

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

METAL İYONLARININ VE
SURFAKTANLARIN
Geobacillus kaustophilus **LİPAZ**
AKTİVİTESİNE VE YAPISAL
KARARLILIĞINA
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

KÜBRA EKŞİLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE

2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

METAL İYONLARININ VE
SURFAKTANLARIN
Geobacillus kaustophilus **LİPAZ**
AKTİVİTESİNE VE YAPISAL
KARARLILIĞINA
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

KÜBRA EKŞİLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ALİ TÜRKAN

GEBZE

2013



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04/03/12 tarih ve 2013/11 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/03/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Kübra EKŞİLER'in tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ali TÜRKAN

ÜYE

: Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE

: Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZ KONU BAŞLIĞI: METAL İYONLARININ VE SURFAKTANLARIN *Geobacillus kaustophilus* LİPAZ AKTİVİTE VE YAPISAL KARARLILIĞINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YAZAR ADI: KÜBRA EKŞİLER

Bu tez çalışmasında, *Geobacillus kaustophilus* lipaz geni pET22b vektörüne klonlanarak *Escherichia coli*'de eksprese edildi ve DEAE-selüloz rezini kullanılarak saflaştırıldı. Proteaz inhibitörü olan PMSF kullanılmadan yapılan saflaştırmada moleküler ağırlığı ~41 kDa (teorik ~43 kDa) olan, yüksek lipaz aktivitesi (~5000 unit/mg protein) gösteren bir protein elde edildi. MALDI-TOF/MS ile yapılan analizlerde C-ucunda bulunan “LAEQLASLQP” peptidin (MW: 1069 kDa) eksik olduğu tespit edildi.

Farklı metal tuzlarının (CaCl_2 , MgCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , MnCl_2 ve ZnCl_2) enzim aktivitesine etkisi, substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat kullanılarak spektroskopik yöntemle incelendi. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Co^{2+} aktiviteyi artırırken, Zn^{2+} ve Ni^{2+} inhibe etti. 1 mM Tween deterjanları lipaz aktivitesini tamamen inhibe ederken, Triton X-100 aktivite üzerine değişken etki gösterdi. Ayrıca Ca^{2+} ve Zn^{2+} 'nin lipazın yapısına etkisi Sirküler Dikroizm spektroskopisi ile incelendi. Sadece EDTA ile yapılan ölçümlerde lipazın yapısı 70 °C'de tamamen bozulmakta iken, Ca^{2+} varlığında 80 °C'de bozulmaktadır. Zn^{2+} iyonu varlığında ise 50 °C'de enzim tamamen denatüre olmaktadır. Bu sonuçları desteklemek amacıyla da, Floresans Spektroskopisi yöntemiyle Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının enzimin yapısına etkisi triptofan ve ANS emisyonu ile incelendi. Ca^{2+} varlığında triptofan ve ANS emisyonunda bir değişiklik olmazken, Zn^{2+} varlığında triptofan emisyonu azalmakta, ANS emisyonu da artmaktadır. Aynı deneyler daha önce bu laboratuarda pET28a(+) vektörüne klonlanan ve His-tag'lı olarak saflaştırılan lipaz (His₆-lipaz) için de yapılmıştır ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Genel olarak elde edilen sonuçlar Ca^{2+} iyonunun lipazın stablitesini artırdığı, Zn^{2+} iyonunun ise yapıyı bozarak stablitesini azalttığını göstermektedir.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: STUDY OF EFFECT OF SOME METAL IONS AND SURFACTANTS ON THE ACTIVITY AND STRUCTURAL STABILITY OF *Geobacillus kaustophilus* LIPASE

AUTHOR: KÜBRA EKŞİLER

In this thesis, *Geobacillus kaustophilus* lipase gene was cloned into pET22b expression vector, expressed in *Escherichia coli* and purified using DEAE-cellulose. During purification PMSF, a protease inhibitor, was not included, so a protein with a molecular mass of ~41 kDa (theoretically 43 kDa) with high lipase activity was obtained. MALDI-TOF/MS analyses revealed that the C-terminal peptide “LAEQLASLQP” (MW: 1069 kDa) was missing.

The effect of various metal ions (CaCl_2 , MgCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , MnCl_2 ve ZnCl_2) on the activity of enzyme was investigated by spectroscopic method using *p*-nitrophenyl as a substrate. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} increased the activity whereas Zn^{2+} and Ni^{2+} were inhibitory. While 1 mM Tween detergents completely inhibited the activity, Triton X-100 showed inhibitory and activatory effects at different concentrations. Moreover, the effects of Ca^{2+} and Zn^{2+} on the structure of lipase were examined by circular dichroism spectroscopy. In the presence of EDTA alone, the lipase was completely unfolded at 70 °C, while in the presence of added Ca^{2+} it was at 80 °C. On the other hand, the enzyme was completely denatured in the presence of Zn^{2+} at 50 °C. The effects of Ca^{2+} and Zn^{2+} ions on the structure of the enzyme were further investigated by Tryptophan and ANS emission spectroscopy. No significant changes in the tryptophan and ANS emissions were observed in the presence of Ca^{2+} whereas decreases in the tryptophan emission and increases in the ANS emission were observed with increasing concentrations of Zn^{2+} . Similar experiments were carried out with His-lipase, which was previously cloned into pET28a(+) vector in our lab, and similar results were obtained. Overall the results show that Ca^{2+} increases the stability of the lipase, whereas the Zn^{2+} causes significant changes in the structure of the enzyme that result in aggregation.

TEŞEKKÜR

Öncelikli olarak bu tez çalışmasını yapma olanağı veren, gerekli alt yapıyı sağlayan, fikir ve önerileriyle bana yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Ali TÜRKAN'a teşekkür ederim.

Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN, Doç. Dr. Melek ÖZKAN ve Doç. Dr. Ayhan ÇELİK'e teşekkür ederim.

Arş. Gör. Dr. Zehra ÖLÇER, Arş. Gör. Aişe ÜNLÜ, Gülden AŞÇI YETİŞ, Fatma ERTAN, Arzu GÜRBÜZ, Meral AMANVERMEZ KARABAŞ, Derya GÜNAL ve Sinem HAKAN'a teşekkür ederim.

Yoğun çalışmalarım sırasında manevi desteğini benden esirgemeyen Arş. Gör. Zeynep M. ŞAHİN başta olmak üzere, Arş. Gör. Gülşah OZAN AYDIN, Arş. Gör. Fatma AKSAKAL, Arş. Gör. Perihan AKSU, Emrah ŞIK, İlker YATI ve tüm organik kimya grubuna teşekkür ederim.

Son olarak da beni bugünlere kadar getiren, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, attığım her adımda arkamda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1 Lipazlar	1
1.2 Metal İyonları Ve Tuzların Etkisi	5
1.3 Sürfaktantların Etkisi	6
1.4 Tez Çalışmasının Amacı	7
2. MATERYAL VE METOT	8
2.1 MATERYAL	8
2.1.1 Kullanılan Cihazlar	8
2.1.2 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	8
2.2 METOT	9
2.2.1 His ₆ -Lipaz Ekspresyonu ve Saflaştırılması	9
2.2.2 Lipaz Geninin pET22b Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Hücre Özütlerinin Hazırlanması	9
2.2.3 Lipaz Saflaştırılması	10
2.2.4 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	10
2.2.5 Protein Miktar Tayini	11
2.2.6 Lipaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	11
2.2.7 Lipaz Enziminin İkincil (Sekonder) Yapısının Sirküler Dikroizm ile İncelenmesi	13
2.2.8 Ca ²⁺ - ve Zn ²⁺ - Lipaz Etkileşimlerinin Floresans Spektroskopi ile İncelenmesi	15
2.2.9 Lipaz Enziminin Tripsin ile Kesiminin MALDI-TOF/ Kütle Spektrometre (MS) ile Analizi	15
3. SONUÇLAR	16
3.1 His ₆ -Lipaz Saflaştırılması	16
3.2 Lipaz Geninin pET22b Vektörüne Klonlanması, E.coli'de Ekspresyonu ve Saflaştırılması	17
3.3 PMSF'nin Lipaz Aktivitesine Etkisi	21

3.4	Metal İyonlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi	24
3.5	Ca^{2+} İyonu Varlığında Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisi	26
3.6	Farklı Ca^{2+} ve Zn^{2+} Konsantrasyonlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi	31
3.7	NaCl ve KCl Tuzlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi	34
3.8	Non-iyonik Deterjanların Lipaz Aktivitesine Etkisi	37
3.9	Lipaz Enziminin İkincil (Sekonder) Yapısının CD ile İncelenmesi	39
3.9.1	Kalsiyum İyonunun Lipazın İkincil Yapısına Etkisi	39
3.9.2	Çinko İyonunun Lipazın İkincil Yapısına Etkisi	48
3.9.3	NaCl ve KCl Tuzlarının Lipazın İkincil Yapısına Etkisi	50
3.9.4	Triton X-100 Deterjanının Lipaz Termal Denatürasyonuna Etkisi	55
3.10	Ca^{2+} - ve Zn^{2+} -lipaz Etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi	57
3.10.1	Ca^{2+} İyonunun Lipazın Emisyon Spektrumuna Etkisi	57
3.10.2	Çinko-Lipaz Etkileşimin Floresans Spektrofotometre Yöntemiyle İncelenmesi	60
3.11	Tripsinle Kesilen Lipazın MALDI-TOF/Kütle Spektrometre (MS) ile Peptit Analizi	66
	GENEL SONUÇLAR	70
	KAYNAKÇA	73
	ÖZGEÇMİŞ	80
	EKLER	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Lipazın katalizlediği hidroliz reaksiyonu	1
1.2. Lipaz enziminin reaksiyon mekanizması	2
1.3. Bakteriyel lipazların aminoasit dizi karşılaştırması	4
1.4. L1 lipazın yapısı	5
3.1. His ₆ -Lipaz enziminin saflaştırma fraksiyonlarının SDS-PAGE görüntüsü	16
3.2. PCR ile çoğaltılan lipaz geninin agaroz jel görüntüsü	17
3.3. <i>pET22b</i> vektörü ve lipaz geninin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan DNA fragmentlerinin agaroz jel görüntüsü	18
3.4. Ligasyon sonucunda elde edilen <i>pET22b</i> -lip rekombinant vektörün agaroz jel görüntüsü	18
3.5. Lipaz enziminin zamana karşı ekspresyon fraksiyonlarının SDS-PAGE görüntüsü	19
3.6. Lipaz enziminin saflaştırma fraksiyonlarının SDS-PAGE görüntüsü	20
3.7. Saflaştırılan His ₆ -lipaz ve lipaz enzimlerinin SDS-PAGE görüntüsü	20
3.8. PMSF'nin His ₆ -lipaz enzim aktivitesine etkisi	22
3.9. PMSF'nin lipaz enzim aktivitesine etkisi	23
3.10. Metallerin His ₆ -lipaz ve lipaz aktivitesine etkisi	25
3.11. Sıcaklığın Ca ²⁺ iyonu varlığında ve yokluğunda His ₆ -lipaz ve lipaz aktivitesine etkisi	27
3.12. Sıcaklığın EDTA varlığında His ₆ -lipaz ve lipaz stabilitesine etkisi	29
3.13. Sıcaklığın Ca ²⁺ varlığında His ₆ -lipaz ve lipaz stabilitesine etkisi	30
3.14. Ca ²⁺ ve Zn ²⁺ iyonlarının His ₆ -lipaz ve lipaz aktivitesine etkisi	32
3.15. Zn ²⁺ iyonunun Ca ²⁺ varlığında His ₆ -lipaz ve lipaz aktivitesine etkisi	33
3.16. NaCl ve KCl tuzlarının His ₆ -lipaz aktivitesine etkisi	35
3.17. NaCl ve KCl tuzlarının lipaz enzim aktivitesine etkisi	36
3.18. Triton X-100 deterjanının His ₆ -lipaz ve lipaz aktivitesine etkisi	37

3.19.	Sadece EDTA veya Ca^{2+} varlığında His ₆ -lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları	40
3.20.	Sadece EDTA veya Ca^{2+} varlığında His ₆ -lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları	41
3.21.	His ₆ -lipaz'ın sadece EDTA veya Ca^{2+} varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği	43
3.22.	His ₆ -lipaz'ın sadece EDTA varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği	43
3.23.	Sadece EDTA veya Ca^{2+} varlığında lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları	45
3.24.	Sadece EDTA varlığında lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları	46
3.25.	Lipaz'ın sadece EDTA veya Ca^{2+} varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği	47
3.26.	Zn^{2+} varlığında His ₆ -lipaz ve lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları	49
3.27.	Sadece EDTA+KCl veya Ca^{2+} +KCl varlığında His ₆ -lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları	51
3.28.	His ₆ -lipaz'ın sadece EDTA ve KCl tuzu varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği	52
3.29.	His ₆ -lipaz'ın Ca^{2+} ve KCl tuzu varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği	52
3.30.	Sadece EDTA+NaCl veya Ca^{2+} +NaCl varlığında lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları	53
3.31.	Lipaz'ın sadece EDTA ve NaCl tuzu varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği	54
3.32.	Lipaz'ın Ca^{2+} ve NaCl tuzu varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği	54
3.33.	His ₆ -lipaz ve lipaz'ın EDTA+Triton X-100 veya Ca^{2+} +Triton X-100 varlığında elde edilen Boltzman termal denatürasyon grafikleri	56
3.34.	8-anilinonaftalin-1-sülfonik asit	57
3.35.	Ca^{2+} varlığında His ₆ -lipaz ve lipaz enzimlerinin triptofan emisyon	

spektrumu	58
3.36. Ca^{2+} ve ANS varlığında His ₆ -lipaz ve lipaz enzimlerinin floresans spektrumları	59
3.37. Artan Zn^{2+} konsantrasyonlarında His ₆ -lipaz ve lipaz enzimlerinin triptofan emisyon spektrumu	62
3.38. Farklı Zn^{2+} konsantrasyonlarında His ₆ -lipaz ve lipaz ile elde edilen ANS emisyon spektrumları	63
3.39. Ca^{2+} iyonu varlığında farklı Zn^{2+} konsantrasyonlarında His ₆ -lipaz ve lipaz ile elde edilen triptofan emisyon spektrumları	64
3.40. Ca^{2+} iyonu varlığında farklı Zn^{2+} konsantrasyonlarında His ₆ -lipaz ve lipaz ile elde edilen ANS emisyon spektrumları	65

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. SDS-PAG bileşenleri	11
3.1. Tween deterjanlarının His ₆ -lipaz ve lipaz aktivitesine etkisi	38
3.2. Tripsin ile kesilen His ₆ -lipazın MALDI-TOF/MS ile peptit analiz sonucu	66
3.3. His ₆ -lipazın MALDI-TOF/MS ile bulunan peptit parçaları	68
3.4. Tripsin ile kesilen lipazın MALDI-TOF/MS ile peptit analizi sonucu	68
3.5. Lipazın MALDI-TOF/MS ile bulunan peptit parçaları	69

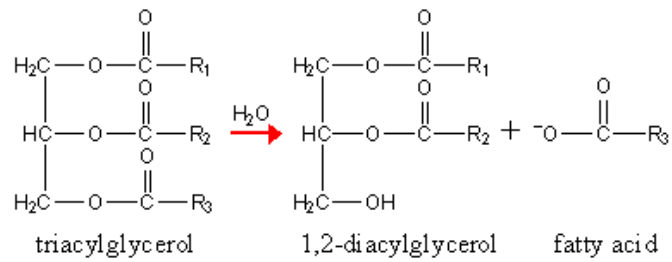
KISALTMALAR DİZİNİ

bp	Baz çifti
CD	Circular Dichroism
dH₂O	Deiyonize su
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
His-tag	Histidin kuyruğu
IPTG	İzopropil-beta-D-tiyo galaktopiranozid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Broth
<i>p</i>NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitat
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat akrilamid jel elektroforezi
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	2-amino-2-hidroksimetil propan 1,3-diol

1. GİRİŞ

1.1 Lipazlar

Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar, E.C. 3.1.1.3) fizyolojik koşullar altında trigliserit moleküllerindeki ester bağlarını hidroliz ederek, serbest yağ asitlerine, di- ve mono-gliseritlere ve gliserole çeviren enzimlerdir. Hidroliz reaksiyonu haricinde, esterifikasyon, asidoliziz, interesterifikasyon, alkoliziz ve aminoliziz reaksiyonlarını da katalizlemektedir.

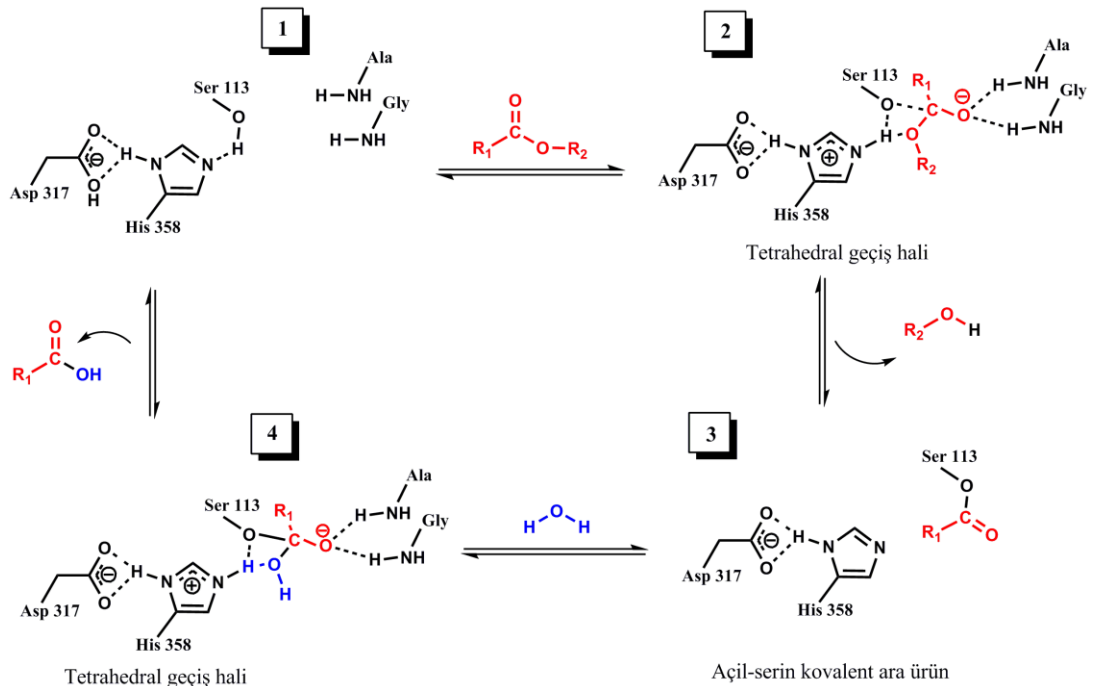


Şekil 1.1. Lipazın katalizlediği hidroliz reaksiyonu.

Lipazların doğal substratları suda çözünür değildir, yani reaksiyon su-yağ arayüzeyinde katalizlenir ve klasik Michaelis-Menten kinetiğini takip etmez [1, 2]. Birçok lipazın katalitik mekanizması “arayüzey aktivasyonu” adı verilen bir basamağı içerir. Enzimin üç boyutlu aktif bölge çukuru polar solventler tarafından polipeptit zincirindeki helikal bir segment vasıtasıyla izole edildiğinde, bu enzimler sulu homojen bir ortamda kapalı yani inaktif konformasyondadır [3, 4]. Kapak sistemindeki aminoasitlerinin içe bakan, yani aktif bölgenin üzerine kapanan yan zincirleri apolar aminoasitlerden oluşmuştur. Helikal kapak sisteminin, substrata, apolar solvante veya hidrofobik polimer taşıyıcısına maruz kalması durumunda hidrofobik kısmı açılarak, kapak konformasyonel değişime uğrar [5, 6]. Lipazlar, α -heliksler tarafından etrafı çevrilmiş, merkezinde β -sheetler bulunan, yani α/β katlanmalarıyla oluşan monomerik enzimlerdir [7, 8]. Lipazların aktif bölgeleri, Ser-Asp/Glu-His katalitik üçlüsünden meydana gelir. Bu katalitik serin rezidüsü, yüksek koruyucu pentapeptite aittir. Bir başka koruyucu yapı ise zincir omurgasının oluşturduğu oksianyon boşluğundaki amid yani NH gruplarıdır. Arayüzey

aktivasyonu meydana geldiğinde, oksianyon boşluğu kapalı konformasyondan açık konformasyona dönüşür.

Lipazlar serin proteazlar sınıfından olup açıl-serin kovalent ara-ürün oluşturan enzimlerdir (Şekil 1.2). Kovalent katalizde aktivasyon enerji bariyerinin aşılması için enzimle kovalent ürünün oluştuğu ve salındığı iki adım olmaktadır. Bu enzimlerin hız belirleyici adımı büyük çoğunlukla bu iki adımdan biridir. Reaksiyon mekanizmasına göre aktif bölgede bulunan serin, peptit karbonil karbonuna bağlanıp enzim-substrat kompleksini oluşturmaktadır. Aktif bölge aminoasitleri ve substratın oksianyonu arasında oluşan hidrojen bağları geçiş halini kararlı tutmaktadır. Histidin protonunun substrata bağlanması ile geçiş hali bozulur ve reaksiyonun ilk ürünü oluşur. Enzim molekülündeki ilk ürünün çıktığı oyuktan giren suyun nükleofilik atağı enzimden açıl grubunda ayrılmasını sağlar. Açıl grubunun ayrılması sırasında (deaçillenme) açillenme reaksiyonuna oldukça benzer ikinci tetrahedral geçiş hali oluşmaktadır. Bu geçiş hali sudan histidine proton transferi ile bozulur [9, 10].



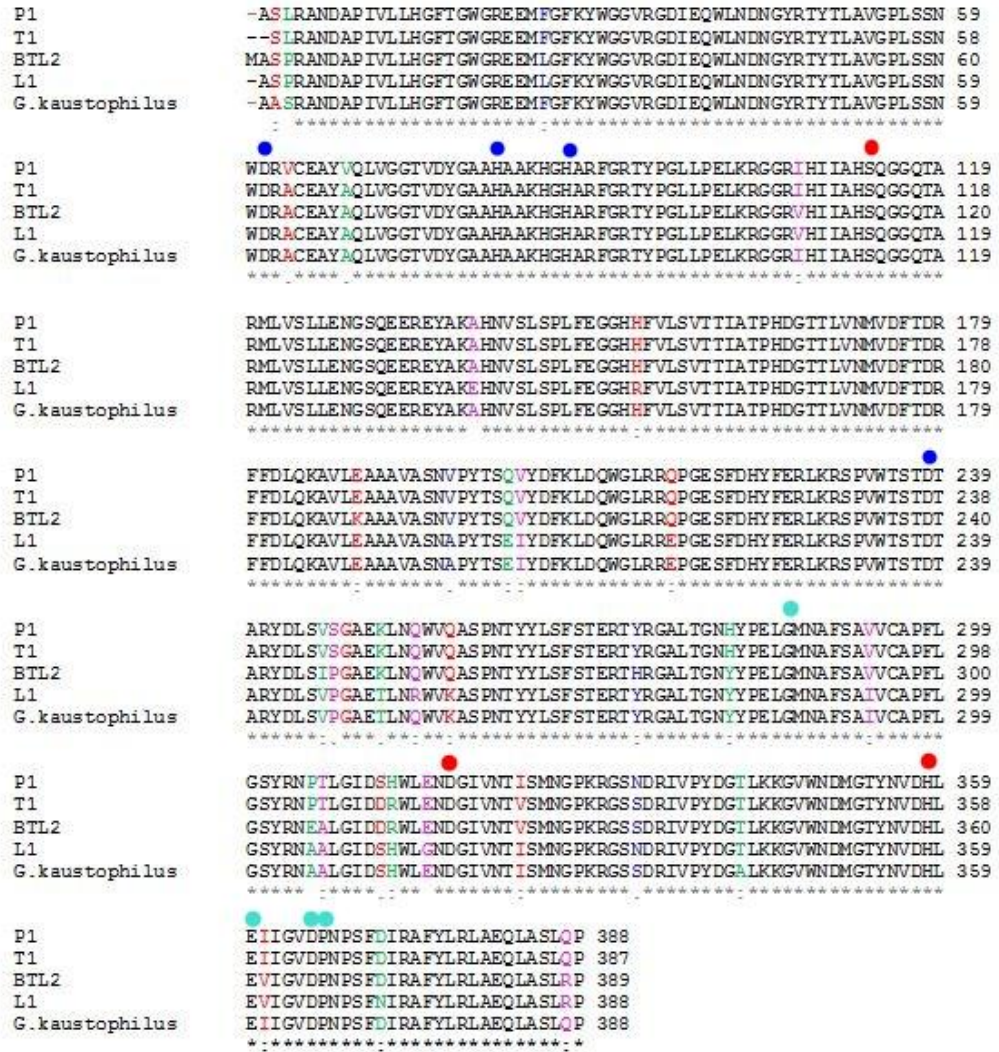
Şekil 1.2. Lipaz enziminin reaksiyon mekanizması. 1. Komşu histidin serin rezidüsüne nükleofilik etki sonucu lipit bağlanır ve Serin O⁻ atomu substratın karbonil karbonuna nükleofilik atakta bulunur. 2. Geçiş durumu tetrahedral ara ürün oluşumu, NH grubu tarafından O⁻ kararlı hale getirilir. Substratın alkol bileşeninden ayrılan proton histidine geçer. 3. Substratın asit bileşeni ile enzimin serin rezidüsü esterleştirilerek kovalent ara ürün oluşur. Su molekülleri ile komşu histidin rezidüleri aktif olur ve oluşan hidroksil grubu kovalent ara ürünün karbonil karbon atomuna nükleofilik atakta bulunur. 4. Histidin rezidüsü ile aktif serin rezidüsünün oksijen atomuna proton iletilir, serin ve açıl bileşeni arasındaki ester bağı kırılır ve açıl ürün serbest bırakılır [11, 12]

Lipazlar düşük su miktarı içeren çevrede (organik solventte), doğal substratlarının yanısıra açıl donörleri ve nükleofilleri geniş bir aralıkta kabul ederek transesterifikasyonu ve esterifikasyonu katalizlediklerinden dolayı, biyoteknoloji uygulamaları için cazip enzimlerdir. Aynı zamanda bu enzim, farklı çevresel faktörlere de (geniş aralıkta pH, sıcaklık, organik solvent) yüksek tolerans göstermektedir [13].

Lipazlar, endüstriyel uygulamaların çeşitli gereksinimlerini geniş aralıkta karşılama potansiyeline sahiptir. Lipazlar diğer enzimlere göre immobilizasyonu çok daha kolay olduğu için endüstri için oldukça faydalıdır. Mikrobiyal lipazlar bakteriyel amilolitik enzimlerden sonra endüstride kullanılan, endüstriyel biyokatalizin ikinci büyük grubudur [14-16]. Bunlara ek olarak, lipazlar sindirim sistemi ilaçlarında katkı maddesi olarak, çamaşır deterjanı formülasyonunda proteaz enzimleriyle birlikte, yemek endüstrisinde katı ve sıvı yağların modifikasyonunda (besin değerlerini daha çok arttırmak amacıyla ve ürünün daha iyi fiziksel özelliklere sahip olması amacıyla) katalizör olarak, deri endüstrisinde, organik sentez reaksiyonunda istenilen fonksiyonel grupların korunması/kırılmasında ve farmokolojide kiral bileşiklerin ayrılmasında kullanılmaktadırlar [17,18]. Lipaz enziminin stabil ve seçiciliğe sahip olması, onun uygulama alanını arttırmaktadır.

Lipazlar bakteriler, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen enzimlerdir. Fakat, ucuz ve kolay elde edilebilmesi yönüyle mikrobiyal lipazlar endüstriyel uygulamalar için en uygunudur. Lipazlar daha çok bakterilerden elde edilir, çünkü bakteriler genetik modifikasyonlara çok duyarlıdırlar [18]. *Bacillus*’lar çok çeşitli mikroorganizma türleri olan ve bazı türleri ekstrem koşullarda (çöllerde, volkanik sularda, kutuplarda) yaşayabilen bir bakteri cinsidir. Bu hücreler ekstrem iklim koşullarına adepte oldukları için, onlardan elde edilen lipazlar da geniş aralıkta, ekstrem koşullarda olağandışı özellikler gösterir [19-26].

