaya, A., Özcan, A., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Özbey, Ç., Kaya R.: “ACE Plus Selenyum’un Total Antioksidan/ Oksidan Kapasite ve Nitrik Oksit Düzeylerine Akut Etkisi”. 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran 2013.

5-Kanııcı, A., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Atakişi, O., Kart, A., Aydın, Y., Gülmez, C., Kaya, R., Mert, B., Nurgül Atmaca.: “Karaciğer Dokusu Albümin, Total Protein, Glukoz ve Globülin Düzeylerine Metotreksatın Etkisinin Araştırılması”. IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 11-14 Eylül 2013, Elazığ.

6-Atakişi, O.,**Yıldız Dalgınlı, K.**, Kanıcı,A., Mert, B., Harmankaya, A., Sertçelik, M., Kardaş, F., Necefoğlu, H., Yıldırım, CA., “ N,N-Dietilnikotinamidin Antioksidatif Sistem, Triglicerid, Total Protein, Glukoz, Albumin ve Globulin Düzeyi ile AST ve GGT Aktivitesine Etkisinin Araştırılması” IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 11-14 Eylül 2013, Elazığ

7-Atakişi, O., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Aydın, Y., Kanıcı, A., Topçu, B., Mert, B., Gülmez, C., Kaya, R., Kart, A., Atmaca, N., “Dietilnitrozamin Toksisitesine Karşı Çörek Otu Yağının Total Oksidan ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi”. IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Elazığ, 2013.

8-Kanııcı, A, **Yıldız Dalgınlı, K.**, Gülmez, C., Atakişi, O., Atakişi, E., Aydın, Y., Kaya, R., Mert, B., Ersan, Y., “Karaciğer Dokusunda Fenilhidrazin Toksikasyonuna Karşı Panaks Ginsengin Etkisinin Araştırılması”. IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 11-14 Eylül 2013, Elazığ.

9-Koç, E., Ayşe Kanıcı, A., Ersan, Y., Atakişi, A., Şener, M., **Yıldız Dalgınlı, K.**, Mert, B., Kaya,R., Kalaçay D.: “Farede Akut Krom(CrVI) Toksisitesine Karşı Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)’ in Koruyucu Rolü”.39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 10-14 Eylül 2013.

10-**Yıldız Dalgınlı, K.**, Atakişi, O., Gülmez, C., Kanıcı, A., Atakişi, E., Aydın Dursun, Y., Yılmaz, Y.: “*Nigella sativa* Yağının Dietilnitrozamin Toksisitesinde Koruyucu Etkisinin İncelenmesi”, 2. Ulusal Hesaplamalı Kimya Kongresi, Kars, 2015.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Sözlü Bildiriler:

1-Yıldız Dalgınlı K., Atakişi O., Gülmez C., “*Bacillus thermocatenulatus*’ dan Lipaz Enziminin Rekombinant Olarak Üretimi, Karakterize Edilmesi ve İmmobilizasyonu”, Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 22-24 Eylül, 2016.

Projeler

Araştırma Projeleri:

1- “Alzheimer Hastalarının Plazmasında Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Araştırılması” 2009-FEF-28 nolu Bilimsel Araştırma Projesi (KAÜ-BAP).Araştırmacı. Tamamlandı

2-“Hekzavalent Krom (CrVI) Maruziyeti Sonucu Oluşan DNA Hasarı ve Oksidatif Strese Karşı Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) ‘in Etkisinin Araştırılması. 2013-MMF-79 nolu Bilimsel Araştırma Projesi (KAÜ-BAP). Araştırmacı. Tamamlandı.

3- “Endüstride Yaygın Olarak Kullanılan Lipaz Enzimi İçin Etkin Üretim Yönteminin Geliştirilmesi” 1341.TGSD.2014 nolu Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından desteklenen Teknogirişim Projesi, Proje Yürütücüsü; Kezban YILDIZ DALGINLI (DOĞU BİYO), Tamamlandı.

4- “Bazı *Bacillus* Türlerinden Lipaz Enziminin Rekombinant Olarak Üretimi, Karakterize Edilmesi ve İmmobilizasyonu” 2014-FEF-42 nolu Araştırma Projesi (KAÜ-BAP) Devam Ediyor.