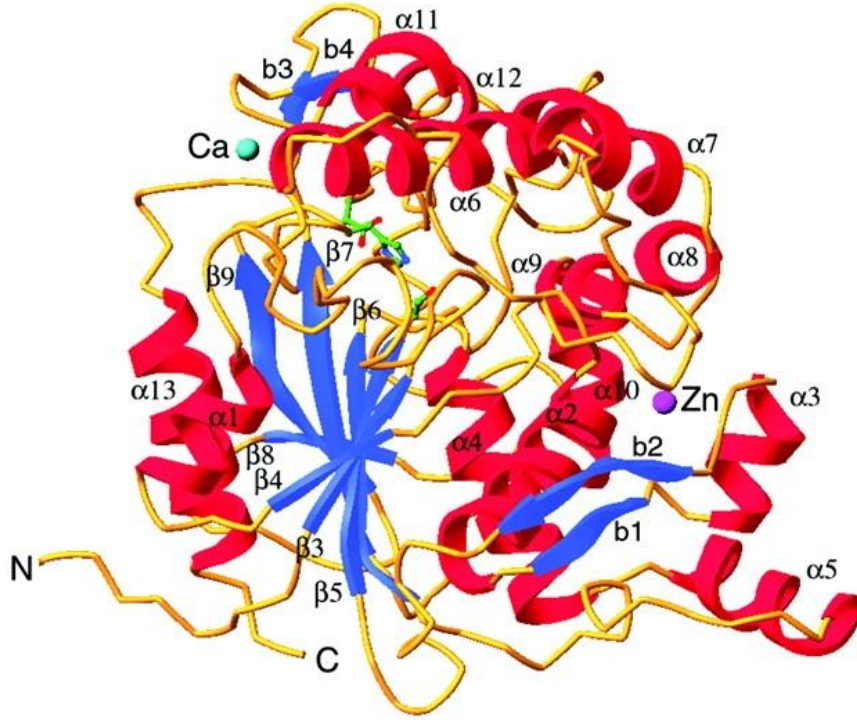
Literatürde kristal yapısı belirlenen lipazlar, *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2) [27, 28], *Bacillus subtilis* (lip A) [29-33], *Bacillus stearothermophilus* lipaz (L1 ve P1) [7, 8, 26, 34], *Geobacillus stearothermophilus* lipazdır (T1) [65].



Şekil 1.3. Bakteriyel lipazların aminoasit dizi karşılaştırması. L1, *Geobacillus stearothermophilus* lipaz; BTL2, *Geobacillus thermocatenulatus*; P1, *Bacillus stearothermophilus* lipaz, T1, *Geobacillus zalihae*, *Geobacillus kaustophilus* ise bu tez çalışmasının enzimidir. “CLUSTAL O (1.0.3) Multiple Sequence Alignment” programı kullanılarak dizi karşılaştırılması yapılmıştır. Aktif bölge rezidüleri (●), Ca^{2+} ile koordine olan rezidüleri (●), Zn^{2+} ile koordine olan rezidülerdir (●).

G. kaustophilus Lipaz ile X-Ray yapısı bilinen, yaklaşık olarak %95 aminoasit dizi benzerliğine sahip olan enzimlerin dizileri karşılaştırılmıştır (Şekil 1.3). L1, *Geobacillus stearothermophilus* lipazın aktif bölge rezidüleri, Ser-113, His-358, Asp-317’dir. Enzim üzerinde kalsiyum bağlanma bölgesi mevcuttur. Bu bağlanma bölgesi sayesinde enzim daha sıkı paketlenerek, termostabil olmaktadır. Kalsiyum iyonu, Glu-360 ve Asp-365’in iki tane karboksil oksijen atomu, Gly-286 ve Pro-366’in ana zincirindeki iki tane karbonil oksijen atomu ve iki tane su

molekülüyle etkileşime girmektedir. Çinko iyonu da, kalsiyum iyonu gibi yapıda bağlanma bölgesine sahiptir. Çinko iyonunun yapıyla koordineli olduğu rezidüler ise, Asp-61, His-81, His-87, Asp-238'dir [34].



Şekil 1.4. L1 lipazın yapısı. Şerit diyagramı olarak gösterilmiştir [34].

1.2 Metal İyonları Ve Tuzların Etkisi

Metal iyonları ve tuzlar, termostabil enzimler için özellikle önemlidir. Bu iyonlar enzim yüzeyinde bağlanma bölgelerine sahip olduğundan dolayı, enzim için yapısal bir rolü vardır. İyonlarla oluşan koordinasyon aracılığıyla, polipeptit zincirindeki bazı esnek bölgeler daha sıkı paketlenir [35].

Genel olarak, yüksek sıcaklıkta bulunan *Bacillus* lipazların aktivitesi kalsiyum iyonu varlığında %10-50 arasında artar. *B. Cereus* C7 lipaz aktivitesi 1 mM Ca^{2+} iyonu varlığında iki kat artar [36]. *B. sp.* L2 lipaz aktivitesi ise 10 mM Ca^{2+} iyonu varlığında %510 artmaktadır. Metal iyonlarının, hidroliz sonrası açığa çıkan yağ asitleriyle etkileşip, bunları yağ tuzlarına çevirerek, ürün inhibisyonunu engellediği ve bu şekilde pozitif etki yarattığı ileri sürülmektedir [71]. Bunların haricinde,

kalsiyum varlığından etkilenmeyen birçok lipaz enzimi de vardır [37-43]. *B. subtilis*'den elde edilen lipazlar 50 mM Ca^{2+} 'a kadar tolerans gösterirler. Bazı *Bacillus* lipazlar ise kalsiyum varlığında az miktarda inhibisyon göstermektedirler [73].

Potasyum ve magnezyum iyonlarının etkisi ise değişkendir. Çoğu lipaz enziminde 10 mM ve daha yüksek K^+ konsantrasyonu varlığında enzim aktivitesi % 5-20 arasında artar. *B. coagulans* BTS-3 enzim aktivitesi potasyum iyonu varlığında şiddetli bir şekilde artar, 1 mM K^+ varlığında enzim aktivitesi % 386 oranında artış gösterir [44]. Na^+ , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} iyonlarında da olduğu gibi Zn^{2+} iyonu çoğu *Bacillus* lipaz için inhibitör etkisi gösterir. Civa (II) iyonu da çoğu lipazlar için güçlü bir inhibitördür. Muhtemelen bu iyonlar, proteinin yapısında bulunan sülfür içeren gruplar ile etkileşime girerek, enzimin konformasyonel yapısında değişikliğe sebep olmaktadır. Birkaç lipaz enzimi ise Hg^{2+} iyonu için kısmen dayanıklıdır. Bunlar, *B. licheniformis* MTCC-6824 [47], *B. sp* GK8 [38], *B. subtilis* FH5 [48] ve *G. thermoleovorans* ID1 LipB'dir [49]. Beklenmedik bir şekilde, Hg^{2+} iyonu *B. coagulans* MTCC-6375 [50] ve *B. coagulans* BTS-3 lipaz enzimini yaklaşık 4.5 kat aktive etmektedir [51]. EDTA ise *B. coagulans* MTCC-6375, *B. subtilis* FH5, J33, L2 [48, 51-55] ve aynı zamanda *B. subtilis* için bir inhibitördür. Bunun anlamı, bu enzimlerin aktif konformasyonları ve stabiliteleri için metal iyonuna ihtiyaç duyduklarıdır. Metal iyonlarının enzim aktivitesine etkisi, inkübasyon süresine ve metal iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır [40, 56-58].

1.3 Surfaktanların Etkisi

Surfaktanlar lipaz katalizörlü reaksiyonlarda su-yağ arayüzeyini arttırıp stabilizeyi ve çözünürlüğü arttırdıklarından ve agregasyonu önlediklerinden dolayı çok fazla kullanılırlar. Surfaktanların birkaç *Bacillus* lipazındaki etkisi incelenmiş ve genel olarak *Bacillus* lipazların deterjanların varlığına toleranslı olduğu görülmüştür. Diğer mikrobiyal lipazların aktiviteleriyle de karşılaştırıldığında, aktivitelerinde daha az bir değişme gözlemlenmiştir [42].

Genellikle *Bacillus* lipazlar Triton X-100'ün küçük miktarının varlığına tolerans gösterir veya zayıf bir şekilde inaktif olurlar. Triton X-100'ün düşük

konsantrasyonu (<%1) % 40-60 arasında *Bacillus* lipazların aktivitesini artırır. [55, 63, 84, 87, 116, 117]. *B.sp.* DH4'ten elde edilen lipaz, % 10 surfaktan varlığında aktivitesi %164 oranında artar [59]. SDS ise *Bacillus* lipazlar için bir inhibitördür. Tek bir istisnai durum vardır, *B. megaterium* 370 lipazın aktivitesi % 0.05 SDS varlığında artış göstermektedir [74]. Bunların haricinde *Bacillus* lipazların serbest yağ asiti ve Tween'ler varlığında da aktiviteleri % 10-60 arasında artmaktadır. *Geobacillus* sp. T1'den elde edilen lipazın aktivitesi 1 mM Tween 80 varlığında % 88 oranında artmaktadır [64]. Diğer lipazlardan farklı olarak ise, *B. megaterium* ve *Bacillus* sp. BP6'dan elde edilen lipaz enzimlerinin aktiviteleri kaprik, miristik ve laurik asitin düşük konsantrasyonlarında (2.5-5 mM) güçlü bir şekilde artmaktadır [75].

1.4 Tez Çalışmasının Amacı

Lipazlar; bakteriler, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilebilen enzimlerdir. Mikrobiyal lipazların ucuz olması ve kolay elde edilebilmesi onları endüstriyel uygulamalar için elverişli kılmıştır. Biyoteknoloji, gıda ve kimya (özellikle deterjan kimyası) endüstrisinde yaygın olarak kullanılan lipaz enziminin metaller ve surfaktanlara karşı aktivitelerinin ve stabilitelerinin incelenmesi ve korunması bu açıdan büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, metallerin ve surfaktanların termofilik özellik gösteren rekombinant *G. kaustophilus* lipaz aktivitesine ve yapısal kararlılığına etkisi incelenmiştir. *G. kaustophilus* lipaz geni daha önce bu laboratuarda *pET28a(+)* ekspresyon vektörüne klonlanmış ve *E. coli*'de ekspresyonu ve kısmi karakterizasyonu yapılmıştı [12]. Ancak, elde edilen rekombinant lipazın spesifik aktivitesi literatürde rapor edilen aynı sınıftaki lipaz aktivitelerine göre oldukça düşüktü ve ayrıca metallerle yapılan deneylerde EDTA varlığında yapılmadığı için elde edilen sonuçlar metallerin gerçek etkisini yansıtmamaktaydı [12].

Bu çalışmada bazı metallerin ve surfaktanların lipaz aktivitesine ve yapısal stabilitesine etkisini incelendi. İlk olarak His₆-lipaz ekspresyonu yapıldı ve protein saflaştırmasında PMSF (proteaz inhibitörü) kullanıldığında enzim aktivitesinin düşük olmasından dolayı, daha önce kullanılan yöntemden farklı olarak PMSF

kullanılmadan protein saflaştırması yapıldı. *pET28(+)* vektöründen kaynaklanan His-tag'ın lipaz aktivitesine ve yapı stabilitesine etkisini görmek için, ilk olarak Trombin ile histidin kuyruğu kesilmeye çalışıldı. Teorik olarak beklenmeyen kesimler olduğundan dolayı çok düşük aktivite ölçüldü. Bunun üzerine, lipaz genini *pET22b* vektör sistemine klonlandı ve His-tag'sız ekspresyon gerçekleştirildi. Metallerin, surfaktanların ve tuzların lipaz aktivitesine etkisi spektrofotometrik yöntemle; yapısına etkisi ise Sirküler Dikroizm (CD) ve Floresans Spektroskopisi kullanarak incelendi.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 MATERYAL

2.1.1 Kullanılan Cihazlar

Heidolph Promax 2020 GFL 1080 su banyosu, Excella E25 çalkalamalı inkübatör, Indesit TN5 (TK) -20°C soğutucu, F1 Multy Channel Finnpiquette (Thermo), İnolab WTW Series pH ölçer, Heidolph MR 3004 safety manyetik karıştırıcı, Varioklav Type 300 Otoklav, Sartoriusn Basic tartı, Mikro 120 Hettich Zentrifugen santrifüj, New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U410 premium -80°C dondurucu, Molecular Devices kuvars plate, Spectromax Plus 384 (Molecular Devices) Spektrofotometre, Shimadzu UV-Visible Spektrofotometre, NUVE NF 1200R Santrifüj, JASCO-815 Circular Dichroism Spektrometre, Varian Cary Eclipse Floresans Spektrofotometresi

2.1.2 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Sodium dodeciyl sulfate (Sigma/L4509), TEMED (Merck/1.10732), Tris-HCl (Calbiochem/648317), Triton X-100 (Merck/1.08603), Yeast extract granulated (Merck/1.03753.0500), 2-mercaptoethanol (Merck/8.05740.0250), Acrylamide (Merck/8.00830.1000), Acrylamide:N, N-methylene bis acrylamide (Fluka/01706), Agar (Fluka/05040), Agarose (Sigma/A9539), Imidazole (Sigma/I-0125), IPTG (Qiagen/12992), Kanamycin sulphate (Fluka/60615), Etidyum bromid, Peptone (Merck/1.07213.1000), *Taq* DNA Polimeraz (Fermantas), 10X *Taq* DNA Polimeraz

PCR tamponu (Fermantas), T4 DNA Ligaz (İnvitrogen), 10X Ligaz Tamponu (İnvitrogen), NdeI Restriksiyon Endonükleaz, Tampon R, HindIII Restriksiyon Endonükleaz, dNTP (Fermantas), Potassium chloride (Sigma/P3911), Sodium chloride (Merck/1.06404), Ampisilin (AppliChem/9F001696), CaCl₂ (Sigma Aldrich/449709), ZnCl₂ (Sigma Aldrich/229997), MgCl₂ (Sigma Aldrich/M8266), CoCl₂ (Sigma Aldrich/232696), MnCl₂ (Sigma Aldrich/328146) , NiCl₂ (Sigma Aldrich/339350), EDTA (Merck/324503), Tween 20 (Merck/655204), Tween 40 (Merck/822185), Tween 60 (Merck/817076), Tween 80 (Merck/822187). Protein saflaştırması için Ni-NTA (Qiagen) ve DEAE-Selüloz (Sigma/D3764) kolon rezinleri kullanılmıştır. Mini plazmit DNA izolasyon kiti (Sigma-Aldrich), Jelden DNA saflaştırma kiti (Qiagen), PCR saflaştırma kiti (Qiagen). Bu tez çalışmasında hazırlanan çözelti ve besiyerler Ek 1’de verilmiştir.

2.2 METOT

2.2.1 His₆-Lipaz Ekspresyonu ve Saflaştırılması

His₆-lipaz ekspresyonu ve saflaştırılması daha önce laboratuvarımızda kullanılan ekspresyon ve saflaştırma yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi [12].

2.2.2 Lipaz Geninin pET22b Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Hücre Özütlerinin Hazırlanması

Lipaz geni Davut ERDOĞAN’ın tez çalışmasındaki klonlama metotları kullanılarak, pET28a(+)-lip vektör sisteminden PCR ile çoğaltılıp pET22b vektör sistemine klonlanmıştır [12].

Steril 5 mL LB besiyerine 80 µg/mL ampisilin ve pET22b lipaz vektörü içeren %50 gliserol stok *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden 5 µL eklenip 37 °C 180 rpm’de gece boyu büyümeye bırakıldı. 16 saat boyunca büyümeye bırakılan küçük kültür 80 µg/mL ampisilin içeren 500 mL LB besiyerine aktarıldı. OD₆₀₀ 0.6 oluncaya kadar inkübasyona bırakıldı. OD₆₀₀ 0.6’ya ulaşınca, son konsantrasyon 0.25 mM olacak şekilde IPTG ile uyarıldı. LB besiyerinden saat başı 1 mL örnek alındı ve alınan

örneklerin ekspresyon kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı. 4. saatin sonunda büyüyen hücreler +4°C ve 4000 rpm’de 15 dk süre ile santrifüjlenerek çöktürüldü.

Hücre peletleri hacminin 10 katı kadar liziz tamponunda çözüldü. Elde edilen karışım buz içerisinde 40 saniye süre ile 10 kez sonikasyon işlemi yapılarak parçalandı. Homojenat +4°C’de ve 4000 rpm’de 20 dk santrifüjlenerek hücre kalıntılarından uzaklaştırıldı, süpernatant DEAE-selüloz kolona yüklendi.

2.2.3 Lipaz Saflaştırılması

DEAE-selüloz kolonu ile iki basamakta saflaştırma yapıldı. DEAE-selüloz kolon 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl pH 8.0 tamponu ile dengelendi. Kolon rezini, 30 mL hücre özütü ile 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım kolona tekrar yüklendi. 100, 200, 300 ve 500 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tamponu ile 5’er mL fraksiyonlar toplandı. SDS-PAGE ile saflık kontrolü yapıldı. Yeterli saflıkta olmadığı için seçilen fraksiyonlar ilk olarak diyaliz yapılarak tuzdan uzaklaştırıldı, sonra DEAE-selüloz kolona yüklendi. 10, 30, 50 ve 100 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tamponu ile yıkama yapılarak fraksiyonlar toplandı. Saflık kontrolü için %10’luk SDS-PAGE yapıldı.

2.2.4 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein saflık kontrolünde SDS (Sodyum dodesil sülfat)-poliakrilamid jel elektroforezi % 0.1 anyonik deterjan varlığında, %10’luk ayırma jeli ve %5’lik yükleme jeli kullanıldı [63]. 15 µL enzim örneği, 5µL 6X’lik Laemmli tamponu ile karıştırdı ve 5 dakika örnekler kaynatıldı. Protein örnekleri marker ile birlikte jele yüklenerek, 25 mA’de yürütüldü. Elektrofrezden sonra jel, SDS jel boyama çözeltisi ile boyandı. Fazla boya saf su ile uzaklaştırıldı. Proteinlerin molekül ağırlıkları, molekül ağırlık belirtecindeki, ağırlığı bilinen protein bantları ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Tablo 2.1 SDS-PAG bileşenleri (Laemmli, 1970).

Bileşenler	Ayırma Jeli	Yükleme Jeli
dH ₂ O	3.3 mL	1.4 mL
%30 Akrilamid çözeltisi	4.0 mL	0.33 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.0	2.5 mL	-
1 M Tris-HCl pH 7.0	-	0.25 mL
%10 SDS çözeltisi	0.1 mL	0.02 mL
%10 APS çözeltisi	0.1 mL	0.02 mL
TEMED	0.004 mL	0.002 mL

2.2.5 Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için 2 farklı metot kullanıldı. İlk olarak, yüksek saflıktaki protein örneklerinin 280 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Lipaz gen dizi analizi sonucunda hesaplanan “extinction coefficient” değeri olan 1,844 kullanıldı [12]. Ölçülen absorbans (A), “extinction coefficient” (ϵ) değerleri ve spektrofotometredeki ışın yolu; (b) “ $A = \epsilon \cdot b \cdot C$ ” Beer-Lambert formülünde yerine yazılarak protein konsantrasyonu hesaplandı.

İkinci olarak ise, Bradford metodu ile Bio-Rad kiti kullanılarak protein miktarı belirlendi. Bu metotta, proteinlerin fosforik asitli ortamda “Coomassie Blue” ile kompleks yapma esasına dayanır. Bu boya negatif yüklüdür ve pozitif yüklü proteinleri bağlayarak boya kırmızı formdan mavi forma dönüşür. Protein standartları kullanılarak, 595 nm’de absorbans ölçümü ile standart grafiği çizilir. Bu grafikte, protein örneğinin absorbansına karşılık gelen konsantrasyon değeri o proteinin konsantrasyonunu göstermektedir.

2.2.6 Lipaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

His₆-lipaz ve lipaz enzimlerinin aktivitesi, *in vitro* ortam koşullarında substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP veya 4-nitrofenil palmitat) kullanılarak ölçüldü. *p*NPP’nin hidrolizinin lipaz enzimi tarafından katalizlenmesi sonucunda oluşan *p*-nitrofenol’ün (*p*NP) oluşum hızı 405 nm’de zamana karşı ölçüldü [60, 61]. 0.4 mM *p*NPP konsantrasyonunda, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponu kullanılarak 50 °C’de ölçümler yapıldı [12]. Spesifik aktivite (unit/mg) hesaplandı.

Unit, bir mikromol *p*NPP'ı birim zamanda ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarıdır. Spesifik aktivite ise, bir miligram enzim başına düşen unit sayısı olarak kabul edilir. Spesifik aktivite ünite/mg protein olarak ifade edilir.

2.2.6.1 PMSF'nin Lipaz Aktivitesine Etkisi

PMSF'nin His₆-lipaz ve lipaz enzim aktivitesine etkisi, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda, sadece 1 mM EDTA veya serbest 3 mM Ca²⁺ (1 mM EDTA+4 mM Ca²⁺) iyonu varlığında 1 mM PMSF (izopropil alkolde) ile inkübe edilerek, zamana karşı aktivite ölçümleri 405 nm'de yapıldı. İnkübasyon sıcaklıkları 20 ve 50 °C olup, 0.4 mM *p*NPP ve 5 µL (0.05 µg) enzim kullanıldı.

2.2.6.2 Metallerin Lipaz Aktivitesine Etkisi

His₆-lipaz ve lipaz enzim aktivitesine Ca²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ ve Ni²⁺ metal iyonlarının etkisi incelendi. Reaksiyon tamponu 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.4 mM *p*NPP ve 5 µL (0.05 µg) enzim kullanılarak, 50 °C 405 nm'de enzim aktivitesi ölçüldü. Toplam reaksiyon hacmi 1 mL olarak belirlendi. Kontrol grubu olarak 1 mM EDTA varlığında aktivite ölçümü yapıldı. Metallerin aktiviteye etkisi 2 farklı konsantrasyonda çalışıldı. Reaksiyon ortamında kontrollü metal konsantrasyonunda çalışmak için reaksiyon ortamına, 1 mM EDTA varlığında 2 mM veya 6 mM metal ilave edilerek, serbest 1 mM veya 5 mM metal konsantrasyonunda enzim aktiviteleri ölçüldü. Farklı olarak, reaksiyon ortamında serbest 2 mM'dan fazla Zn²⁺ iyonunun bulunması bulanıklığa sebep olduğundan dolayı çinko metalinin aktiviteye etkisi serbest 1 mM ve 2 mM Zn²⁺ iyonu varlığında ölçüldü.

2.2.6.3 Ca²⁺ İyonu Varlığında Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisi

Aktivite ölçümleri sadece 1 mM EDTA veya serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında 50 mM Tris- HCl (pH 8.0) tamponunda 5 µL (0.05 µg) enzim ve substrat olarak *p*NPP (0.4 mM) kullanılarak gerçekleştirildi. Spektrofotometrik ölçüm 10 ve 90 °C arasında, *p*NPP'ın lipaz enzimi ile tepkimesi sonrası açığa çıkan *p*-nitrofenol'ün (*p*NP) 405 nm'de absorbans ölçümüyle yapıldı. Spesifik aktivite (unit/mg) hesaplanarak artan sıcaklığa karşı aktivite grafiği çizildi.

Aynı zamanda, sıcaklık stabilite deneyleri; 50, 60 ve 70 °C’de sadece 1 mM EDTA veya serbest 2 mM Ca^{2+} varlığında 50 mM Tris- HCl (pH 8.0) tamponunda enzim (0.01 mg/mL) inkübe edilerek, zamana karşı aktiviteleri Bölüm 2.2.6’de belirtildiği şekilde ölçüldü.

2.2.6.4 NaCl ve KCl Tuzlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi

His₆-lipaz ve lipaz enzim aktivitesine NaCl ve KCl tuzlarının etkisi, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda, 0.4 mM pNPP, 5 µL (0.05 µg) enzim kullanılarak, 50 °C 405 nm’de ölçüldü. 50, 150, 250, 500, 750, 1000 mM tuz konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapıldı. NaCl ve KCl tuzlarının enzim aktivitesine etkisi, reaksiyon ortamına sadece 1 mM EDTA veya serbest 2 mM Ca^{2+} metal iyonu varlığında, artan tuz konsantrasyonuna karşı spesifik aktivite grafiği çizildi.

2.2.6.5 Non-iyonik Deterjanların Lipaz Aktivitesine Etkisi

Triton X-100 ve Tween deterjanlarının enzim aktivitesine etkisi serbest 2 mM Ca^{2+} varlığında 50 °C 405 nm’de ölçüldü. Reaksiyon 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda 5 µL (0.05 µg) enzim ilave edilerek başlatıldı. Artan Triton X-100 deterjan konsantrasyona karşı spesifik aktivite grafiği çizildi. Tween deterjanlarından ise; Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 kullanıldı. Aktivite ölçümleri, serbest 2 mM Ca^{2+} varlığında 1 mM Tween deterjanı varlığında gerçekleştirildi.

2.2.7 Lipaz Enziminin İkincil (Sekonder) Yapısının CD ile İncelenmesi

His₆-lipaz ve lipaz enzimlerinin CD Spektra analizleri JASCO-815 CD spektrofotometre cihazı ile yapıldı. Ölçümler için 0.1 cm kalınlığında küvet ve Peltier (Jasco PTC-423L Peltier Controller) sıcaklık kontrol cihazı kullanıldı.

2.2.7.1 Kalsiyum İyonunun Lipazın İkincil (Sekonder) Yapısına Etkisi

CD Spektra ölçümleri farklı sıcaklıklarda 200-250 nm arasında dalgaboyu taranarak yapıldı. Ölçümler kapaklı 0.1 cm kalınlığındaki kuvars küvette, 20 ve 80 °C arasında onar derecelik artışlarla, 3 kez tekrarlanarak alındı. Küvetin son hacmi 200 µL olarak belirlendi. 0.1 mg/mL enzim kullanılarak 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

tamponunda 1 mM EDTA ve serbest 5 mM Ca^{2+} metali varlığında, [mdeg] cinsinden spektrum ölçümleri kaydedildi. Bu ölçümlerden tampon çözeltisinin CD spektrumu çıkarılarak, spektrum grafiği oluşturuldu. Aynı deneyler 10 mM HEPES-KOH tamponuna uygulanarak da çalışıldı.

CD spektrumları ölçülürken, aynı anda termal denatürasyon ölçümleri de yapıldı. 222 nm'de 30 ile 80 °C arasında birer derecelik artışlarla, 3 kez tekrarlanarak spektrumlar alındı. T_m değeri, ortamda bulunan enzimlerin, %50'sinin doğal, %50'sinin ise denatüre halde bulunduğu sıcaklıktır. Denatürasyon oranı (f_u) = $([\theta_{222}] - [\theta_N]) / ([\theta_U] - [\theta_N])$ formülüyle hesaplanır. θ_N , doğal halin molar eliptisitesi; θ_U , ise denatüre halin eliptisitidir.

2.2.7.2 NaCl ve KCl Tuzlarının Lipazın İkincil Yapısına Etkisi

CD Spektra ölçümleri 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda 0.1 mg/mL lipaz enzim kullanılarak alındı. NaCl (150 mM) veya KCl (150 mM) tuzlarının ilavesiyle lipazın sekonder yapısında meydana gelen değişiklik, farklı sıcaklıklarda 1 mM EDTA ve serbest 2 mM Ca^{2+} metal iyonu varlığında incelendi. 200-250 nm arasında dalgaboyu taranarak, ölçümler 30 ve 90°C arasında onar derecelik artışlarla alındı. 3'er kez tekrarlanarak tampon sisteminden spektrumlar çıkarılıp spektrum grafikleri çizildi. Aynı anda termal denatürasyon ölçümleride yapılarak T_m değerleri karşılaştırıldı.

2.2.7.3 Triton X-100 Deterjanının Lipazın Termal Denatürasyonuna Etkisi

Lipaz enziminin termal denatürasyonuna Triton X-100 deterjanının etkisi, 222 nm'de 30 ile 80°C arasında birer derecelik artışlarla 3'er kez tekrarlanarak ölçüldü. Küvetin son hacmi 200 μL olacak şekilde, ölçümler kapaklı 0.1 cm kalınlığındaki kuvars küvette yapıldı. 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponuna 0.07 mg/mL lipaz enzim konsantrasyonunda serbest 2 mM Ca^{2+} varlığında 0.0171, 0.171 ve 2 mM Triton X-100 deterjan ilave edilerek T_m değerleri ölçüldü.

2.2.8 Ca^{2+} - ve Zn^{2+} - Lipaz Etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi

His₆-lipaz ve lipaz enzimlerinin floresans spektrumları Varian Cary Eclipse Floresans Spektrofotometresi cihazı ile ölçüldü. Ölçümler 3 mL'lik kuvarz küvette 20 °C'de yapıldı. 0.038 mg/mL enzim kullanılarak 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda 1 mM EDTA, Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonları varlığında ölçümler alındı. Uyarma dalgaboyu 295 nm olarak ayarlandı ve emisyon 310 ile 400 nm arasında tarandı.

Floresans probu olarak kullanılan ANS (8-anilinonaftalin-1-sülfonik asit) çözeltisi saf suda hazırlandı. Uyarma dalgaboyu 350 nm olarak ayarlandı ve ANS emisyonu 400 ile 650 nm arasında tarandı.

2.2.9 Lipaz Enziminin Tripsin ile Kesiminin MALDI-TOF/ Kütle Spektrometre (MS) ile Analizi

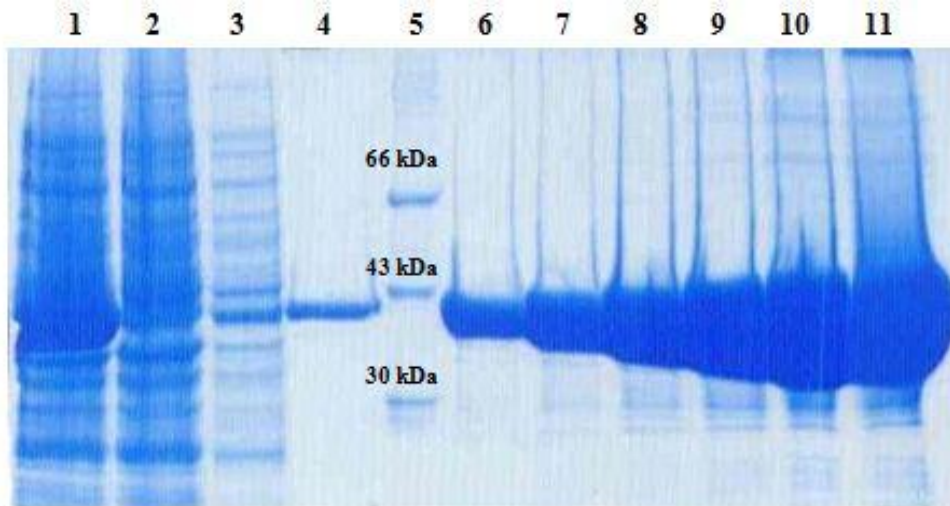
His₆-lipaz (0.6 mg/mL) ve lipaz enzimlerinden (0.6 mg/mL) 30'ar µL örnek alınarak %10'luk SDS-PAGE yapıldı. Jel boyama işleminin ardından, jelde görülen protein bantları jilet yardımıyla kesildi. Boyanın uzaklaştırılması için 200 µL %40 asetonitril içerisindeki 200 mM amonyum bikarbonat çözeltisi eklenerek 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Bu işlem bütün boya uzaklaşana kadar tekrarlandı. Jel parçaları vakum ile kurutulduktan sonra, 20'şer µL (0.4 µg/mL) Tripsin (Sigma proteomics grade) enzimi ilave edildi. Üzerlerine 50'şer µL %9 asetonitril içerisinde 40 mM amonyum bikarbonat çözeltisi eklenerek 4 saat boyunca 30 °C'de inkübe edildi. Karışımın 10 µL ile 10 µL 0.03 M α -siyano-4-hidroksisinamik asit (%50 asetonitril içerisinde %0.1 TFA çözeltisinde çözölmüş) çözeltisi karıştırıldı. 5 µL'si MALDI-TOF/MS plakasına damlatılarak kurutuldu [69].

3. SONUÇLAR

3.1 His₆-Lipaz Saflaştırılması

pET28a(+)-lip plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerinde His₆-lipaz ekspresyonu daha önce laboratuvarımızda kullanılan ekspresyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi [12]. Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırılan His₆-lipaz enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı. Yüksek saflıkta (>%80) His₆-lipaz enzimi elde edildi (Şekil 3.1).

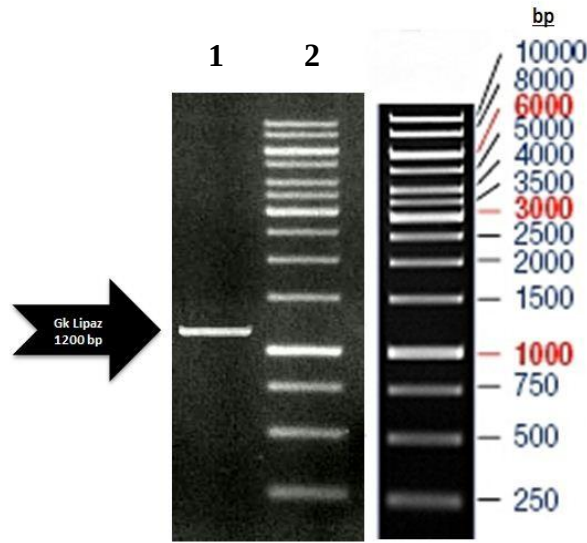
Saflaştırma sırasında kullanılan PMSF enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsüyle kovalent bağ oluşturarak enzimin spesifik aktivitesinin düşük olmasına neden olmaktadır (bkz Bölüm 3.3). Fakat hücre özütlerinin hazırlanması sırasında PMSF kullanılmadığında beklenmedik bir şekilde, saflaştırılan lipazın (teorik olarak 45 kDa olması beklenen) moleküler ağırlığının 43 kDa'dan daha düşük olduğu görüldü. Buna rağmen spesifik aktivitesi oldukça yüksek bulundu (Ca^{2+} varlığında 4000-5000 Unit/mg). His-tag'ı uzaklaştırmak için yapılan trombin kesimleri sonucunda aktivitesi düşük ve beklenenden küçük bir protein elde edildi (sonuç gösterilmedi). Her ne kadar yeni trombin ısımarlanıp kesimler tekrar edildiyse de benzer sonuçlar elde edildi. Ticari trombinin kontamine proteaz içeriyor olabileceği tahmin edilmektedir.



Şekil 3.1. His₆-Lipaz enziminin saflaştırma fraksiyonlarının SDS-PAGE (%10) görüntüsü. 1, Kolon öncesi süpernatant; 2, Kolona bağlanmayan proteinler; 3, 10 mM imidazol içeren tampon ile yıkama; 4, 300 mM imidazol içeren tampon ile yıkama 1; 5, Marker; 6-11, 300 mM imidazol içeren tampon ile yıkama 2-7.

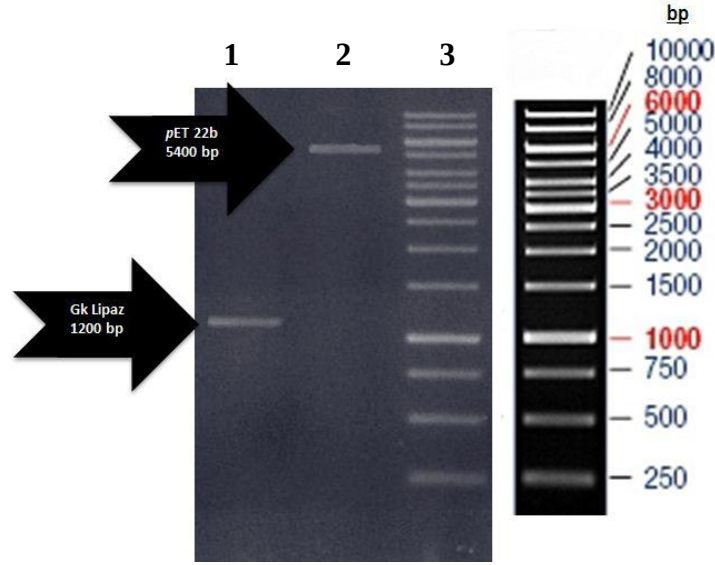
3.2 Lipaz Geninin pET22b Vektörüne Klonlanması, *E.coli*'de Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Yukarıda belirtildiği gibi pET28a(+) vektöründen gelen His-tag trombin ile kesildiğinde beklenenden daha küçük bir protein elde edildi ve spesifik aktivitesi de oldukça düşük bulundu. Bundan dolayı ikinci bir yol olarak, His-tag'sız ekspresyon için *G. kaustophilus* lipaz geni pET22b vektörüne klonlandı. Bu amaçla ilk önce, *G. kaustophilus* lipaz geni pET28a(+)-lip vektöründen PCR ile çoğaltıldı (Şekil 3.2).



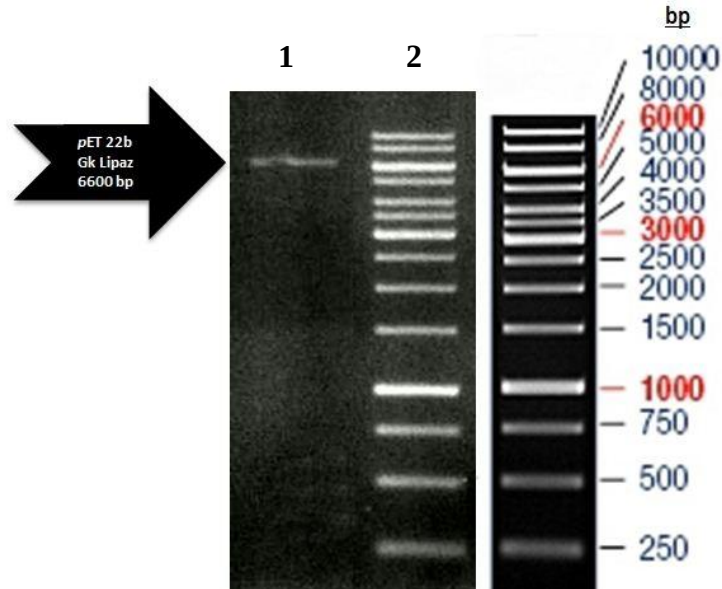
Şekil 3.2. PCR ile çoğaltılan lipaz geninin agaroz jel (%1) görüntüsü. 1, PCR ürünü (lipaz geni); 2, DNA belirteci.

G. kaustophilus lipaz geni ve pET22b vektörü *Nde*I ve *Hind*III enzimleri ile yapışkan uç oluşturacak şekilde kesilerek, lineer DNA fragmenti haline getirildi. Restriksiyon enzimleri ile kesilen pET22b klonlama vektörü ve lipaz geni, kontrol amaçlı agaroz jel elektroforezi yapılarak DNA saflaştırma kiti ile saflaştırıldı (Şekil 3.3).



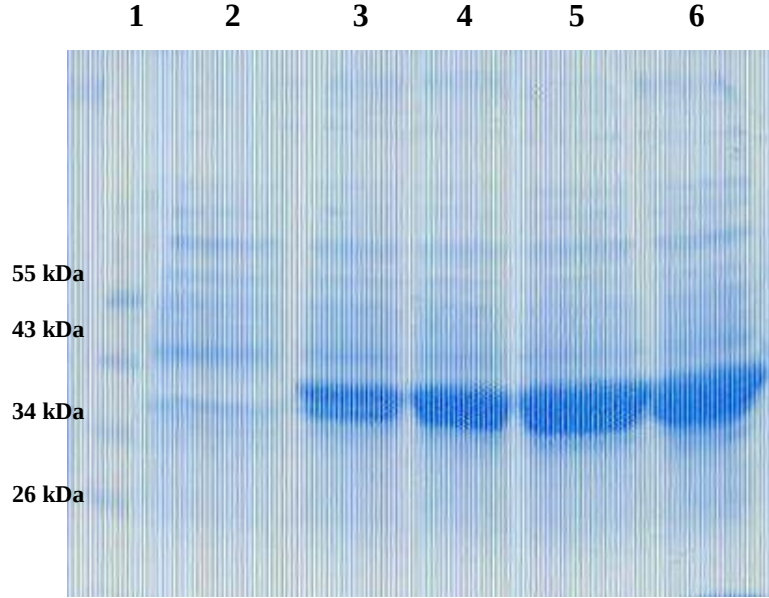
Şekil 3.3. *pET22b* vektörü ve lipaz geninin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan DNA fragmentlerinin agaroz jel (%1) görüntüsü. 1, Lipaz geni; 2, *pET22b* vektörü; 3, DNA Belirteci.

5' ve 3' uçlarında sırasıyla *NdeI* ve *HindIII* kesim bölgeleri içeren yaklaşık 1200 bp uzunluğundaki lipaz gen fragmenti, yine aynı kesim uçlarına sahip klonlama vektörü olan *pET22b* vektörüne (5400 bp) ligasyon ile bağlandı. Bağlanmanın sonucunda yaklaşık olarak 6600 bp uzunluğunda bir ürün oluştu (Şekil 3.4).



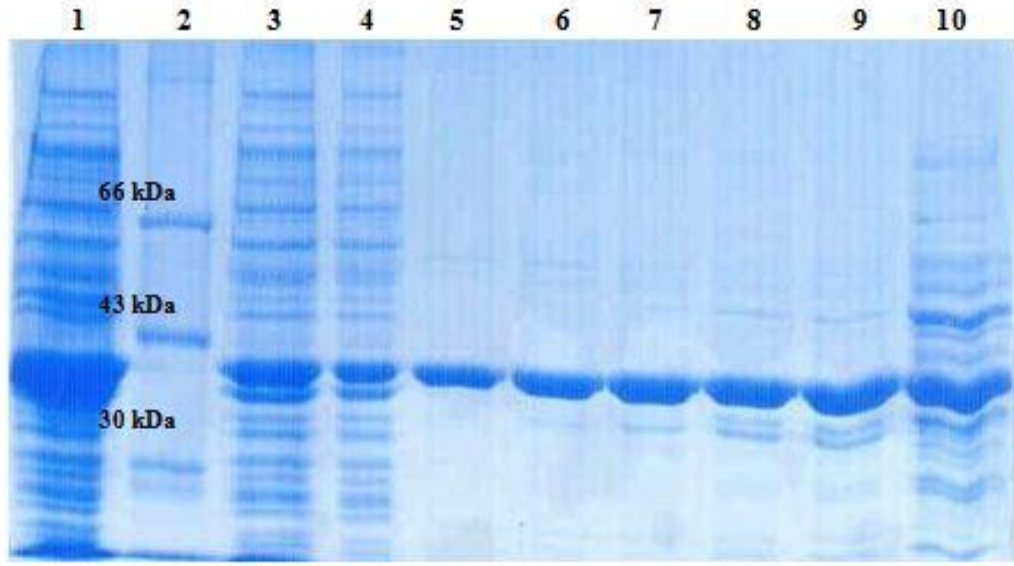
Şekil 3.4. Ligasyon sonucunda elde edilen *pET22b*-lip rekombinant vektörün agaroz jel (%1) görüntüsü. 1, *pET22b*-lip; 2, DNA belirteci.

pET22b-lip vektörü ekspresyon için *E.coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarıldı. 37°C’de IPTG ile 4 saat indüklendi (Şekil 3.5).



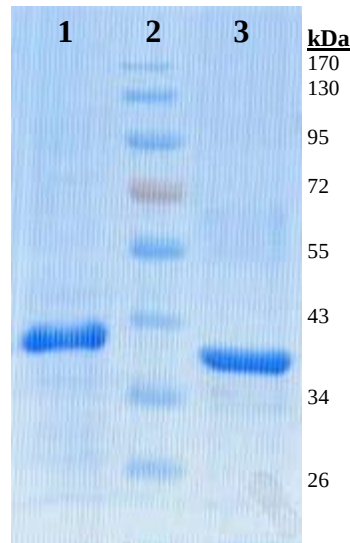
Şekil 3.5. Lipaz enziminin zamana karşı ekspresyon fraksiyonlarının SDS-PAGE (%10) görüntüsü. 1, marker; 2, IPTG öncesi; 3, IPTG sonrası 1. saat; 4, IPTG sonrası 2. saat; 5, IPTG sonrası 3. saat; 6, IPTG sonrası 4. saat.

Lipaz’ın saflaştırılmasında Ni-NTA rezin yerine anyon değiştirici rezin olan DEAE-Selüloz kullanıldı. Lipaz enzimi bu rezin kullanılarak yüksek saflıkta (>%80) elde edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Lipaz enziminin saflaştırma fraksiyonlarının SDS-PAGE görüntüsü. 1, kolon öncesi; 2, Marker; 3, Kolona bağlanmayan proteinler; 4, 10 mM NaCl içeren tampon ile yıkama; 5-6, 30 mM NaCl içeren tampon ile yıkama 1-2; 7-8, 50 mM NaCl içeren tampon ile yıkama 1-2; 9-10, 100 mM NaCl içeren tampon ile yıkama 1-2.

Saflaştırılan rekombinant His₆-lipaz ve lipaz'ın molekül ağırlıkları ilk önce SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 3.7). Bu sonuçlara göre, His₆-lipaz'ın molekül ağırlığı ~42 kDa, lipaz'ın molekül ağırlığı ise ~41 kDa hesaplandı.



Şekil 3.7. Saflaştırılan His₆-lipaz ve lipaz enzimlerinin SDS-PAGE (10%) görüntüsü. 1, His₆-lipaz (pET28a(+)-lip vektöründen); 2, marker; 3, lipaz (pET22b-lip vektöründen).

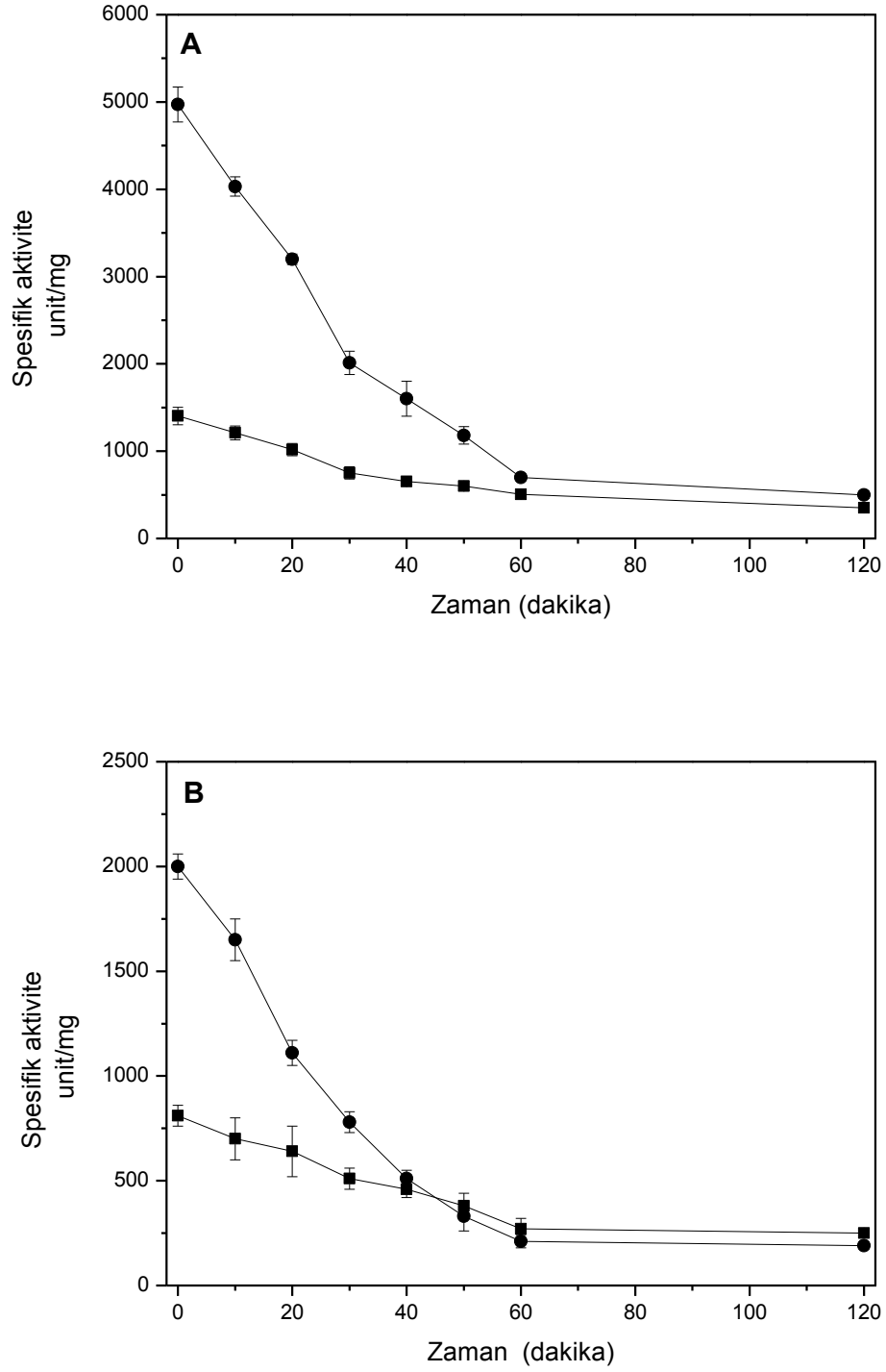
3.3 PMSF'nin Lipaz Aktivitesine Etkisi

Fenil metil sülfonil florit (PMSF), serin proteazların aktif bölgesindeki serin rezidüsüne kovalent olarak bağlanabilmesinden dolayı, bu enzimler için dönüşümsüz (irreversible) bir inhibitördür [70]. Bundan dolayı, protein saflaştırma sırasında ortamdaki proteazları inhibe etmek için kullanılmaktadır.

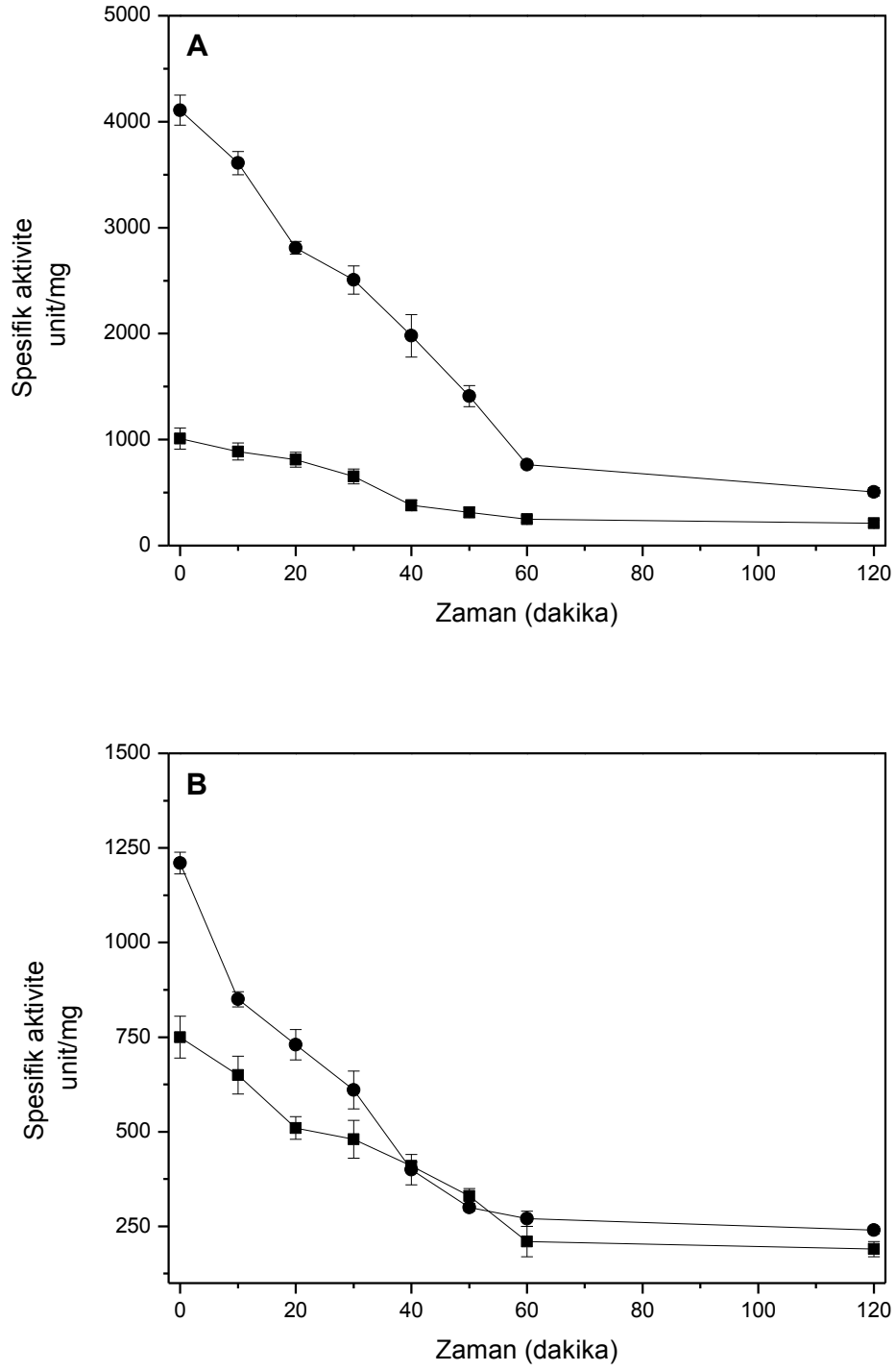
His₆-lipaz ve lipaz enzimlerinin saflaştırılması sırasında ortama ilave edilen PMSF, proteaz inhibitörü görevinin yanı sıra, serin proteaz sınıfından olan lipazın aktif bölgesine kovalent bağlanarak enzim aktivitesini düşürebilmektedir. Bu doğrultuda daha önce yapılan çalışmalarda [12], düşük lipaz aktivitesi görülmesinin sebebinin saflaştırma sırasında kullanılan PMSF olduğunu düşünüldü ve saflaştırma sırasında PMSF kullanılmadı.

Bu bölümde, PMSF kullanılmadan saflaştırılan His₆-lipaz ve lipaz'ın aktivitesine PMSF'nin etkisi incelendi. PMSF'nin aktiviteye etkisinin olup olmadığını görmek amacıyla, sadece EDTA veya Ca²⁺ varlığında aktivite ölçümleri yapıldı. Sadece 1 mM EDTA ve serbest 3 mM Ca²⁺ (1 mM EDTA+4 mM Ca²⁺) varlığında PMSF (1 mM) ilave edilerek, 20 ve 50 °C'de inkübe edilerek zamana karşı aktivite ölçümleri yapıldı. His₆-lipaz 50 °C'de, 1 mM PMSF ve 1 mM EDTA ile 1 saat boyunca inkübe edildiğinde aktivitesinin %86'sını, 1 mM PMSF ve serbest 3 mM Ca²⁺ ile muamele edildiğinde ise %89'unu kaybetmektedir. 20 °C'de de aynı aktivite ölçümleri tekrarlandığında, enzim 1 mM EDTA varlığında %62, serbest 3 mM Ca²⁺ varlığında ise %75 oranında aktivitesini kaybetmektedir (Şekil 3.8).

Lipaz enzimiyle de aynı deney yapıldığında, 50 °C'de 1 mM PMSF ve 1 mM EDTA ile 1 saat boyunca inkübe edildiğinde, enzim aktivitesinin %75'ini, 1 mM PMSF ve serbest 3 mM Ca²⁺ ile muamele edildiğinde ise % 82'sini kaybetmektedir. 20 °C'de de benzer sonuçlar elde edilmiş olup, 1 mM PMSF ve 1 mM EDTA varlığında aktivite %76, 1 mM PMSF ve serbest 3 mM Ca²⁺ varlığında ise %80 azalmaktadır (Şekil 3.9).



Şekil.3.8 PMSF'nin His₆-lipaz enzim aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümleri 50 °C **(A)** ve 20 °C **(B)**'de, 1 mM EDTA (■) ve serbest 3 mM Ca²⁺ (1 mM EDTA+4 mM Ca²⁺) (●) varlığında, 1 mM PMSF içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda yapılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.6.1'de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.9. PMSF'nin lipaz enzim aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümleri 50 °C **(A)** ve 20 °C **(B)**'de, 1 mM EDTA (■) ve serbest 3 mM Ca²⁺ (1 mM EDTA+4 mM Ca²⁺) (●) varlığında, 1 mM PMSF içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda yapılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.6.1'de belirtildiği gibidir.

3.4 Metal İyonlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi

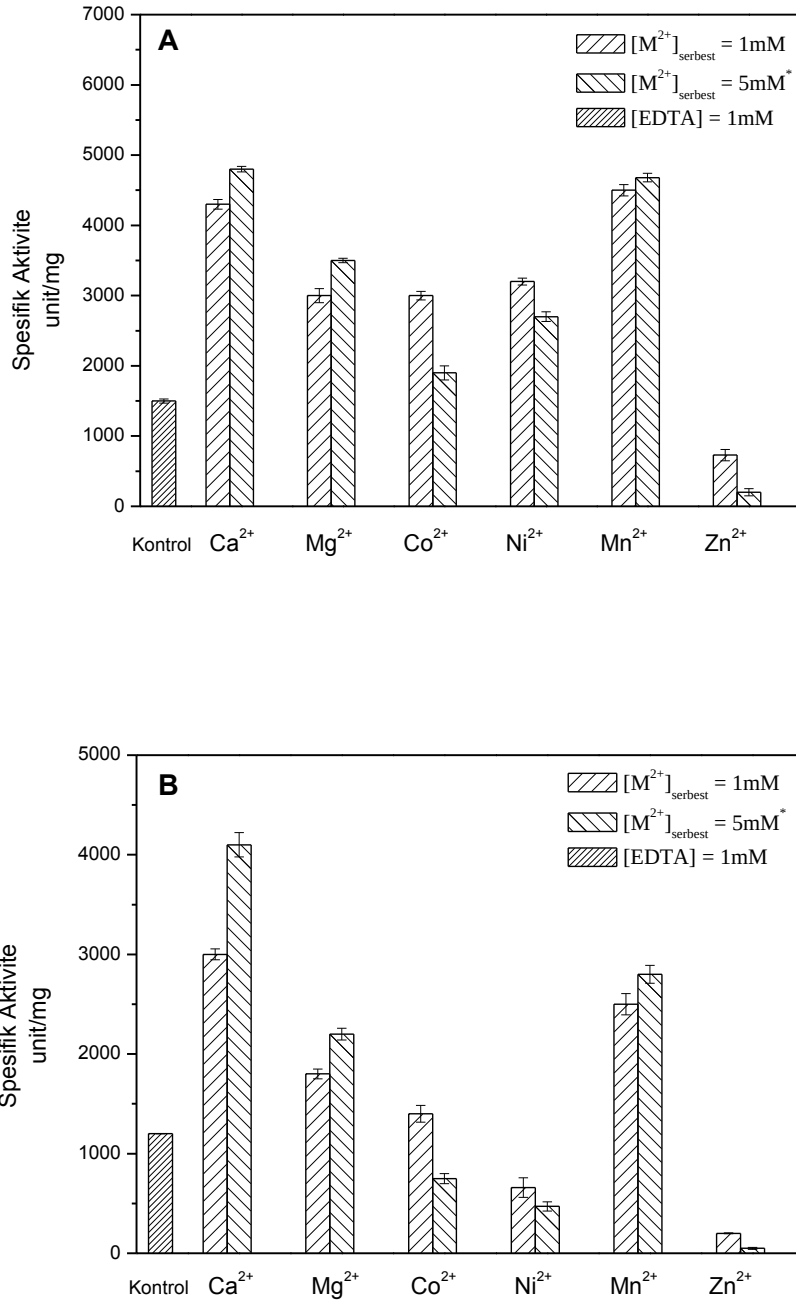
I.5 sınıfına ait lipazlara Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonları bağlanmaktadır [7, 34]. X-ray yapısı bilinen *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2) [27, 28], *Bacillus subtilis* (lip A) [29-33], *Bacillus stearothermophilus* lipaz (L1 ve P1) [7, 8, 26, 34] enzimlerinin kalsiyum ve çinko iyonlarına bağlandığı bölgeler aydınlatılmıştır. Fakat her ne kadar Zn^{2+} iyonu yapısal kararlılık için gerekliliği belirtilmiş olsa bile bazı yayınlarda Zn^{2+} iyonunun aktiviteyi inhibe ettiği de rapor edilmiştir [64].

Bu çalışmada, klonladığımız lipaz için farklı metallerin etkisini görmek amacıyla aktivite ölçümlerinde, kontrol grubu olarak sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisi, metal etkisini incelemek için de 1 mM EDTA+2 mM veya 6 mM metal içeren tampon çözeltisi kullanıldı. 1 mM EDTA ile 1 mM metalin kompleks oluşturduğu “quadratic equation” ile hesaplandı (Çünkü, EDTA-Ca ve EDTA-Zn komplekslerinin denge sabitleri oldukça düşük olup, sırasıyla, $10^{-10.7}$ M ve $10^{-16.5}$ M’dir [72]) ve kompleks oluşturmada ortamda bulunan metal iyonlarını tanımlamak için serbest metal iyonu kavramını kullanıldı. Bu doğrultuda, serbest 1 mM metal (1 mM EDTA+ 2 mM metal) veya serbest 5 mM metal (1 mM EDTA+6 mM metal) varlığında aktivite ölçümleri yapıldı.

His₆-lipaz enzimi için, serbest 1 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} metal iyonları sırasıyla %173, %100, %99, %113, %200 oranında enzim aktivitesini arttırırken, 1 mM Zn^{2+} enzimi %53 oranında inaktive etti. Serbest metal iyonu konsantrasyonu 5 mM olduğunda ise, Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Mn^{2+} metalleri sırasıyla %220, %133 ve %210 oranında enzim aktivitesini arttırırken, Co^{2+} , Ni^{2+} metalleri enzim aktivitesini sırasıyla %33 ve %86 oranında arttırdı. Yüksek Zn^{2+} konsantrasyonunda reaksiyon ortamında meydana gelen bulanıklık nedeniyle maksimum serbest 2 mM Zn^{2+} metal iyonu konsantrasyonunda çalışıldı. Diğer metallerin aksine çinko metali %83 oranında enzim aktivitesini düşürdü (Şekil 3.10A).

Aynı çalışma, lipaz (pET22b vektörüne klonlanan ve His-tag’sız olan) enzim aktivitesi için de yapıldı. Serbest 1 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} iyonları sırasıyla %150, %50, %17 ve %108 oranlarında enzim aktivitesini arttırırken, Ni^{2+} ve Zn^{2+} sırasıyla enzimi %42 ve %75 oranında inaktive etti. Serbest metal iyonu

konsantrasyonu 5 mM olduğunda ise, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} iyonları sırasıyla %233, %84 ve %133 oranında enzim aktivitesini artırırken, Co^{2+} ve Ni^{2+} iyonları enzim aktivitesini sırasıyla %38 ve %59 arttırdı. Serbest 2 mM Zn^{2+} iyonu ise %91 oranında enzimin aktivitesini azalttı (Şekil 3.10B).



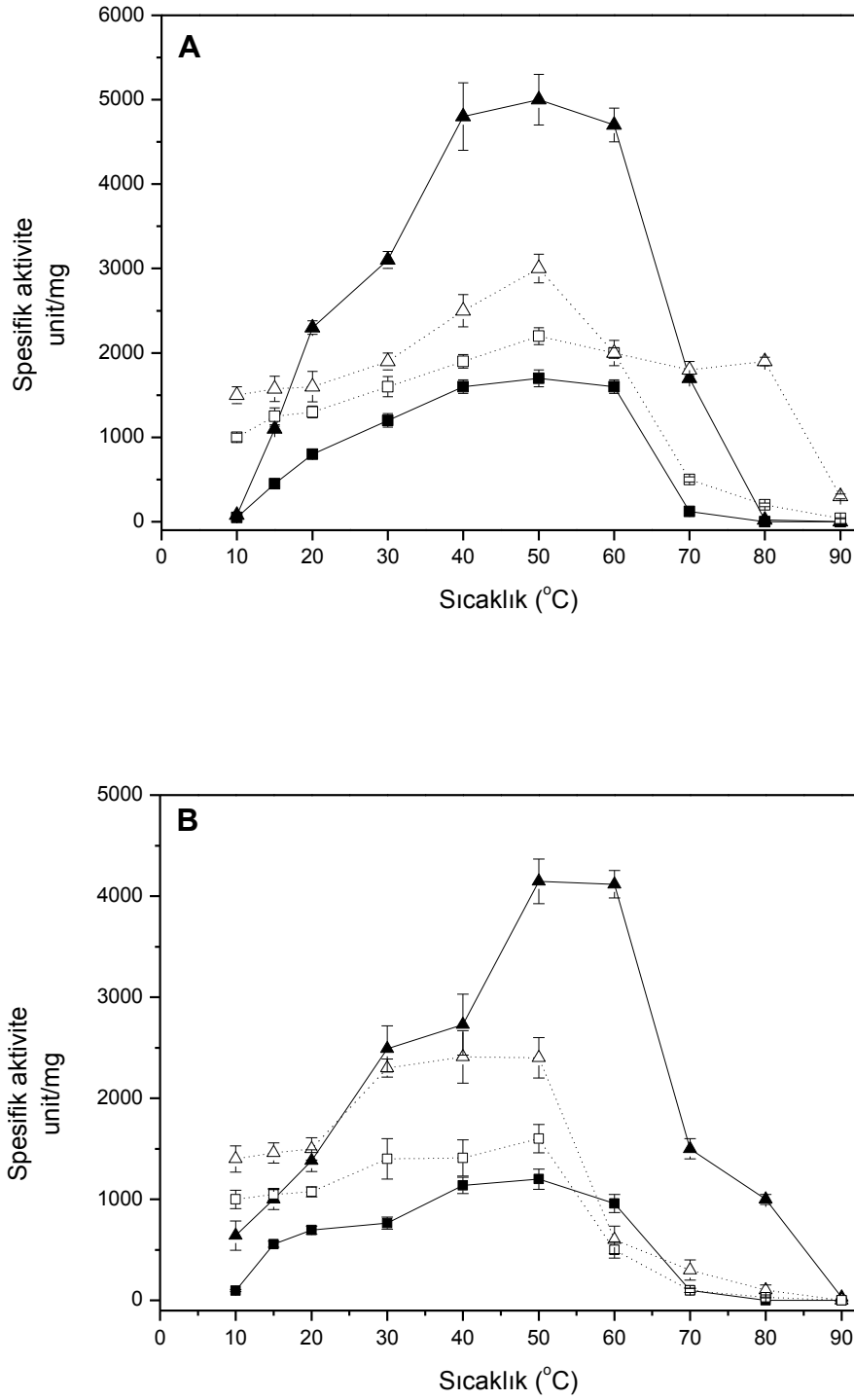
Şekil 3.10. Metallerin His₆-lipaz **(A)** ve lipaz **(B)** aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisini, metallerle yapılan ölçümler ise 1 mM EDTA+2 mM metal veya 6 mM metal içermektedir. (*), Diğer iyonlardan farklı olarak, Zn^{2+} iyonu için 1 mM EDTA üzerine 3 mM Zn^{2+} iyonu eklenerek, serbest 2 mM Zn^{2+} iyonu varlığında çalışılmıştır.

3.5 Ca^{2+} İyonu Varlığında Sıcaklığın Lipaz Aktivitesine Etkisi

Literatürde, kalsiyum iyonunun lipaz enzimine bağlandığında enzimin optimum sıcaklığını ve aktivitesini arttırdığı bilinmektedir [8]. Tezin bu bölümünde His₆-lipaz ve lipaz ile kalsiyum varlığında ve yokluğunda aktivite ölçümleri yapıldı. Aynı zamanda, literatürdeki aktivite çalışmalarında HEPES-KOH tamponu kullanan makaleler de olduğu için, Tris-HCl tamponuyla birlikte HEPES-KOH tamponuyla da aktivite ölçümleri yapıldı.

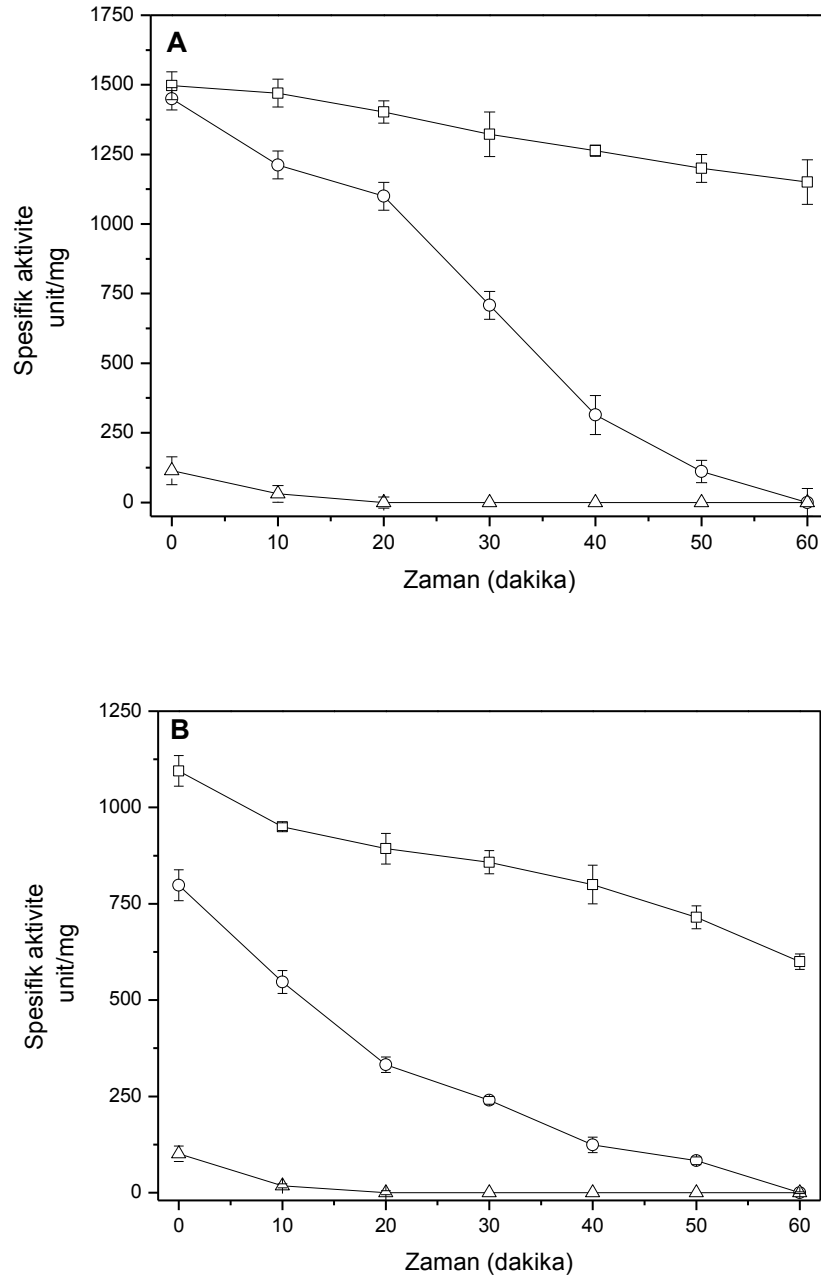
His₆-lipaz için 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda yapılan aktivite ölçümlerinde, sadece 1 mM EDTA varlığında optimum sıcaklık 40-60 °C aralığında olup, 70 °C’de enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 3.11A). Serbest 2 mM Ca^{2+} durumunda ise optimum sıcaklık yine 40-60 °C aralığı olarak belirlenerek enzim aktivitesinde 3 kat artış meydana geldi. Enzim aktivitesini 80 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda kaybetti. Yapılan bu çalışma 10 mM HEPES-KOH (pH 8.0) tamponunda tekrarlandı. Potasyum His₆-lipazı inhibe ettiği için, Tris-HCl tamponundan farklı olarak, HEPES-KOH tamponunda bulunan potasyum nedeniyle düşük aktivite ölçüldü (bkz Bölüm 3.7). 1 mM EDTA varlığında 70 °C’ye kadar enzim aktivite göstermesine karşı, serbest 2 mM Ca^{2+} iyonu varlığında 80 °C’ye kadar aktivite gösterdi (Şekil 3.11A).

His₆-lipaz aktivite ölçümü için uygulanan deney koşulları lipaz enzimi içinde uygulandı. Hem HEPES-KOH tamponu için optimum sıcaklık 30-40 °C, Tris-HCl tamponu için 50-60 °C aralığındadır. Tris-HCl tamponunda 1 mM EDTA varlığında enzim aktivitesini 60 °C’ye kadar korurken, serbest 2 mM Ca^{2+} ilavesi sonucunda 70 °C’ye kadar aktivite gösterdi. His₆-lipaz da olduğu gibi lipazda da, HEPES-KOH tamponunda düşük aktivite gösterdi. Lipaz’ı potasyum inhibe etmediğinden dolayı, HEPES’in yapısında bulunan sülfat grubunun, ara yüzey aktivasyonu ile ilişkili pozitif yüklü rezidümlerle etkileşerek aktiviteyi düşürdüğü tahmin edilmektedir. HEPES-KOH tamponunda ise farklı olarak, 1 mM EDTA ve serbest 2 mM Ca^{2+} varlığında enzim 60 °C’ye kadar aktivite göstermiştir (Şekil 3.11B).

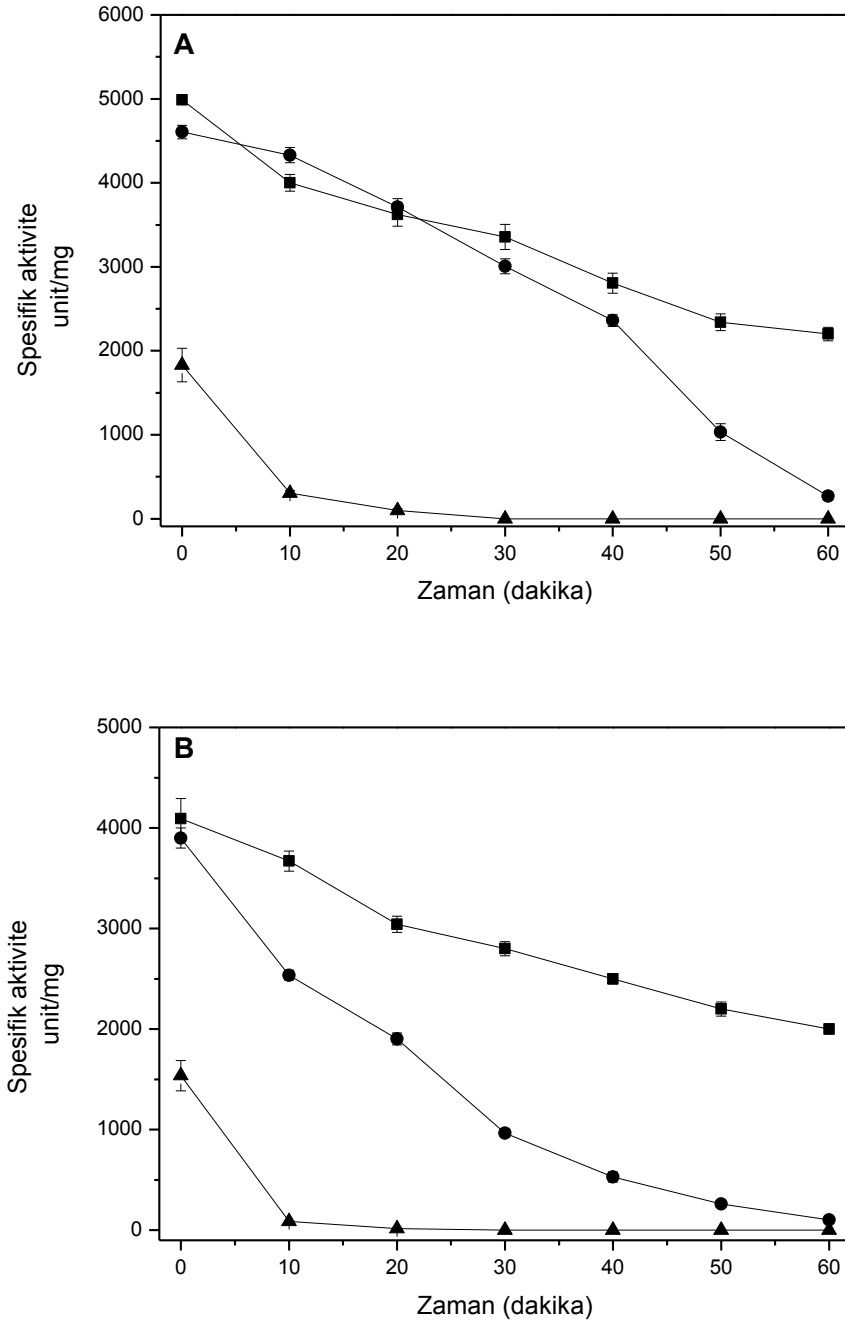


Şekil 3.11. Sıcaklığın Ca^{2+} iyonu varlığında ve yokluğunda His₆-lipaz **(A)** ve lipaz **(B)** aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ve 50 mM HEPES-KOH pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Tris-HCl (pH 8.0)+1 mM EDTA+3 mM Ca^{2+} (▲); HEPES-KOH (pH 8.0)+1 mM EDTA+3 mM Ca^{2+} (△); HEPES-KOH (pH 8.0)+1 mM EDTA (□); Tris-HCl (pH 8.0)+1 mM EDTA (■).

Ayrıca, lipazın termal stabilitesini görmek için 60, 70 ve 80 °C’de zamana karşı aktiviteleri ölçüldü. Sadece EDTA varlığında His₆-lipaz ve lipazın termal stabilitesini artan sıcaklıkla koruyamadığı görülmüştür. 50, 60, ve 70 °C’de yapılan ölçümlerde, His₆-lipaz ve lipazın, 50 °C’den sonra stabilitesini koruyamamış ve 70 °C’de de 10 dakika sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Benzer sonuç lipaz içinde elde edilmiştir. 50 °C’de stabilitesini korumuş, 60 °C için 60 dakika, 70 °C için 10 dakika sonrasında aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Şekil 3.12). Ca²⁺ varlığında yapılan aktivite ölçümleri, sadece EDTA varlığında yapılan ölçümlerle karşılaştırıldığında, Ca²⁺ için de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 3.13).



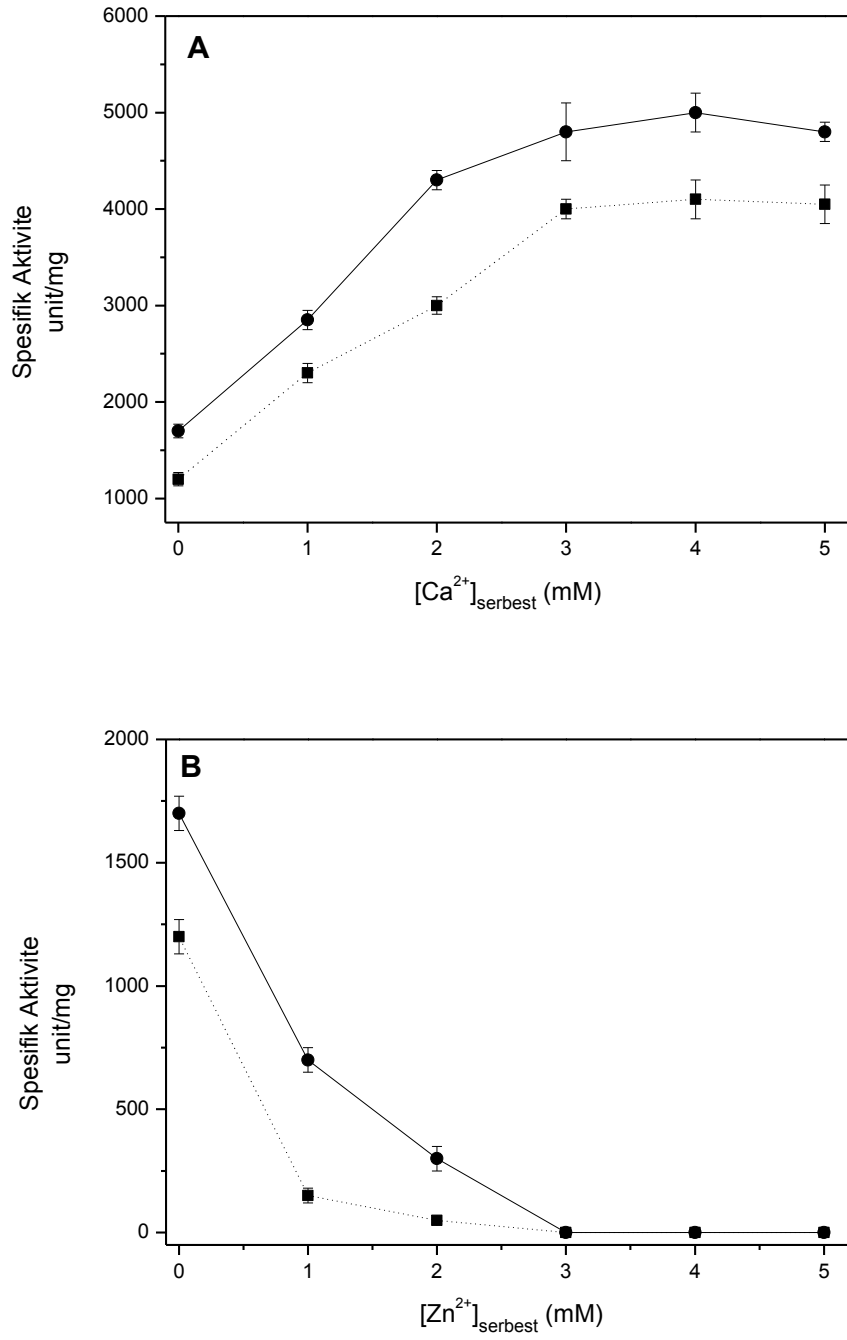
Şekil 3.12. Sıcaklığın EDTA varlığında His₆-lipaz **(A)** ve lipaz **(B)** stabilitesine etkisi. 50°C (□); 60 °C (○); 70 °C'de (△), 60 dakika boyunca enzim inkübe edilerek aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi ve 1 mM EDTA kullanılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.6.3'te belirtildiği gibidir.



Şekil 3.13. Sıcaklığın Ca^{2+} varlığında His₆-lipaz (**A**) ve lipaz (**B**) stabilitesine etkisi. 50°C (■); 60 °C (●); 70 °C (▲), 60 dakika boyunca enzim inkübe edilerek aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi ve serbest 3 mM Ca^{2+} (1 mM EDTA+4 mM Ca^{2+}) kullanılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.6.3'te belirtildiği gibidir.

3.6 Farklı Ca^{2+} ve Zn^{2+} Konsantrasyonlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi

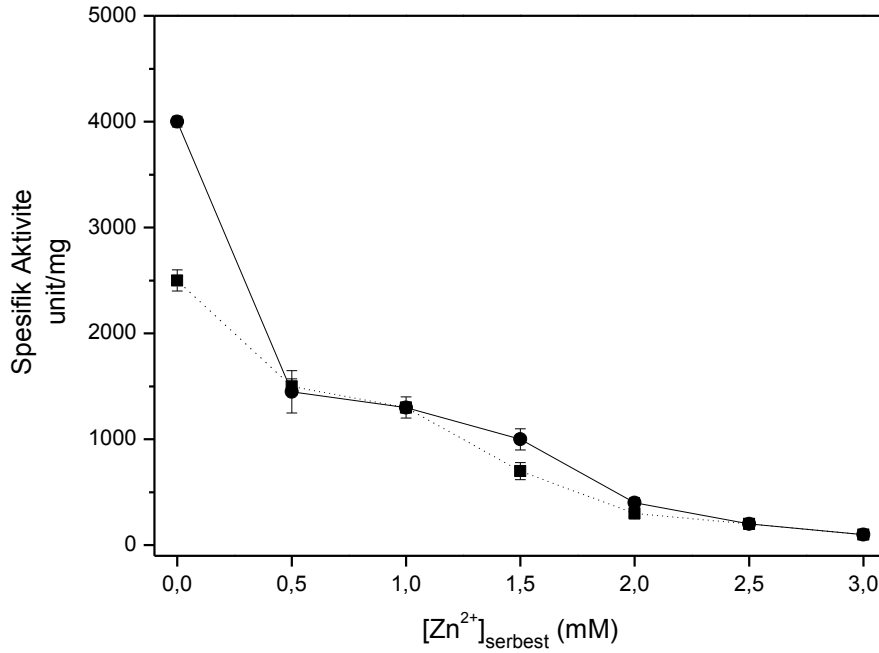
Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının His₆-lipaz ve lipaz aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'un pozitif, Zn^{2+} 'nin ise negatif etki yaptığı sonucuna ulaşıldı (bkz Bölüm 3.4). Bu bölümde, artan Ca^{2+} iyonu konsantrasyonunda yapılan aktivite ölçümlerinde, His₆-lipaz ve lipaz için maksimum spesifik aktivite serbest 3 mM kalsiyum iyonu varlığında elde edildi. Ca^{2+} miktarı daha da arttırıldığında enzim aktivitesinde değişim meydana gelmedi (Şekil 3.14A). Zn^{2+} iyonu için de aynı çalışma yapıldığında, artan çinko konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak His₆-lipaz ve lipaz inhibe olmuştur. His₆-lipaz için serbest 3 mM Zn^{2+} iyonu varlığında, lipaz içinse serbest 2 mM Zn^{2+} iyonu ilavesi enzim aktivitesini tamamen kaybetmesi için yeterlidir (Şekil 3.14B).



Şekil 3.14. Ca²⁺ (A) ve Zn²⁺ (B) iyonlarının His₆-lipaz (●) ve lipaz (■) aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Sıfır (0) mM Ca²⁺ ve Zn²⁺ verisi sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisinde yapılmıştır. Diğer veriler ise 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisine eklenen metalin hesaplanmış serbest iyon konsantrasyonlarını göstermektedir.

Yukarıdaki sonuçlar His₆-lipaz ve lipaz enzimleri için, reaksiyon ortamında Ca²⁺ ve Zn²⁺ iyonları ayrı ayrı bulunduklarında, Ca²⁺ iyonu enzim aktivitesini arttırırken, Zn²⁺ iyonu inhibe ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlara ek olarak, Ca²⁺ varlığında Zn²⁺ inhibisyonunun olup olmadığını da incelendi.

1 mM EDTA ve 3 mM Ca²⁺ iyonu varlığında, artan konsantrasyonlarda Zn²⁺ ilave edilerek, Ca²⁺ varlığında Zn²⁺'nin aktiviteye etkisi incelenmiştir. Kalsiyum iyonu her ne kadar enzim kararlılığını arttırsa da, reaksiyon ortamında çinko iyonunun bulunması, artan çinko konsantrasyonunda enzimin inhibe olmasını engelleyememiştir (Şekil 3.15).



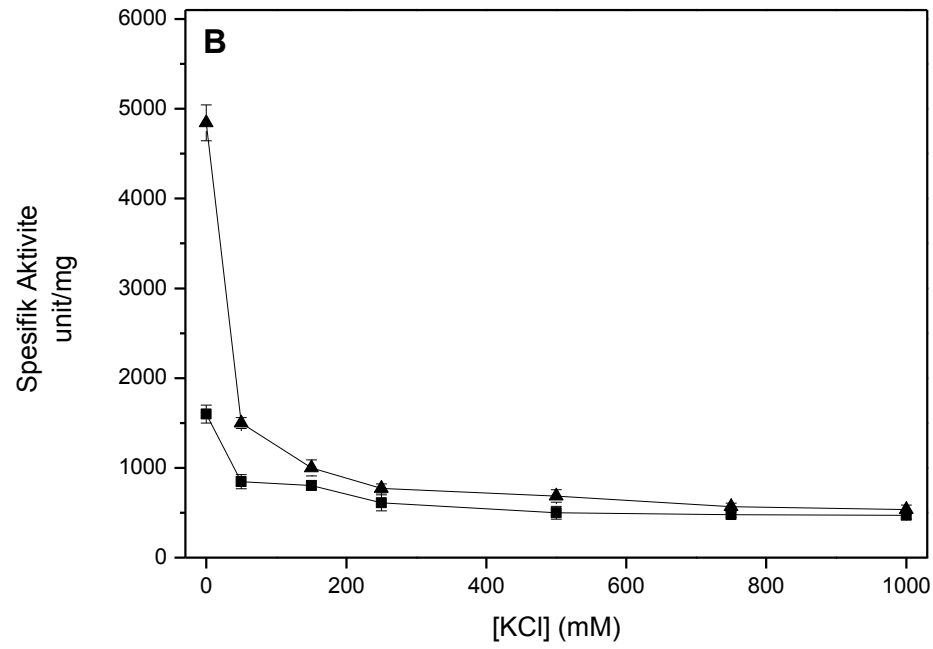
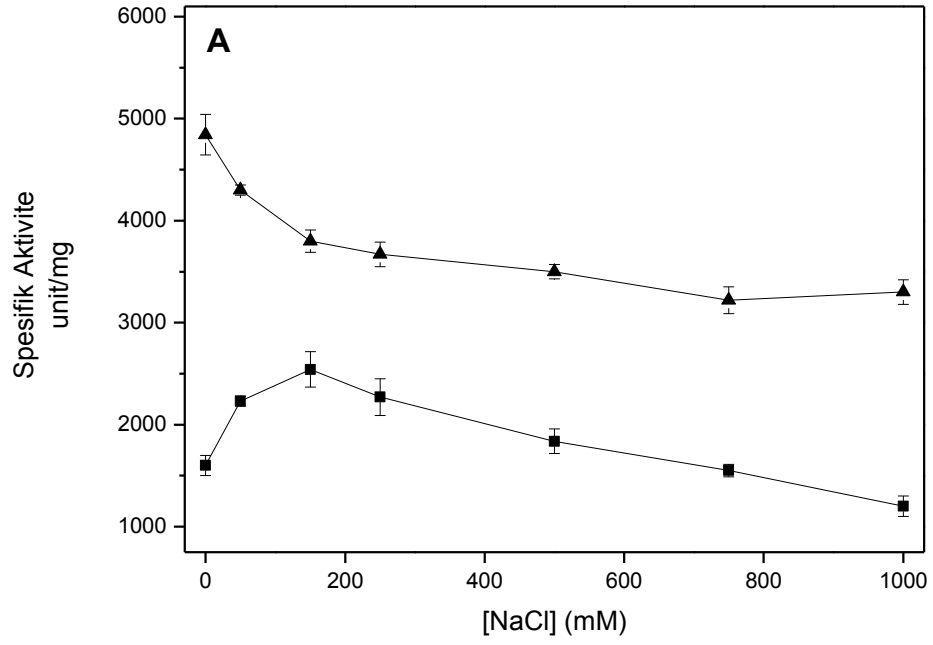
Şekil 3.15. Zn²⁺ iyonunun Ca²⁺ varlığında His₆-lipaz (●) ve lipaz (■) aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisinde serbest 2 mM Ca²⁺ kullanılmıştır. Kontrol (0 mM Zn²⁺) sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisinde yapılmıştır. Diğer veriler ise 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisine eklenen metalin hesaplanmış serbest iyon konsantrasyonlarını göstermektedir.

3.7 NaCl ve KCl Tuzlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi

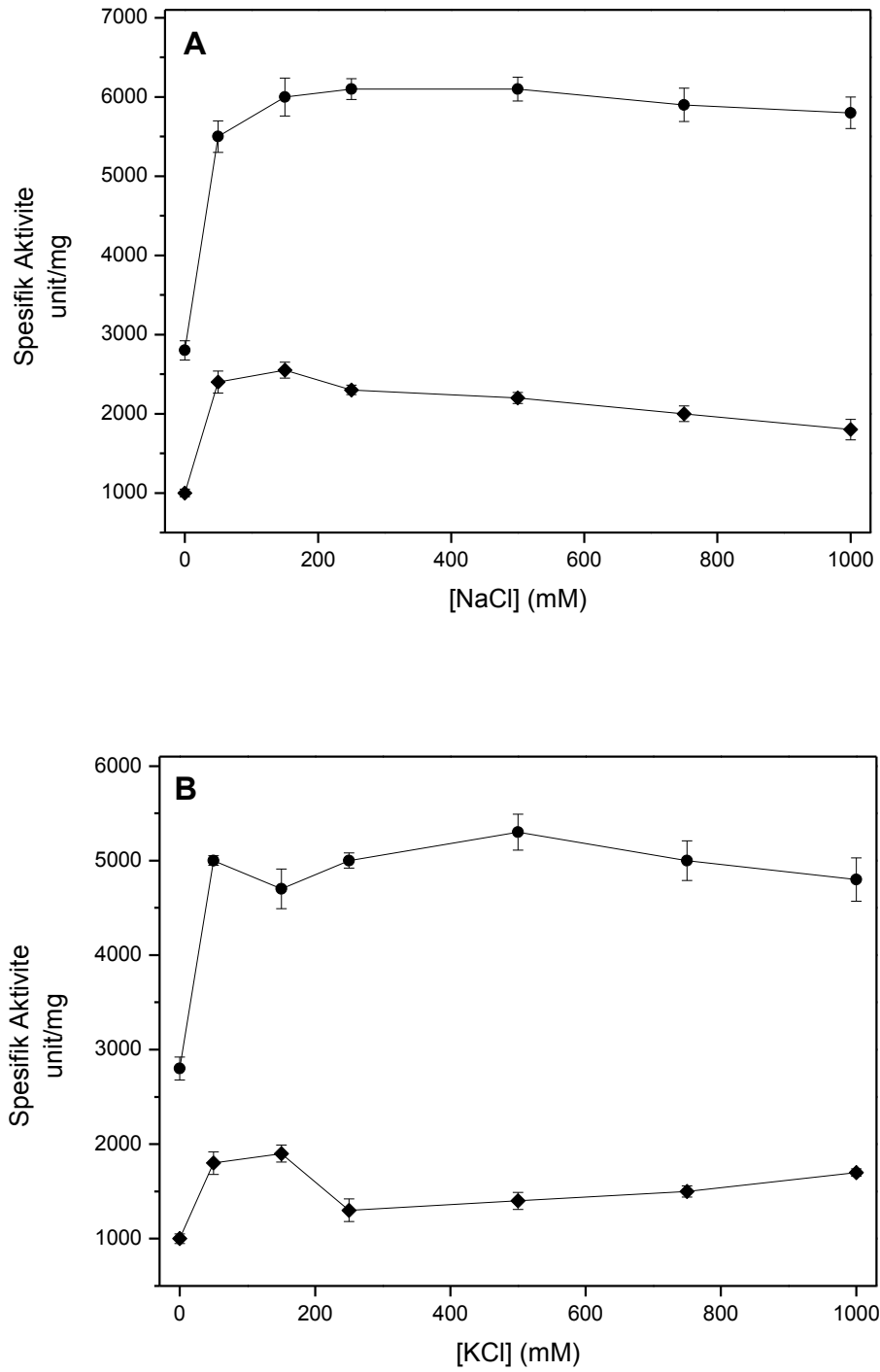
Kasyon- π etkileşimleri, çoğu zaman elektronca zengin aromatik halkalar ile organik veya inorganik (metalik) kasyonlar arasında oluşur. Bu nonkovalent etkileşim küçük molekül kristal yapıların katı hal çalışmalarında doğrulandığı gibi çok güçlü olabilir. Dahası kasyon- π etkileşimleri proteinlerin dördüncül ve kuartern yapılarının oluşması için gerekli kuvvetlerden biridir [66, 67]. Na- π etkileşiminin, His₆-lipaz ve lipaz ile yüksek aminoasit dizi benzerliğine sahip olan, T1 lipazın aktif bölgesinde de etkili olduğu gösterilmiştir [68]. K⁺ ve Na⁺ kasyonları hidrojen bağları, tuz köprüleri ve hidrofobik etkileşimler gibi çeşitli nonkovalent etkileşimlerden sorumludur. Bu nedenle enzim aktivitesine ve yapı stabilitesine etkisini araştırmak istenildi.

Tez çalışmasının bu bölümünde tuz etkisi, Ca²⁺ varlığında ve yokluğunda incelendi. 1 mM EDTA varlığında artan NaCl tuzu konsantrasyonu, His₆-lipaz için 200 mM NaCl konsantrasyonuna kadar aktive ederken, daha yüksek konsantrasyonlarında düşük oranda inhibisyona, serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında da %40 inhibisyona sebep olmaktadır (Şekil 3.16A). KCl, His₆-lipaz aktivitesini büyük ölçüde inhibe etmektedir. 200 mM KCl miktarının maksimum enzim inhibisyonuna neden olmaktadır (Şekil 3.16B).

1 mM EDTA varlığında lipaz enzimi için artan NaCl tuzu konsantrasyonuna karşı yapılan aktivite ölçümünde 150 mM NaCl konsantrasyonuna kadar enzim aktivesi artmaktadır. Reaksiyon ortamında serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında enzim maksimum aktiviteye 150 mM NaCl tuz konsantrasyonu ile ulaşmaktadır (Şekil 3.17A). Aktivite ölçümlerinde NaCl yerine KCl tuzu kullanıldığında, 1 mM EDTA varlığında 250 mM KCl konsantrasyonuna kadar düzensiz aktivite artışı olmaktadır. Serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında, 50 mM KCl tuzu varlığında maksimum enzim aktivitesi görülmektedir (Şekil 3.17B).



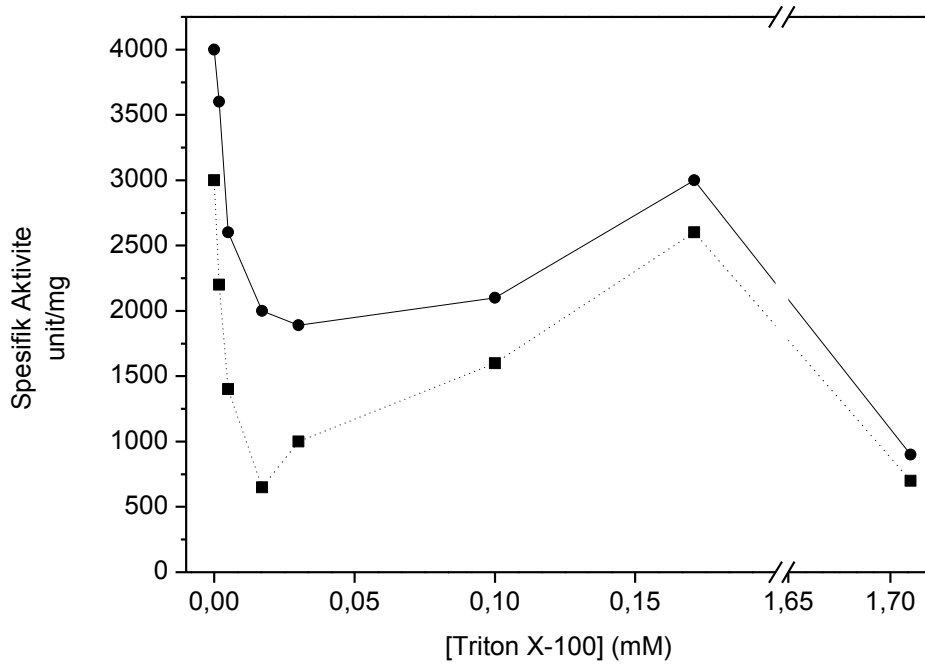
Şekil 3.16. NaCl (A) ve KCl (B) tuzlarının His₆-lipaz aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. 1 mM EDTA (■); 1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺ (▲) içeren tampon çözeltisinde yapılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.6.4'te belirtildiği gibidir.



Şekil 3.17. NaCl **(A)** ve KCl **(B)** tuzlarının lipaz enzim aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. 1 mM EDTA (◆); 1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺ (●) içeren tampon çözeltisinde yapılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.6.4’te belirtildiği gibidir.

3.8 Non-iyonik Deterjanların Lipaz Aktivitesine Etkisi

Surfaktanlar su-yağ arayüzeyini artırıp, stabiliteyi ve çözünürlüğü arttırdıklarından ve agregasyonu önlediklerinden lipaz katalizörlü reaksiyonlarda çok fazla kullanılırlar [27]. Bu nedenle His₆-lipaz ve lipaz enzim aktivitesine non-iyonik deterjan olan Triton X-100'ün etkisini incelemek için serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında aktivite ölçümleri yapıldı. His₆-lipaz ve lipaz aktivitesi, 0-0.03 mM arasında Triton X-100 varlığında azalmakta, deterjan konsantrasyonu 0.17 mM'a yükseltildiğinde ise aktivitede zayıf bir artış gözlenmektedir. 1.70 mM Triton X-100 varlığında ise enzim %75 oranında aktivitesini kaybetmektedir (Şekil 3.18). Enzimin tamamen aktivitesini kaybetmesi %1 Triton X-100 (17.1 mM) varlığında olmaktadır (Data gösterilmedi).



Şekil 3.18. Triton X-100 deterjanının His₆-lipaz (●) ve lipaz (■) aktivitesine etkisi. Aktivite ölçümlerinde 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol serbest 2 mM Ca²⁺ (1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺) içeren tampon çözeltisinde yapılmıştır.

Triton X-100 gibi non-iyonik deterjan olan Tween deterjanlarının lipaz enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla serbest 2 mM Ca^{2+} varlığında aktivite ölçümü yapılmıştır (Bölüm 2.2.6.5). 1 mM Tween deterjanları enzimin tamamen aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Tween deterjanlarının His₆-lipaz ve lipaz aktivitesine etkisi. Kontrol sadece serbest 2 mM Ca^{2+} (1 mM EDTA+3 mM Ca^{2+}) içeren tampon çözeltisinde yapılmıştır. Deney şartları Bölüm 2.2.6.5'te açıklandığı gibidir.

Tween Deterjanları (1 mM)	His₆-lipaz (unit/mg)	Lipaz (unit/mg)
Kontrol	2200	2000
Tween 20	108	35
Tween 40	0	0
Tween 60	0	0
Tween 80	0	0

3.9 Lipaz Enziminin İkincil (Sekonder) Yapısının Sirküler Dikroizm ile İncelenmesi

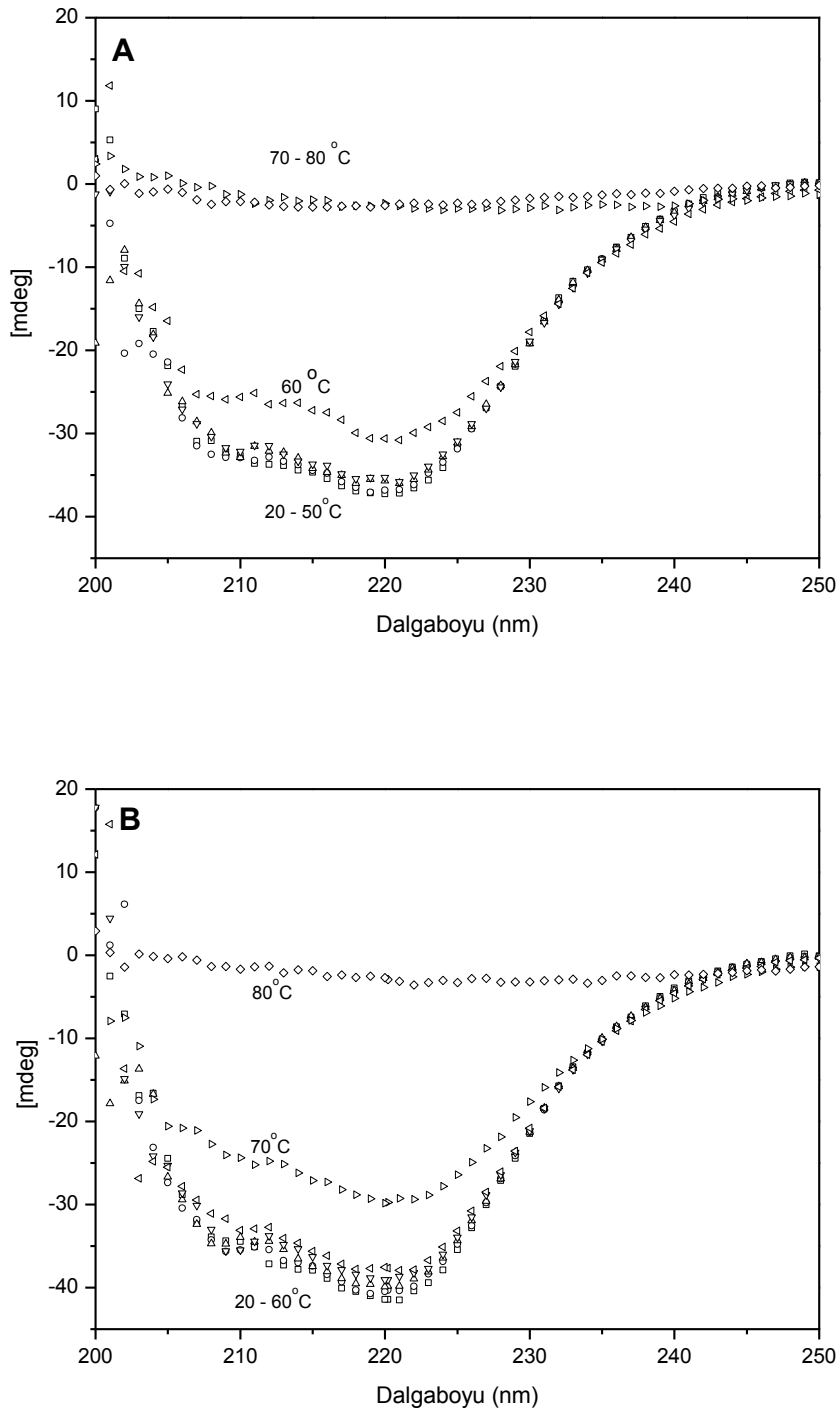
Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının, NaCl ve KCl tuzlarının ve Triton X-100 deterjan ilavesinin His₆-lipaz ve lipazın yapısal değişimine neden olup olmadığını incelemek için Sirküler Dikroizm (Circular Dichroizm, CD) Spektroskopisi kullanıldı.

3.9.1 Kalsiyum İyonunun Lipazın İkincil Yapısına Etkisi

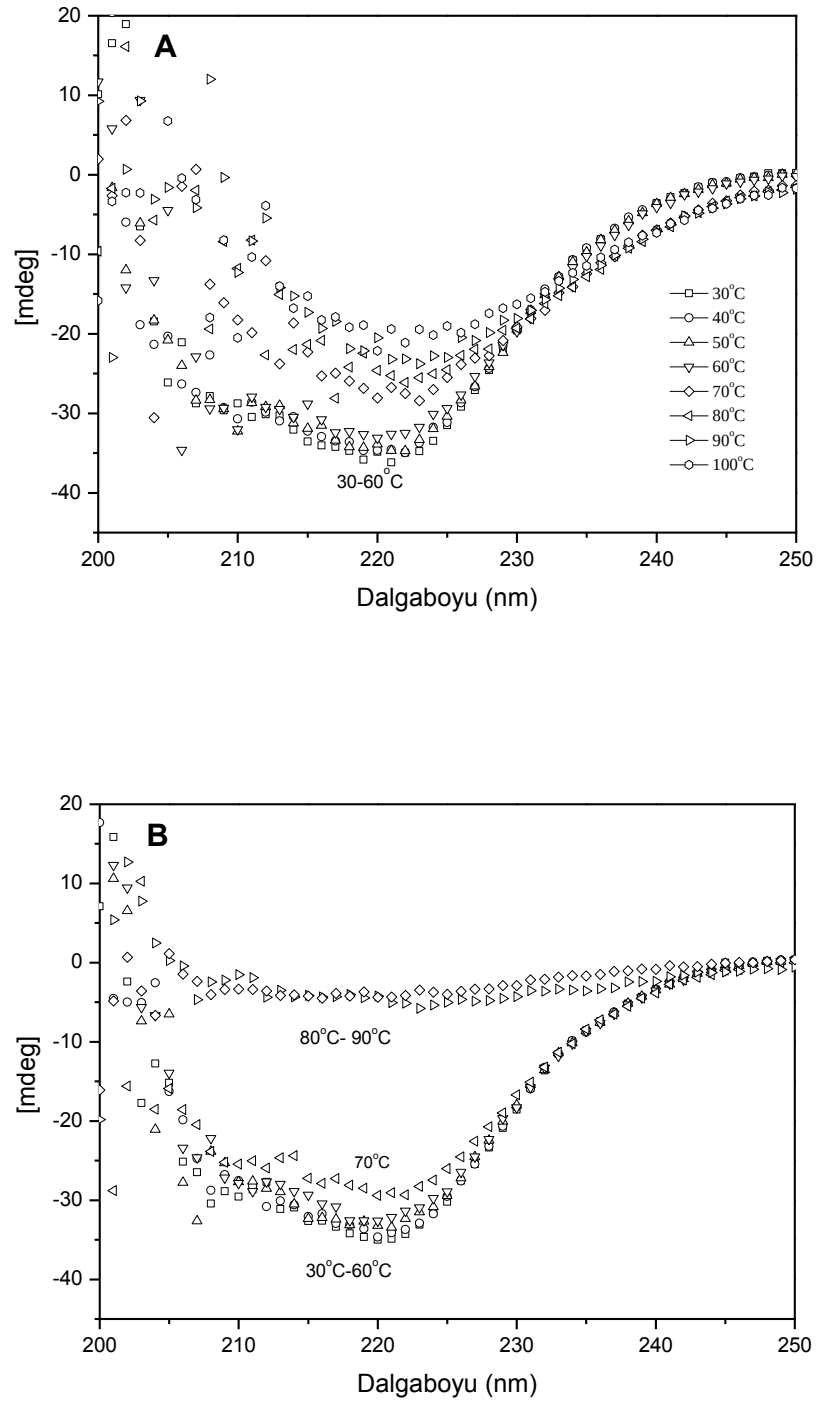
3.9.1.1 Kalsiyum İyonunun His₆-Lipazın İkincil Yapısına Etkisi

Farklı sıcaklıklarda Tris-HCl tamponu içerisinde His₆-lipaz enziminin CD spektrumu ölçülmüştür. Tris-HCl tamponunda, 1 mM EDTA ilavesi ile 20-50 °C arasında alınan CD spektrumları sonucunda enzimin ikincil yapısında bozulma olmayarak enzim stabilitesini korumaktadır. 60 °C'de başlayan α -helikslerdeki bozulma 70 ve 80 °C'de tamamen yapının bozulmasıyla sonuçlanmaktadır (Şekil 3.19). Serbest 5 mM Ca^{2+} ilavesi sonucunda ise sekonder yapı 70 °C'de bozulmaya başlayarak, 80 °C'de tamamen bozulmaktadır. (Şekil 3.19B).

Aynı deneyler HEPES-KOH tampon çözeltisinde de gerçekleştirilmiştir. Tris-HCl tamponunda bulunan lipaz enziminin farklı olarak sadece 1 mM EDTA varlığında His₆-lipaz enzimi agregat olmamaktadır. 30-60 °C arasında sekonder yapı değişmeyerek, 60 °C'den sonra bozulmaya başlamıştır. Sıcaklık 100 °C'ye kadar arttırıldığında da enzim kısmi sekonder yapısı korumaktadır (Şekil 3.20A). Ortama eklenen serbest 5 mM Ca^{2+} varlığında ise enzim 80 °C'nin sonunda tamamen ikincil yapısını kaybetmektedir (Şekil 3.20B).



Şekil 3.19. Sadece EDTA (**A**) veya Ca²⁺ (**B**) varlığında His₆-lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Ölçümler, sadece 1 mM EDTA veya 1 mM EDTA+6 mM Ca²⁺ varlığında, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ve 0.1 mg/mL enzim kullanılarak yapılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.1’de belirtildiği gibidir.

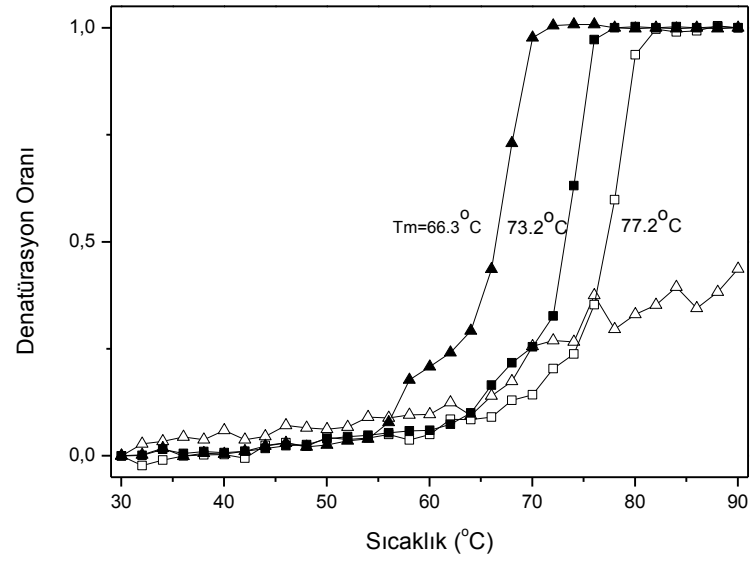


Şekil 3.20. Sadece EDTA **(A)** veya Ca^{2+} **(B)** varlığında His₆-lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Ölçümler, sadece 1 mM EDTA veya 1 mM EDTA+6 mM Ca^{2+} varlığında, 10 mM HEPES-KOH pH 8.0 ve 0.1 mg/mL enzim kullanılarak yapılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.1’de belirtildiği gibidir.

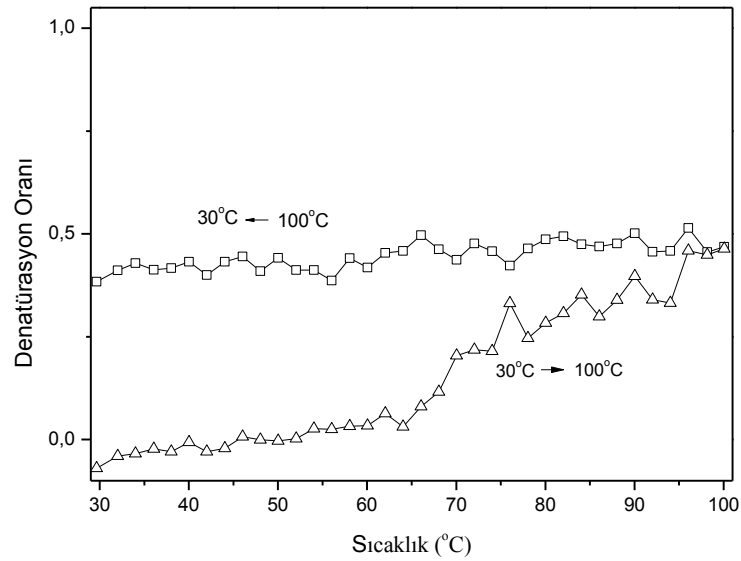
İkincil yapı değişikliklerinin belirlenebildiği gibi termal denatürasyon sıcaklığında belirlenmesi içinde sirküler dikroizm (CD) spektroskopisi kullanılarak belirlendi. Tris-HCl ve HEPES-KOH tamponunda, 1 mM EDTA ve serbest 2 mM veya 5 mM Ca^{2+} varlığında çeşitli sıcaklıklarda 222 nm’de CD ölçümleri yapıldı. Elde edilen “mdeg” birimindeki değerler denatürasyon oranı (f_u) birimine çevrilerek grafiğe aktarıldı (Bölüm 2.1.11).

His₆-lipaz, Tris-HCl tamponu içerisinde 1 mM EDTA varlığında termal denatürasyon sıcaklığı $T_m = 66.3$ °C, serbest 5 mM Ca^{2+} varlığında ise 73.2 °C’dir (Şekil 3.21). HEPES-KOH tamponunda ise durum sıradışıdır. 1 mM EDTA varlığında enzim denatürasyona uğramazken, serbest 2 mM Ca^{2+} varlığında enzim denatüre olmakta ve T_m değeri 77.2 °C olarak ölçülmektedir (Şekil 3.21).

Birçok protein denatüre olduğunda tersinmez olarak agrege olur ve çöker. Fakat bu reaksiyon tersinir ise, denatüre olduktan sonra koşullar değiştiğinde tekrar katlanır. 1 mM EDTA varlığında HEPES-KOH tamponunda His₆-lipaz 100 °C’ye kadar denatürasyona uğramamıştır. İlk olarak 30 °C’den 100 °C’ye kadar arttırılan sıcaklık, sonra 100 °C’den 30 °C’ye soğutuldu ve beklenenin aksine sıcaklık arttırıldığında, sekonder yapıda meydana gelen değişiklik, soğutulduğunda eski haline geri dönmediği görüldü (Şekil 3.22).



Şekil 3.21. His₆-lipaz'ın sadece EDTA veya Ca²⁺ varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği (222 nm). 50 mM Tris-HCl+1mM EDTA (▲); 50 mM Tris-HCl+1mM EDTA+6 mM Ca²⁺ (■); 10 mM HEPES-KOH+1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺ (□); 10 mM HEPES-KOH+1 mM EDTA (△). 0.1 mg/mL enzim konsantrasyonunda çalışılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.1'de belirtildiği gibidir.

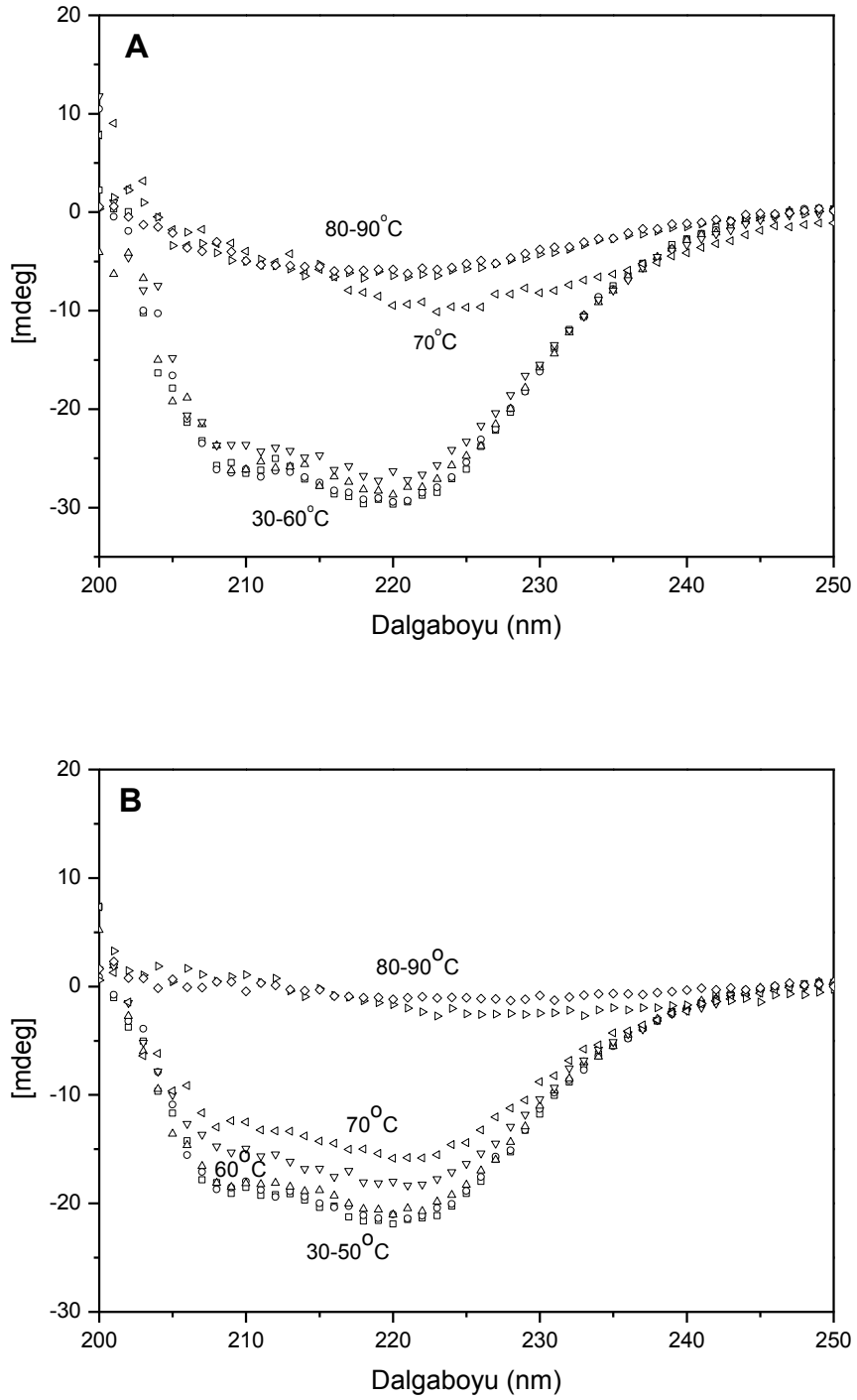


Şekil 3.22. His₆-lipaz'ın sadece EDTA varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği (222 nm). 1 mM EDTA içeren 10 mM HEPES-KOH (pH 8.0) tamponunda, 30°C den 100°C ye ısıtılıp (△), 100°C'den 30°Cye tekrar soğutulularak (□) tekrar kontrolü yapılmıştır. 0.1 mg/mL enzim konsantrasyonunda çalışılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.1'de belirtildiği gibidir.

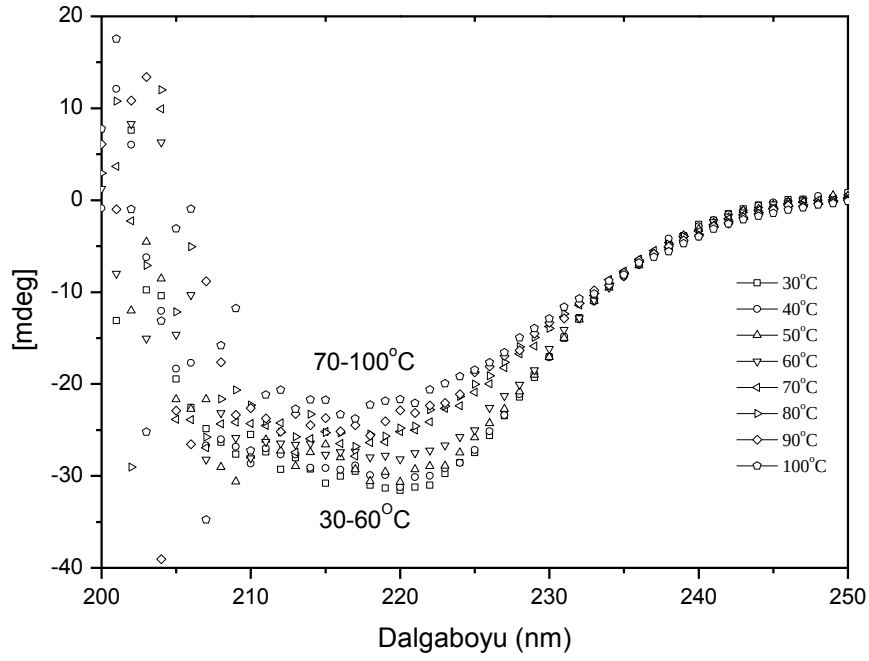
3.9.1.2 Kalsiyum İyonunun Lipazın İkincil Yapısına Etkisi

Farklı sıcaklıklarda Tris-HCl tamponuna içerisinde His₆-lipaz enziminin CD spektrumu ölçülmüştür. Tris-HCl tamponu 1 mM EDTA ilavesi ile 30 ve 60 °C arasında alınan CD spektrumları sonucunda enzimin ikincil yapısı bozulmamakta, enzim stabilitesini korumaktadır. 70 °C’de enzimin ikincil yapısı tamamen bozulmaktadır (Şekil 3.23A). Reaksiyon ortamına eklenen serbest 5 mM Ca²⁺ enzimin stabilitesini arttırarak 80 °C’ye kadar ikincil yapının korunmasını sağlamaktadır (Şekil 3.23B).

Aynı deneyler HEPES-KOH tamponu içinde uygulanmıştır. Tris-HCl tamponunda bulunan lipaz enziminden farklı olarak 1 mM EDTA varlığında His₆-lipaz enziminde de olduğu gibi agrege olmamaktadır. 100 °C’ye kadar sıcaklığın arttırılmasına rağmen enzimin konformasyonu yine de tamamen bozulmamaktadır (Şekil 3.24).

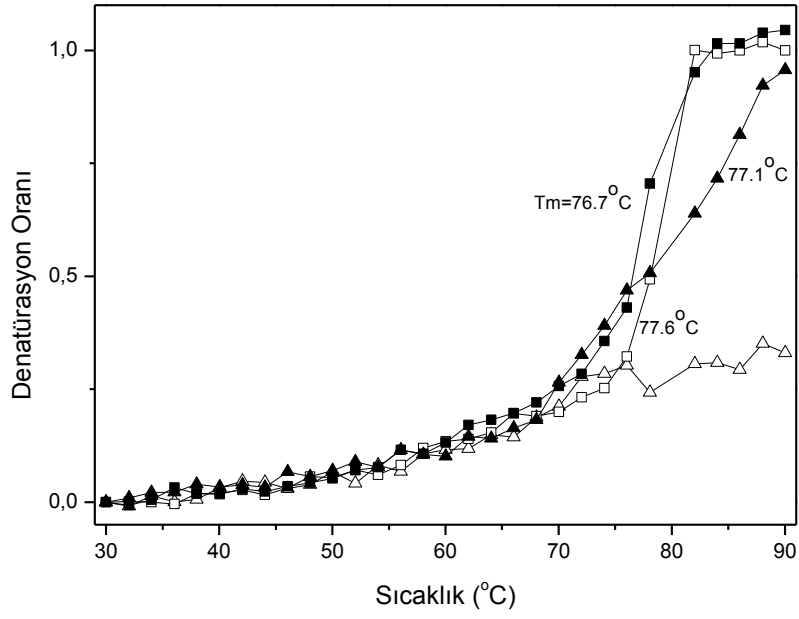


Şekil 3.23. Sadece EDTA **(A)** veya Ca²⁺ **(B)** varlığında lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Ölçümlerde, 1 mM EDTA veya 1 mM EDTA+6 mM Ca²⁺ içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda 0.1 mg/mL enzim kullanılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.1’de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.24. Sadece EDTA varlığında lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Deneylerde, 1 mM EDTA içeren 10 mM HEPES-KOH pH 8.0 ve 0.1 mg/mL enzim kullanılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.1’de belirtildiği gibidir.

Lipaz, Tris-HCl tamponunda 1 mM EDTA varlığında termal denatürasyon sıcaklığı $T_m = 76.7$ °C, serbest 5 mM Ca^{2+} varlığında ise 77.1 °C’dir (Şekil 3.25). His₆-lipaz enzimi için HEPES-KOH tamponunda yüksek sıcaklıkta denatüre olmama durumu lipaz enzimi için de mevcuttur. 1 mM EDTA varlığında enzim denatüre olmazken, serbest 2 mM Ca^{2+} varlığında T_m değeri 77.6 °C olup, enzim denatüre olmaktadır (Şekil 3.25).

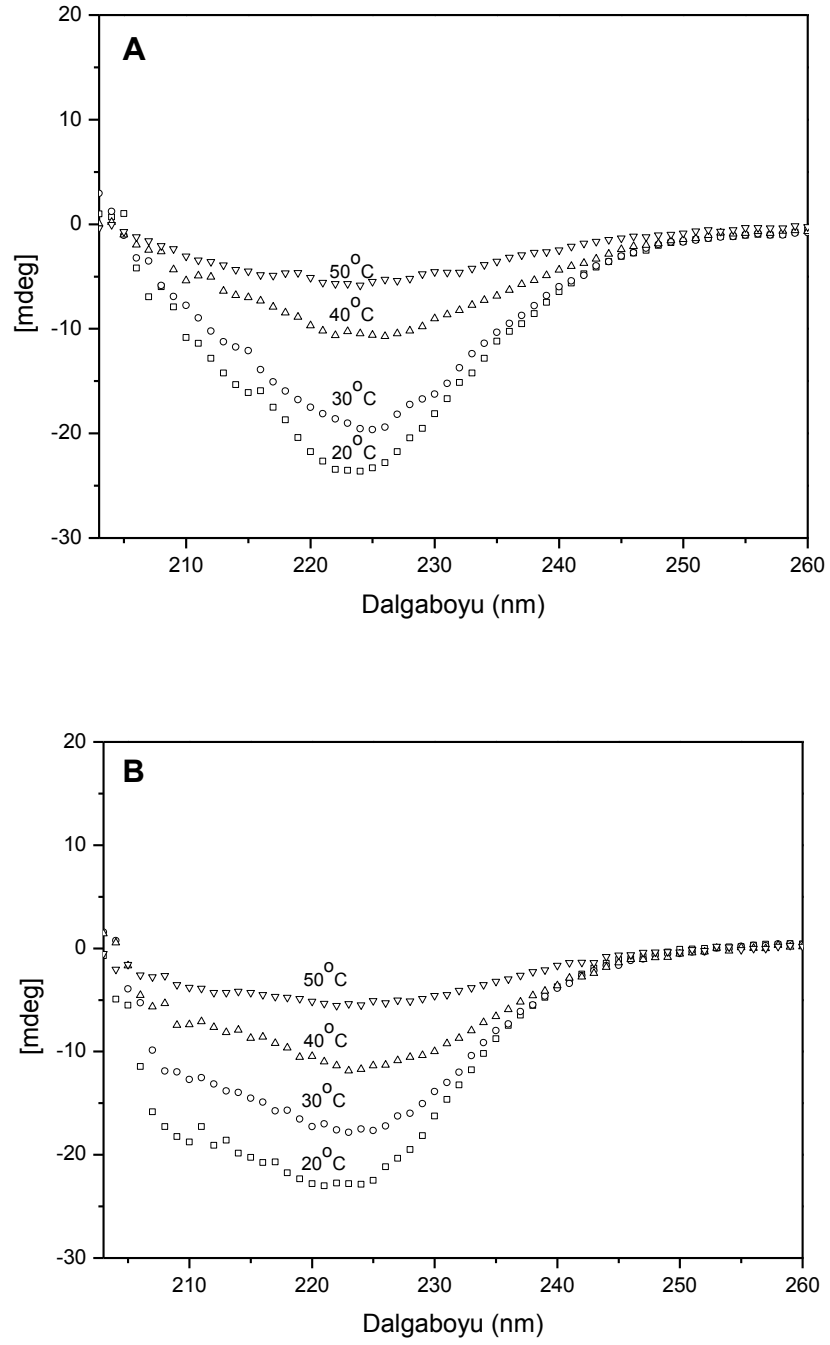


Şekil 3.25. Lipaz'ın sadece EDTA veya Ca^{2+} varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği (222 nm). 50 mM Tris-HCl+1 mM EDTA (▲); 50 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+6 mM Ca^{2+} (■); 10 mM HEPES-KOH+1 mM EDTA+3 mM Ca^{2+} (□); 10 mM HEPES-KOH+1 mM EDTA (△). 0.1 mg/mL enzim konsantrasyonunda çalışılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.1'de belirtildiği gibidir.

3.9.2 Çinko İyonunun Lipazın İkincil Yapısına Etkisi

Zn^{2+} iyonunun enzim aktivitesini inhibe ettiği sonucuna ulaşıldıktan sonra, CD çalışmaları yaparak inhibisyonun enzimin yapısal değişikliğinden kaynaklı olup olmadığı araştırılmak istendi.

His₆-lipaz ve lipaz enzimleriyle artan sıcaklığa karşı ölçülen CD spektrumlarına göre 50 °C’de enzim tamamen denatürasyona uğramaktadır. 20 °C’den 50 °C’ye kadar enzimin basamak basamak ikincil yapısının bozulduğu da açık bir şekilde görülmektedir (Şekil 3.26).



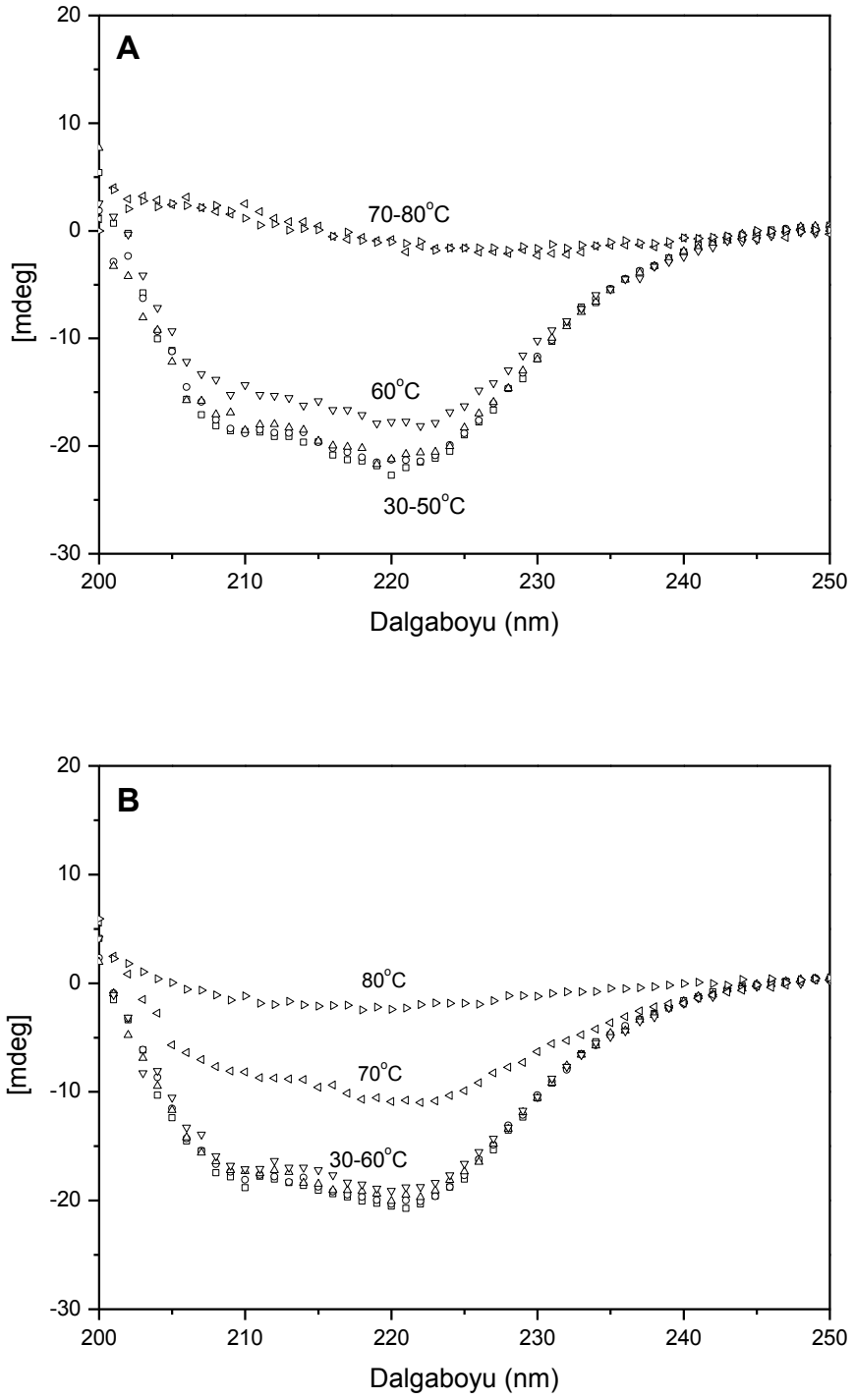
Şekil 3.26. Zn^{2+} varlığında His₆-lipaz (A) ve lipazın (B) farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Ölçümler, 50 mM Tris-HCl pH 8.0+1 mM EDTA+2 mM $ZnCl_2$ varlığında, 0.1 mg/mL enzim kullanılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.1’de belirtildiği gibidir.

3.9.3 NaCl ve KCl Tuzlarının Lipazın İkincil Yapısına Etkisi

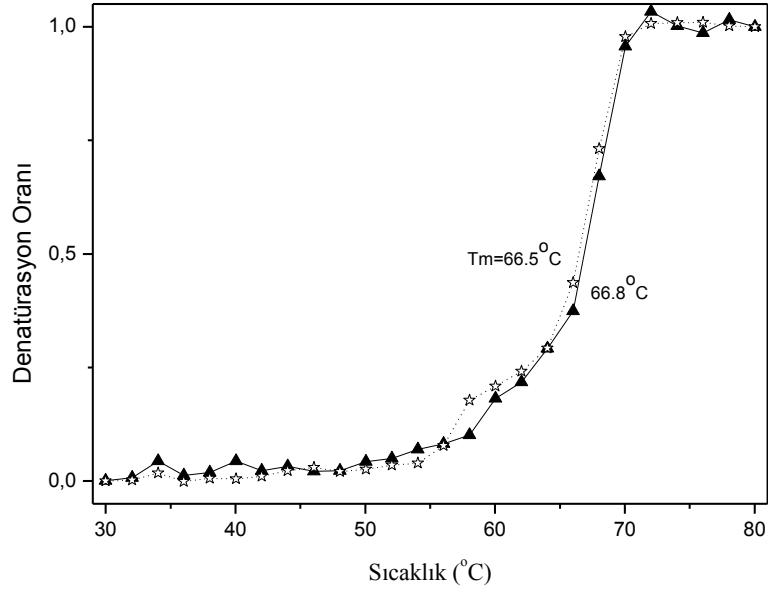
Aktivite ölçümleri sonuçlarına göre, KCl tuzu His₆-lipazın aktivitesini inhibe ettiği, NaCl ise lipaz aktivitesini arttırdığı için; CD çalışmalarında KCl tuzunun His₆-lipaz üzerine, NaCl tuzunun lipaz enzimi üzerine etkisi incelenmiştir.

His₆-lipaz enzimi için, 1 mM EDTA ve serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında reaksiyon ortamına eklenen 150 mM KCl tuzu ile alınan CD spektrum ölçümleri karşılaştırıldığında, KCl tuzunun enzimin ikincil yapı değişimine sebep olmadığı görülmektedir (Şekil 3.27). Aynı zamanda termal denatürasyon sıcaklıkları arasında da fark bulunmamaktadır. Sadece 1 mM EDTA varlığında termal denatürasyon sıcaklığı 66.8 °C, 1 mM EDTA üzerine 150 mM KCl tuzu ilave edildiğinde termal denatürasyon sıcaklığı 66.5 °C (Şekil 3.28) hesaplanmıştır. Aynı ölçümler, kalsiyum iyonu varlığında (serbest 2 mM Ca²⁺) tekrarlanmıştır. Sadece serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında termal denatürasyon sıcaklığı 73.1 °C iken, serbest 2 mM Ca²⁺ üzerine 150 mM KCl tuzu ilave edildiğinde termal denatürasyon sıcaklığı 70.8 °C olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.29).

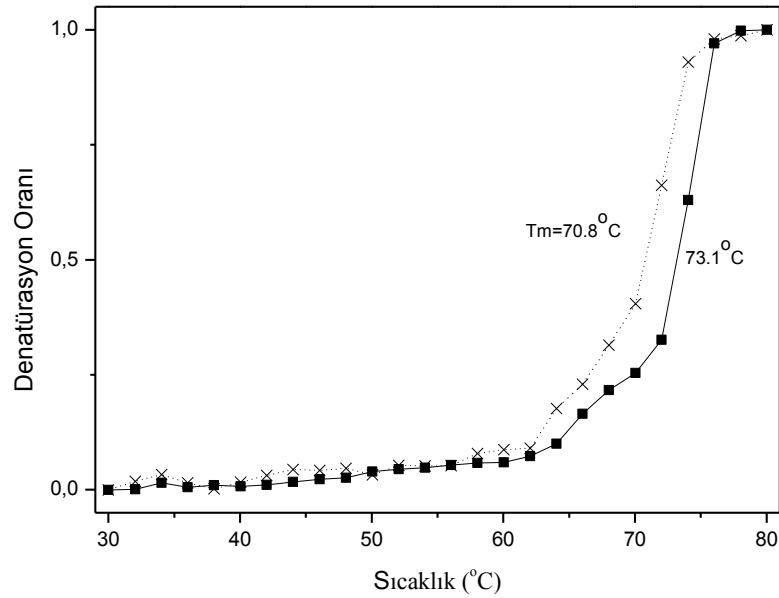
Aynı deneyler NaCl tuzu için lipaz enzime de uygulanmıştır ve elde edilen sonuç His₆-lipaz enziminde KCl tuzunun etkisine benzerdir. 1 mM EDTA ve serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında reaksiyon ortamına eklenen 150 mM NaCl tuzu ile alınan CD spektrum ölçümleri karşılaştırıldığında, NaCl tuzunun enzimin ikincil yapı değişimine sebep olmadığı görülmüştür (Şekil 3.30). Aynı zamanda termal denatürasyon sıcaklıkları arasında fark bulunmaktadır. Sadece 1 mM EDTA varlığında termal denatürasyon sıcaklığı 77.1 °C iken, 1 mM EDTA üzerine 150 mM NaCl tuzu ilave edildiğinde T_m değeri 68.2 °C bulunmuştur (Şekil 3.31). Aynı ölçümler serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında tekrarlanmıştır. Sadece serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında T_m 76.7 °C, serbest 2 mM Ca²⁺ üzerine 150 mM NaCl tuzu ilave edildiğinde ise T_m 73.9 °C olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.32).



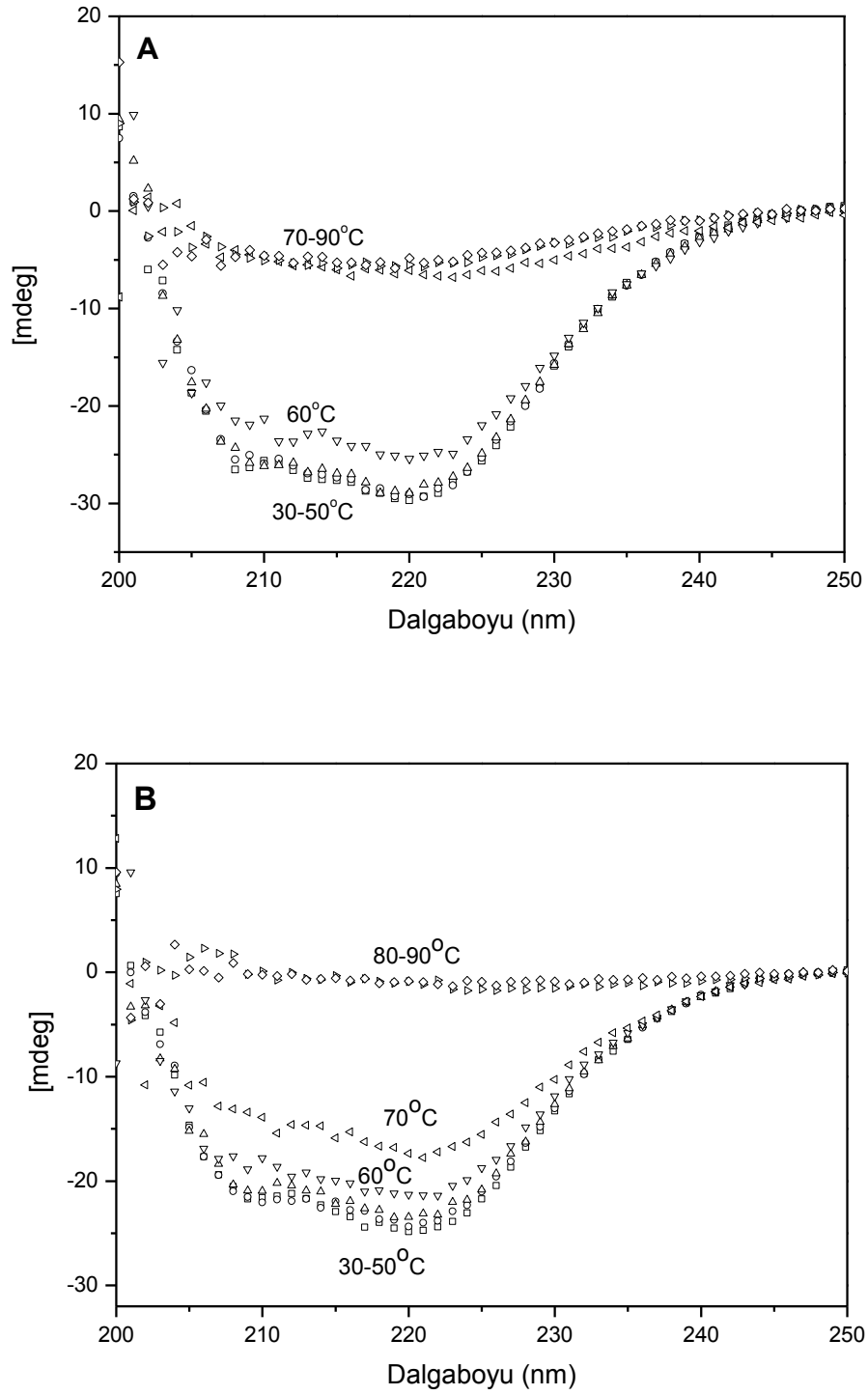
Şekil 3.27. Sadece EDTA+KCl **(A)** veya Ca^{2+} +KCl **(B)** varlığında His₆-lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Ölçümler, sadece 1 mM EDTA+150 mM KCl veya 1 mM EDTA+3 mM Ca^{2+} +150 mM KCl içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponu ve 0.1 mg/mL enzim kullanılarak yapılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.2’de belirtildiği gibidir.



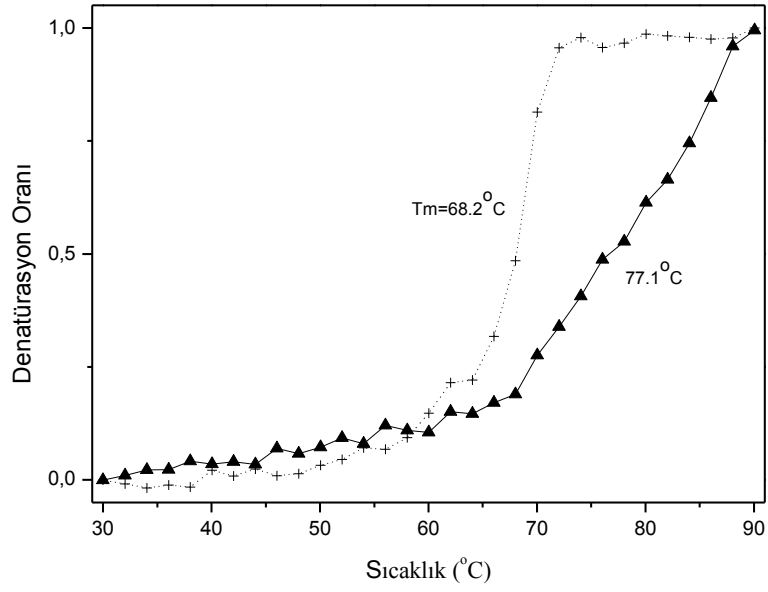
Şekil 3.28. His₆-lipaz'ın sadece EDTA ve KCl tuzu varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği (222 nm). 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+150 mM KCl (☆); 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA (▲). 0.1 mg/mL enzim konsantrasyonunda çalışılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.2'de belirtildiği gibidir.



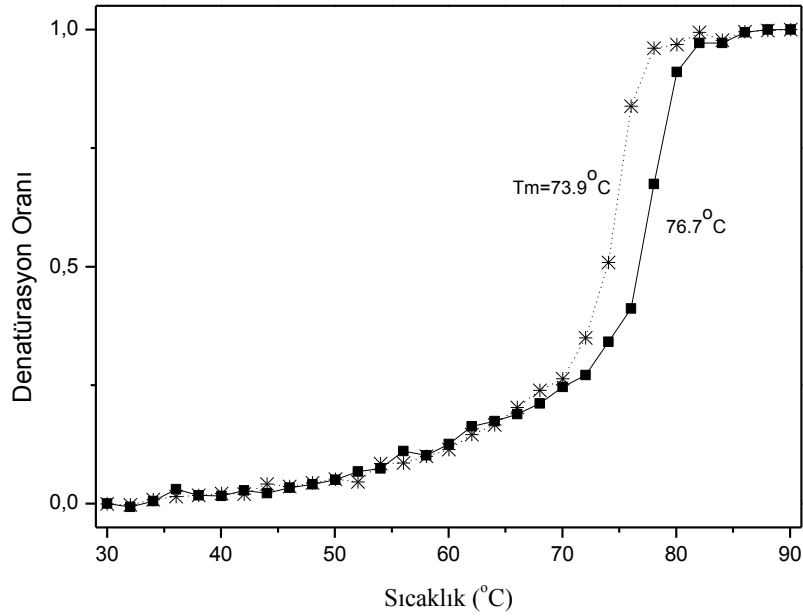
Şekil 3.29. His₆-lipaz'ın Ca²⁺ ve KCl tuzu varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği (222 nm). 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺+150 mM KCl (×); 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺ (■). 0.1 mg/mL enzim konsantrasyonunda çalışılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.2'de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.30. Sadece EDTA+NaCl **(A)** veya Ca^{2+} +NaCl **(B)** varlığında lipazın farklı sıcaklıklarda elde edilen CD spektrumları. Ölçümler, sadece 1 mM EDTA+150 mM NaCl veya 1 mM EDTA+3 mM Ca^{2+} +150 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponu ve 0.1 mg/mL enzim kullanılarak yapılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.2’de belirtildiği gibidir



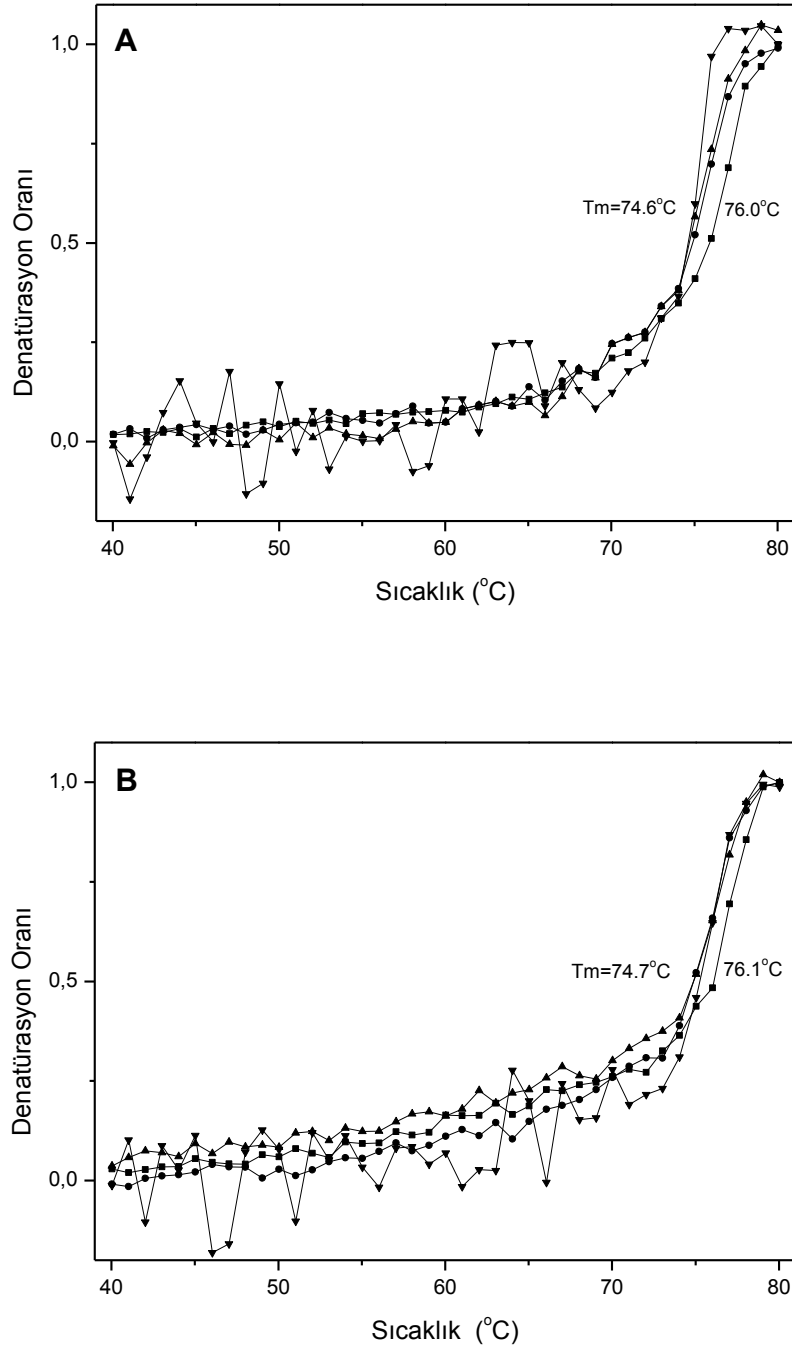
Şekil 3.31. Lipaz'ın sadece EDTA ve NaCl tuzu varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği (222 nm). 50 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+150 mM NaCl (+); 50 mM Tris-HCl+1 mM EDTA (▲). 0.1 mg/mL enzim konsantrasyonunda çalışılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.2'de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.32. Lipaz'ın Ca^{2+} ve NaCl tuzu varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği (222 nm). 50 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+3 mM Ca^{2+} +150 mM NaCl (*); 50 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+3mM Ca^{2+} (■). 0.1 mg/mL enzim konsantrasyonunda çalışılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.2'de belirtildiği gibidir.

3.9.4 Triton X-100 Deterjanının Lipaz Termal Denatürasyonuna Etkisi

Aktivite ölçümleri sonuçlarına göre, Triton X-100 deterjanı His₆-lipaz ve lipaz aktivitesini inhibe etmektedir. His₆-lipaz enziminin serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında, 0.0171 mM, 0.171 mM ve 2 mM olmak üzere 3 farklı deterjan konsantrasyonunda 222 nm’de CD ölçümleri alınarak T_m değerleri bulunmuştur. 0.0171 mM Triton X-100, 2 mM Triton X-100 ve deterjansız sadece serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında hesaplanan T_m değerleri eşit olup, 74.6 °C’dir. Aktivite ölçümlerinde de, ani aktivite artmasına sebep olan 0.171 mM Triton X-100 deterjan ilavesi (bkz Bölüm 3.8), enzimin termal denatürasyon sıcaklığını da değiştirerek 76.0 °C’ye arttırmıştır (Şekil 3.33A). Lipaz enzimi içinde aynı ölçümler yapıldığında, 0.0171 mM Triton X-100, 2 mM Triton X-100 ve deterjansız sadece serbest 2 mM Ca²⁺ varlığında hesaplanan T_m değerleri birbirine eşit olup, 74.7 °C’dir. His₆-lipazda da olduğu gibi, 0.171 mM Triton X-100 deterjanı ilavesi sonucunda termal denatürasyon sıcaklığı 76.1 °C’ye yükselmiştir (Şekil 3.33B).



Şekil 3.33. His₆-lipaz (A) ve lipaz'ın (B) sadece EDTA+Triton X-100 veya Ca²⁺+Triton X-100 varlığında Boltzman termal denatürasyon grafiği (222 nm). 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+ 3 mM Ca²⁺ (▲); 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺+0.0171 mM Triton X-100 (●); 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺+0.171 mM Triton X-100 (■); 10 mM Tris-HCl+1 mM EDTA+3 mM Ca²⁺+2 mM Triton X-100 (▼). 0.07 mg/ mL protein kullanılmıştır. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.7.3'de belirtildiği gibidir.

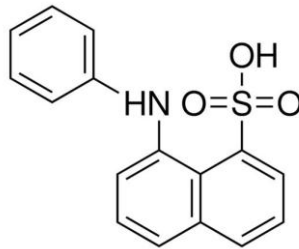
3.10 Ca^{2+} - ve Zn^{2+} -lipaz Etkileşimlerinin Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi

Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının His₆-lipaz ve lipazın yapısına etkisini Sirküler Dikroizm ile incelendi. Kalsiyumun enzim yapı stabilitesini arttırdığı, çinko iyonunun enzimin yapısının bozulmasına sebep olduğu sonucuna varıldı (bkz Bölüm 3.9). Sirküler Dikroizm ile elde edilen bu sonuçlar Floresans Spektroskopisi ile desteklendi.

3.10.1 Ca^{2+} İyonunun Lipazın Emisyon Spektrumuna Etkisi

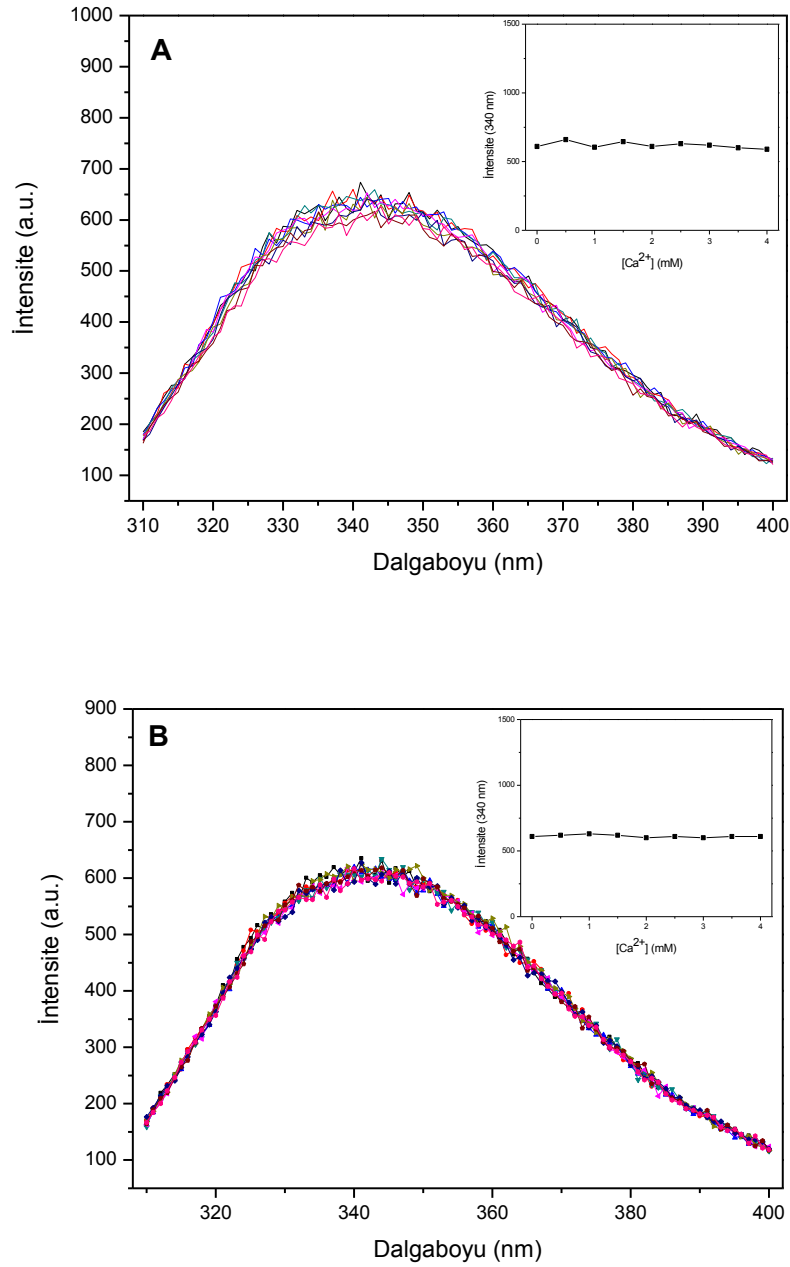
His₆-lipaz ve lipaz'ın yapısına Ca^{2+} 'un etkisi, enzimdeki triptofan rezidülerinin floresans emisyonu analizi yapılarak incelendi. Ca^{2+} iyonu konsantrasyonu artırılarak enzimin floresans emisyon intensiteleri ölçüldü. His₆-lipaz ve lipaz için, Ca^{2+} iyonu ilavesi triptofan emisyonuna etki etmediği sonucuna ulaşıldı (Şekil 3.35).

8-anilinonaftalin-1-sülfonik asit (ANS), yapısında hem sülfonik asit hem de amin grupları içerir. ANS proteinlerin hidrofobik rezidüleriyle etkileşime girerek floresans spektroskopisinde yapısal değişikliği gösteren bir prob olarak kullanılmaktadır [69].

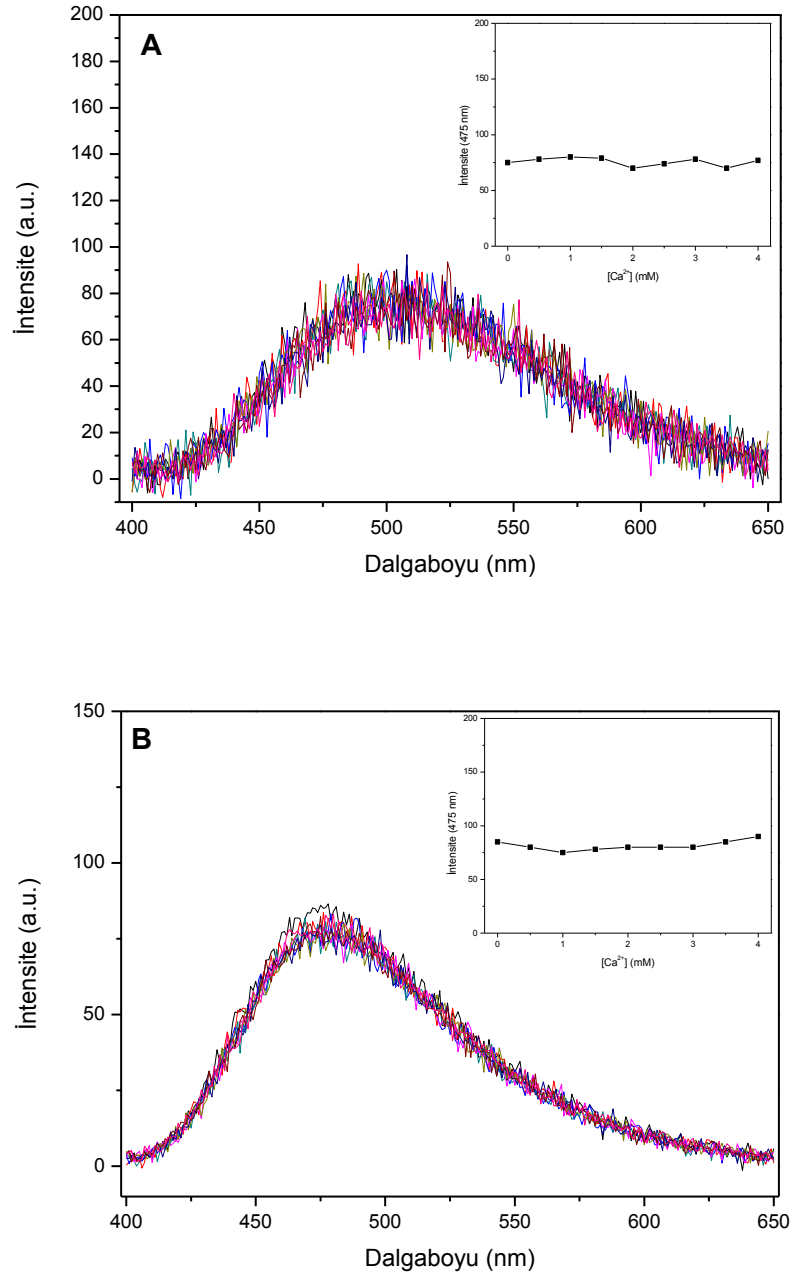


Şekil 3.34. 8-anilinonaftalin-1-sülfonik asit

Çalışmamızda aynı zamanda, ANS'nin floresans spektroskopisindeki prob özelliğinden faydalanarak, metal iyonu varlığında enzimin yapısında meydana gelebilecek olası bir değişimde, enzimin hidrofobik grupları ile ANS arasındaki etkileşim artacağından, ANS emisyonundaki değişim incelendi. Ca^{2+} iyonu varlığında ANS emisyonunda değişim olmadığı için, enzimin yapısında herhangi bir değişim meydana gelmediği sonucuna varıldı (Şekil 3.36).



Şekil 3.35. Ca^{2+} varlığında His₆-lipaz **(A)** ve lipaz **(B)** enzimlerinin triptofan emisyon spektrumu. Floresans ölçümleri için 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisinde ölçülmüştür. Excitation dalgaboyu 295 nm ve protein konsantrasyonu 0.038 mg/mL kullanılmıştır. İçteki grafik; artan kalsiyum konsantrasyonuna (0-4 mM) karşı 340 nm'deki emisyon grafiği. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.8'de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.36. Farklı Ca^{2+} konsantrasyonlarında His₆-lipaz **(A)** ve lipazla **(B)** elde edilen ANS emisyon spektrumları. Floresans ölçümleri için 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi ve 50 μM ANS kullanılmıştır. Kontrol sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisinde ölçülmüştür. Excitation dalgaboyu 350 nm ve protein konsantrasyonu 0.038 mg/mL kullanılmıştır. İçteki grafik; artan kalsiyum konsantrasyonuna (0-4 mM) karşı 475 nm'deki emisyon grafiği. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.8'de belirtildiği gibidir.

3.10.2 Çinko-Lipaz Etkileşimin Floresans Spektrofotometre Yöntemiyle İncelenmesi

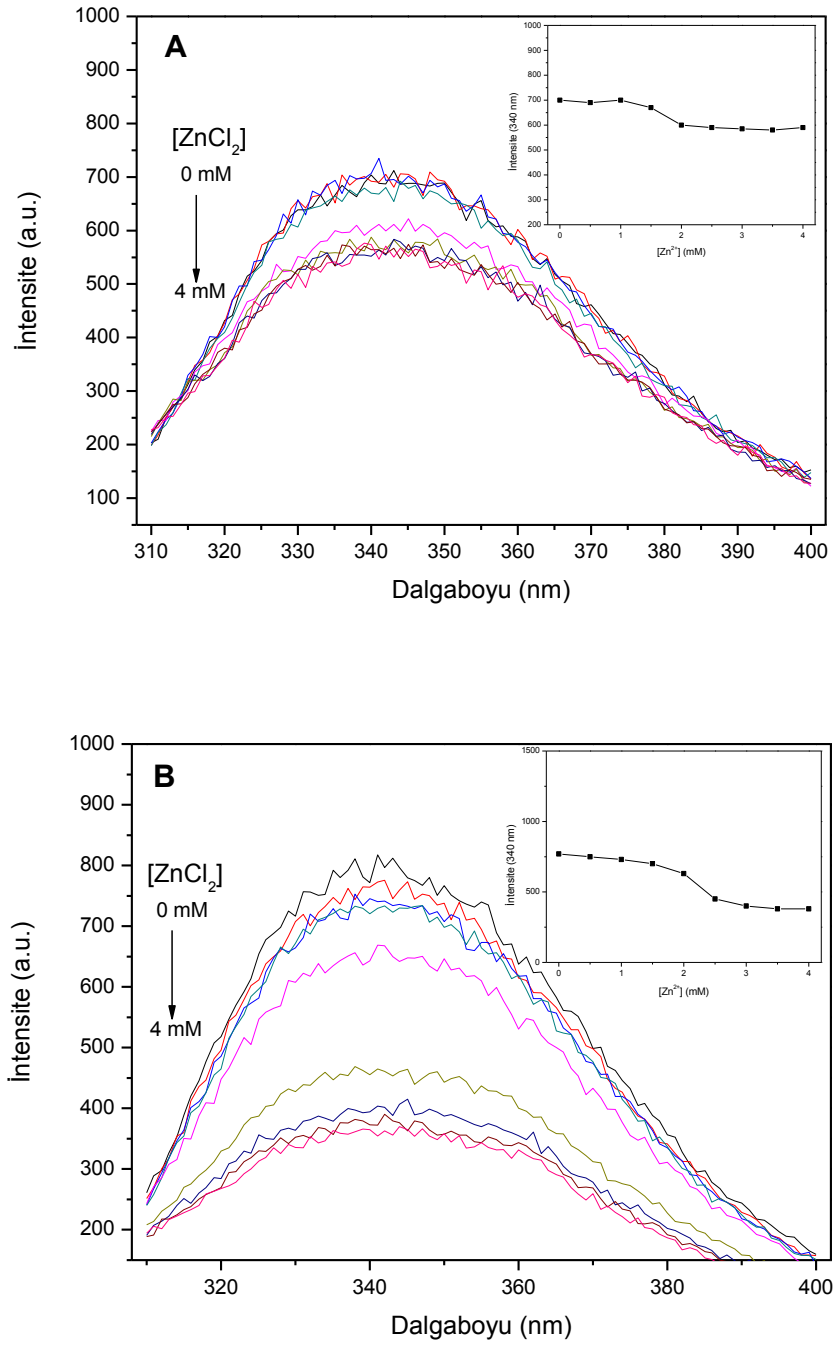
His₆-lipaz ve lipaz'ın yapısına artan Zn²⁺ iyonu konsantrasyonunun etkisi, Ca²⁺ iyonu için yapılan çalışmadaki gibi tekrarlanarak enzimdeki triptofan rezidülerinin floresans emisyonu ölçüldü. Zn²⁺ iyonu konsantrasyonu arttırılarak enzimin triptofan emisyon intensitesindeki değişim incelendi.

His₆-lipaz için, 0-1.5 mM konsantrasyonları arasında Zn²⁺ iyonu ilavesi triptofan emisyonuna etki etmemektedir (Şekil 3.37A). Fakat 2 mM Zn²⁺ iyonu eklendiğinde, hafif bulanıklık oluşup, intensitenin azaldığı görülmüştür. Bu sonucu desteklemek için bir sonraki aşamada, aynı deneyler ANS emisyonu ile de tekrarlanmıştır. 1.5 mM'a kadar Zn²⁺'nin artan konsantrasyonlarında ilavesi ile aynı ANS emisyonları ölçülmüştür. 2 mM Zn²⁺ ilave edildikten sonra açık bir şekilde ANS emisyonu artmaktadır. Aynı zamanda, 1 mM EDTA üzerine 2 mM Zn²⁺ ilave edildikten sonraki spektrumların, maksimum intensite değerlerine karşı gelen dalgaboyları kıyaslandığında bariz bir şekilde gözlenen kayma, enzimin yapısal bir değişime uğradığının da ayrı bir kanıtıdır (Şekil 3.37A).

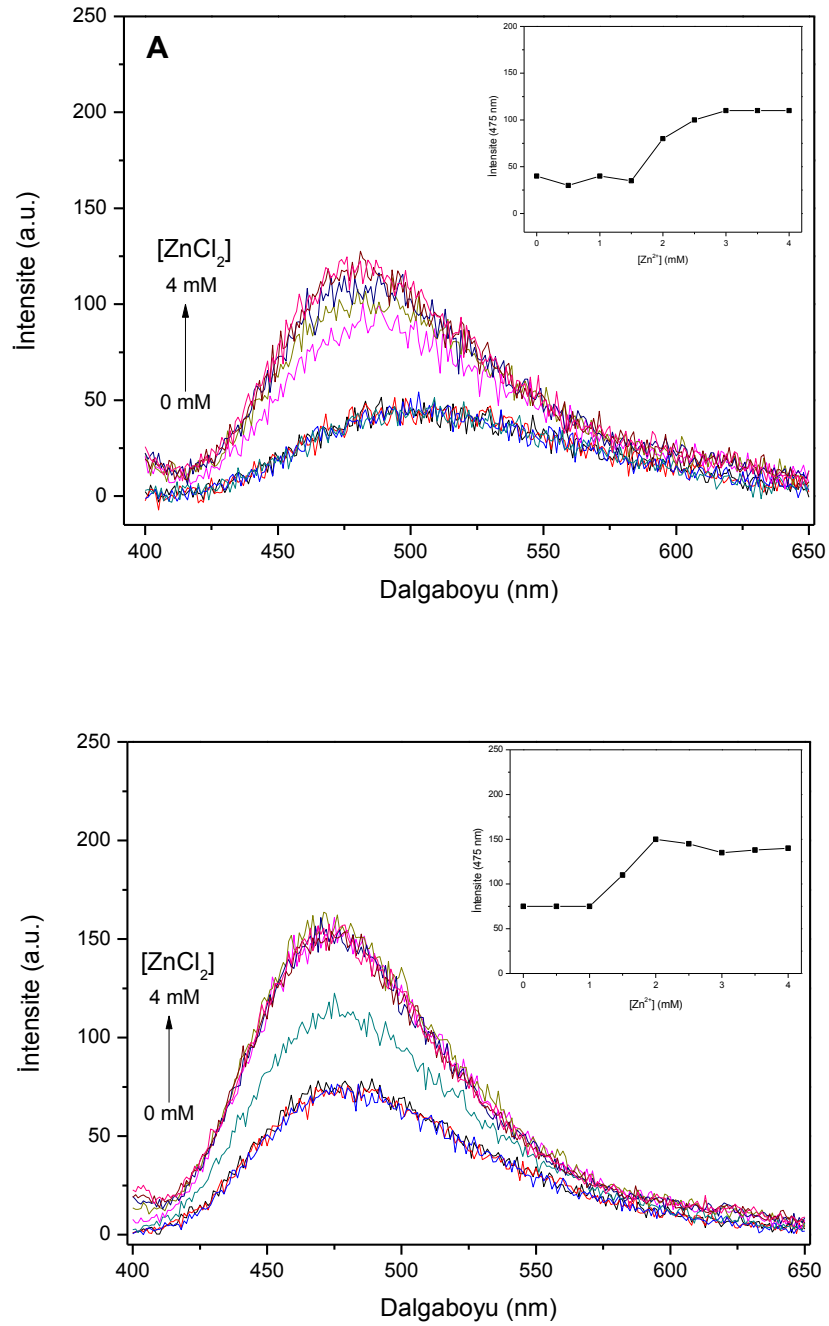
Çinko iyonu varlığında meydana gelen bu yapısal bozulmanın, enzimin yapı stabilitesine katkıda bulunan kalsiyum iyonu varlığında da etkisini incelemek istenildi. Bu amaçla, ilk olarak ortamda ANS olmaksızın triptofan rezidülerinin emisyonu ölçülerek serbest 3 mM Ca²⁺ (1 mM EDTA+4 mM Ca²⁺) varlığında yapılan çalışmada, 0.5 mM'lık artışlarla Zn²⁺ iyonu konsantrasyonu arttırıldığında, 1.5 mM Zn²⁺ iyonu enzimin yapısının bozulmasına neden olmuştur. ANS varlığında aynı deney yapıldığında, yine 1.5 mM Zn²⁺ iyonu ilavesi enzim yapısının bozulmasına neden olmaktadır (Şekil 3.38A).

His₆-lipaz için yapılan bu floresans spektrofotometre çalışmalarının hepsi, lipaz enzimi için de tekrarlanmıştır. 2 mM Zn²⁺ eklendiğinde His₆-lipaz'daki gibi bulanıklaşma olmuştur. Analizi yapıldığında da intensitenin azaldığı görülmüştür. Ortamda ANS olduğunda da yapılan deneylerde eklenen 2 mM Zn²⁺ iyonu ile yapıdaki değişim intensite artışlarıyla da görülmüştür (Şekil 3.37B). Yapı stabilitesine katkı sağladığı bilinen kalsiyumun çinko varlığında, enzim yapısında

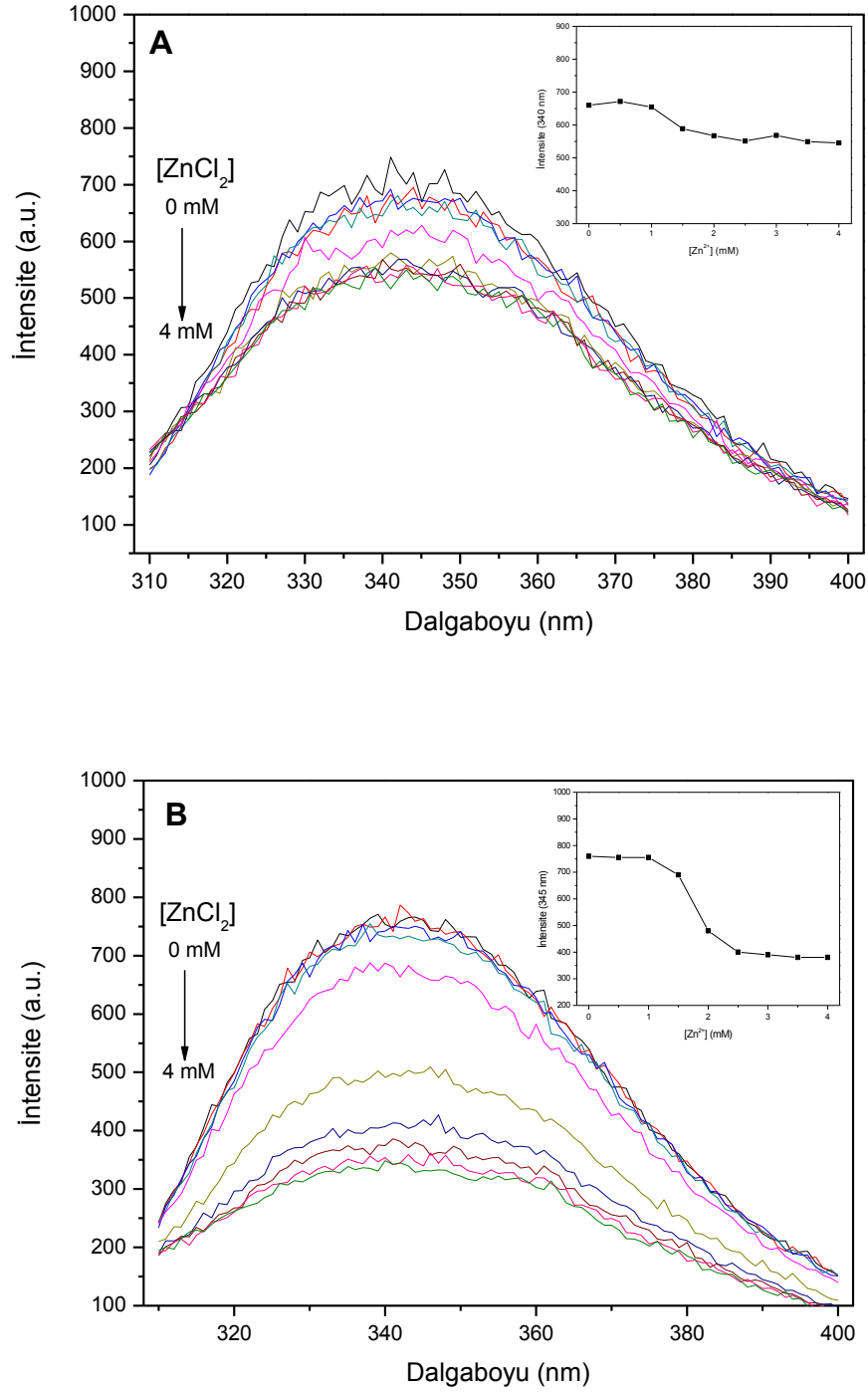
meydana gelen değişiklikten dolayı, stabilizeye olan katkısının yok olduğu, serbest 3 mM Ca^{2+} iyonu varlığında artan Zn^{2+} iyonu konsantrasyonuyla yapılan çalışmada da açık bir şekilde görölmüştür. ANS varlığında da tekrarlanan bu çalışma sonucunda, serbest 3 mM Ca^{2+} üzerine 1.5 mM Zn^{2+} eklendiğinde enzim yapısındaki bozulma intensite artışıyla görölmüştür (Şekil 3.38B).



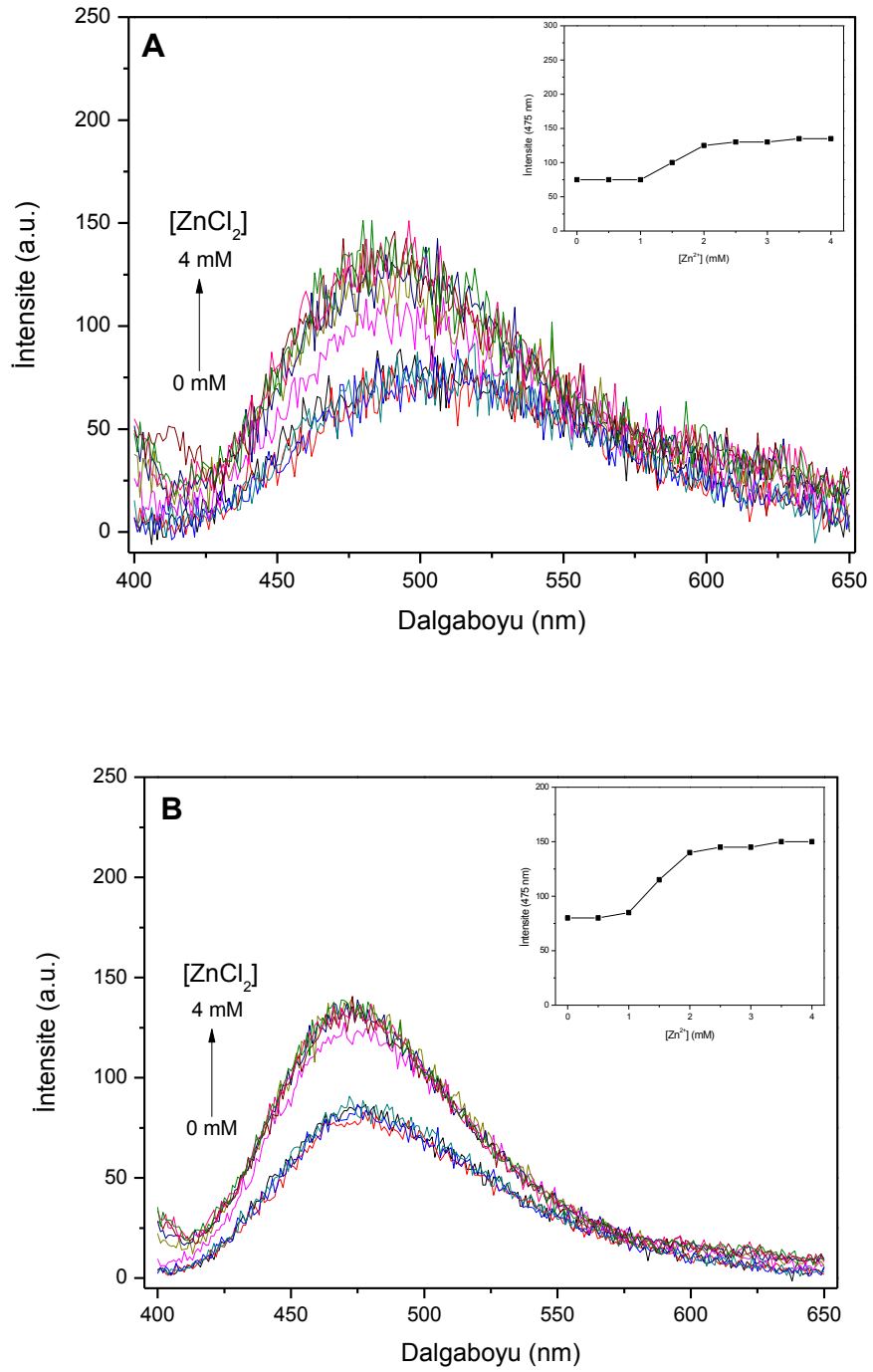
Şekil 3.37. Artan Zn^{2+} konsantrasyonlarında His₆-lipaz **(A)** ve lipaz **(B)** enzimlerinin triptofan emisyon spektrumu. Floresans ölçümleri için 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ve 1 mM EDTA tampon çözeltisi kullanılmıştır. “Excitation” dalgaboyu 295 nm ve protein konsantrasyonu 0.038 mg/mL kullanılmıştır. İçteki grafik; artan çinko konsantrasyonuna (0-4 mM) karşı 340 nm’deki emisyon grafiği. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.8’de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.38. Farklı Zn^{2+} konsantrasyonlarında His₆-lipaz **(A)** ve lipazla **(B)** elde edilen ANS emisyon spektrumları. Floresans ölçümleri için 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi ve 50 μ M ANS kullanılmıştır. Kontrol sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisinde ölçülmüştür. Excitation dalgaboyu 350 nm ve protein konsantrasyonu 0.038 mg/mL kullanılmıştır. İçteki grafik; artan çinko konsantrasyonuna (0-4 mM) karşı 475 nm'deki emisyon grafiği. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.8'de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.39. Ca^{2+} iyonu varlığında farklı Zn^{2+} konsantrasyonlarında His₆-lipaz **(A)** ve lipaz **(B)** ile elde edilen triptofan emisyon spektrumu. Floresans ölçümleri için serbest 3 mM Ca^{2+} içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisinde ölçülmüştür. “Excitation” dalgaboyu 295 nm ve protein konsantrasyonu 0.038 mg/mL kullanılmıştır. İçteki grafik; artan çinko konsantrasyonuna (0-4 mM) karşı 340 nm’deki emisyon grafiği. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.8’de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.40. Ca^{2+} iyonu varlığında farklı Zn^{2+} konsantrasyonlarında His₆-lipaz **(A)** ve lipaz ile **(B)** elde edilen ANS emisyon spektrumları. Floresans ölçümleri için serbest 3 mM Ca^{2+} içeren 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tampon çözeltisi ve 50 μM ANS kullanılmıştır. Kontrol sadece 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisinde ölçülmüştür. Excitation dalgaboyu 350 nm ve protein konsantrasyonu 0.038 mg/mL kullanılmıştır. İçteki grafik; artan kalsiyum konsantrasyonuna (0-4 mM) karşı 475 nm'deki emisyon grafiği. Diğer deney şartları Bölüm 2.2.8'de belirtildiği gibidir.

3.11 Tripsinle Kesilen Lipazın MALDI-TOF/Kütle Spektrometre (MS) ile Peptit Analizi

Protein saflaştırması sırasında kesilen His₆-lipaz ve lipazın nereden kesildiğini bulmak amacıyla Tripsin enzimi ile protein peptit parçalarına ayrıldı (Bölüm 2.2.9). Elde edilen peptitler MALDI-TOF/Kütle spektrometre (MS) ile analiz edildi (Ek-2 ve Ek-3). Bu işlem 3 defa tekrarlandı ve elde edilen peptitlerin moleküler ağırlığı 6000 Da'dan düşüktü. Bu sonuçlar Tripsin kesiminin etkili olduğunu göstermektedir. Parçalar, teorik olarak beklenen parçalarla karşılaştırılarak bulundu (Tablo 3.2 ve Tablo 3.4). Bulunan parçaların yerlerini tayin ettikten sonra, hem His₆-lipaz hem de lipazın C-ucundaki "LAEQSLASLQP" aminoasit dizisinin olmadığı sonucuna ulaşıldı (Tablo 3.3 ve Tablo 3.5).

Tablo 3.2. Tripsin ile kesilen His₆-lipazın MALDI-TOF/MS ile peptit analiz sonucu.

Kütle [M+H] ⁺	Pozisyon	Peptit Dizisi
1899.8892	1-17	MGSSHHHHHSSGLVPR
685.3376	18-24	GSHAASR
1823.9551	25-41	ANDAPIVLLHGFTGWGR
2692.3340	25-48	ANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFK
3410.6891	25-54	ANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGVR
887.3967	42-48	EEMFGFK
1605.7518	42-54	EEMFGFKYWGGVR
3166.4475	42-67	EEMFGFKYWGGVRGDIEQWLNDNGYR
737.3729	49-54	YWGGVR
4745.3177	68-112	TYTLAVGPLSSNWDACEAYAQLVGGTVDYGAHAACHGHARFGR
3084.4968	83-112	ACEAYAQLVGGTVDYGAHAACHGHARFGR
3945.1443	105-140	HGHARFGRTPGLLPELKRGGRIHIIAHSQGGQTAR
379.2088	110-112	FGR
1490.8365	110-122	FGRTYPGLLPELK
1130.6455	113-122	TYPGLLPELK
1556.8907	113-126	TYPGLLPELKRGGGR
1915.0481	123-140	RGRIHIIAHSQGGQTAR
3835.9620	124-158	GGRIHIIAHSQGGQTARMLVSLLENGSQEEREYAK
1488.8029	127-140	IHHIIAHSQGGQTAR
1604.7948	141-154	MLVSLLENGSQEER
2096.0328	141-158	MLVSLLENGSQEEREYAK
5211.5996	159-205	AHNVSLSPLEGGHHFVLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFDTRFFDLQK
3354.7116	206-235	AVLEAAAVASNAPYTSEIYDFKLDQWGLRR

Tablo 3.2. Devamı

Kütle [M+H]⁺	Pozisyon	Peptit Dizisi
4848.3328	206-247	AVLEAAAVASNAPYTSEIYDFKLDQWGLRREPGESFDHYFER
887.4733	228-234	LDQWGLR
1043.5745	228-235	LDQWGLRR
2537.1956	228-247	LDQWGLRREPGESFDHYFER
2778.3746	228-249	LDQWGLRREPGESFDHYFERLK
2934.4757	228-250	LDQWGLRREPGESFDHYFERLKR
1668.7401	235-247	REPGESFDHYFER
1512.6390	236-247	EPGESFDHYFER
1753.8180	236-249	EPGESFDHYFERLK
416.2980	248-250	LKR
175.1189	250-250	R
1376.6917	250-261	RSPVWTSTD TAR
3177.5963	250-277	RSPVWTSTD TARYDLSVPGAETLNQWVK
1635.7649	278-291	ASPNTYYLSFSTER
439.2299	292-294	TYR
3153.5172*	295-323	GALTGNYYPELGMNAFSAIVCAPFLGSYR
2766.3515	324-349	NAALGIDSHWLENDGIVNTISMNGPK
2922.4526	324-350	NAALGIDSHWLENDGIVNTISMNGPKR
1761.9606	350-365	RGSSDRIVPYDGALKK
4916.4423	350-393	RGSSDRIVPYDGALKKGVWNDMGTYNV DHLEIIGVDPNPSFDIR
1605.8594	351-365	GSSDRIVPYDGALKK
4760.3412	351-393	GSSDRIVPYDGALKKGVWNDMGTYNV DHLEIIGVDPNPSFDIR
1103.6459	356-365	IVPYDGALKK
4258.1277	356-393	IVPYDGALKKGVWNDMGTYNV DHLEIIGVDPNPSFDIR
4908.4817	356-398	IVPYDGALKKGVWNDMGTYN VDHLEIIGVDPNPSFDIRAFYLR
3173.4996	366-393	GVWNDMGTYNV DHLEIIGVDPNPSFDIR
3823.8536	366-398	GVWNDMGTYNV DHLEIIGVDPNPSFDIRAFYLR
669.3718	394-398	AFYLR

* : Sistein rezidülerinde indirgenme olduğunda elde edilen peptit kütesidir.

Tablo 3.3. His₆-lipazın MALDI-TOF/MS ile bulunan peptit parçaları. Belirlenen peptit parçaları kırmızı, bulunamayan peptit parçaları ise siyahla gösterilmiştir.

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	AASRANDAPI	VLLHGFTGWG	REEMFGFKYW	GGVRGDIEQW
70	80	90	100	110	120
LNDNGYRTYT	LAVGPLSSNW	DRACEAYAQL	VGGTVDYGAA	HAAKHGHAFF	GRTYPGLLPE
130	140	150	160	170	180
LKRGGRIHII	AHSQGGQTAR	MLVSLENGS	QEEREYAKAH	NVLSPLFEG	GHHFVLSVTT
190	200	210	220	230	240
IATPHDGTTL	VNMVDFTDRF	FDLQKAVLEA	AAVASNAPYT	SEIYDFKLDQ	WGLRREPGE
250	260	270	280	290	300
FDHYFERLKR	SPVWTSTDTA	RYDLSVPGAE	TLNQWVKASP	NTYYLSFSTE	RTYRGALTGN
310	320	330	340	350	360
YYPELGMNAF	SAIVCAPFLG	SYRNAALGID	SHWLENDGIV	NTISMNGPKR	GSSDRIVPYD
370	380	390	400		
GALKKGVWND	MGTYNVDHLE	IIGVDPNPFS	DIRAFYLR	LA	EQLASLQP

Tablo 3.4. Tripsin ile kesilen lipazın MALDI-TOF/MS ile peptit analizi sonucu.

Kütle [M+H] ⁺	Pozisyon	Peptit Dizisi
404.4460	1-4	AASR
3168.4689	22-47	EEMFGFKYWGGVRGDIEQWLNDNGYR
4830.3034	22-62	EEMFGFKYWGGVRGDIEQWLNDNGYRTYTLAVGPLSSNWDR
577.6231	85-89	HGHAR
379.4387	90-92	FGR
1131.3569	93-102	TYPGLLPELK
445.5015	103-106	RGGR
1557.8357	93-106	TYPGLLPELKRGGR
1759.9680	104-120	GGRIHIIAHSQGGQTAR
1605.8029	121-134	MLVSLENGSQEER
5214.8638	139-185	AHNVLSPLFEGGHHFVLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFTDRFFDLQK
797.9287	180-185	FFDLQK
3200.5745	186-214	AVLEAAAVASNAPYTSEIYDFKLDQWGLR
3356.7620	186-215	AVLEAAAVASNAPYTSEIYDFKLDQWGLRR
1044.2009	208-215	LDQWGLRR
2780.0741	208-229	LDQWGLRREPGESEFDHYFERLK

Tablo 3.4. Devamı

Kütle [M+H] ⁺	Pozisyon	Peptit Dizisi
1513.5624	216-227	EPGESFDHYFER
416.5437	228-230	LKR
1221.3118	231-241	SPVWTSTDTR
1821.0393	242-257	YDLSVPGAETLNQWVK
1636.7578	258-271	ASPNTYYLSFSTER
3155.6126*	275-303	GALTGNYYPELGMNAFSAIVCAPFLGSYR
2768.0727	304-329	NAALGIDSHWLENDGIVNTISMNGPK
2924.2602	304-330	NAALGIDSHWLENDGIVNTISMNGPKR
677.6946	330-335	RGSSDR
1763.0062	330-345	RGSSDRIVPYDGALKK
521.5071	331-335	GSSDR
976.1602	336-344	IVPYDGALK
1104.3343	336-345	IVPYDGALKK
3303.6729	345-373	KGVWNDMGTYNVDHLEIIGVDPNPSFDIR
3175.4988	346-373	GVWNDMGTYNVDHLEIIGVDPNPSFDIR
669.8010	374-378	AFYLR

* : Sistein rezidülerinde indirgenme olduğunda elde edilen peptit kütesidir.

Tablo 3.5. Lipazın MALDI-TOF/MS ile bulunan peptit parçaları. Belirlenen peptit parçaları kırmızı, bulunamayan peptit parçaları ise siyahla gösterilmiştir.

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
AASRANDAPI	VLLHGFTGWG	REEMFGFKYW	GGVRGDIEQW	LNDNGYRTYT	LAVGPLSSNW
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DRACEAYAQL	VGGTVDYGAA	HAAKHGHRF	GRTYPGLLPE	LKRGGRIHII	AHSQGGQTAR
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
MLVSLLENGS	QEEREYAKAH	NVSLSPLEFEG	GHHFVLSVTT	IATPHDGTTL	VNMVDFTDRE
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
FDLQKAVLEA	AAVASNAPYT	SEIYDFKLDQ	WGLRREPGE	FDHYFERLKR	SPVWTSTDTR
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
RYDLSVPGA	TLNQWVKASP	NTYYLSFSTE	RTYRGALTGN	YPELGMNAF	SAIVCAPFLG
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
SYRNAALGID	SHWLENDGIV	NTISMNGPKR	GSSDRIVPYD	GALKKGVWND	MGTYNVDHLE
<u>370</u>	<u>380</u>				
IIGVDPNPSF	DIRAFYLR	EQLASLQP			

GENEL SONUÇLAR

Bu çalışmada bazı metal iyonların ve surfaktanların termofilik özellik gösteren rekombinant *G. kaustophilus* lipaz aktivitesine ve yapısal stabilitesine etkisi incelendi. Daha önce bu laboratuarda klonlanan ve PMSF varlığında saflaştırılan *G. kaustophilus* lipazın çok düşük aktiviteye sahip olduğunu ve bunun PMSF inhibisyonundan kaynaklandığı belirlendi (bkz Bölüm 3.3). PMSF, serin proteazların aktif bölgesindeki serin rezidüsüne kovalent olarak bağlanabildiğinden dolayı, Ser-His-Asp katalik üçlü bölgesine sahip lipaz enzimleri dönüşümsüz (irreversible) olarak inhibe etmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, 1 mM PMSF varlığında *G. kaustophilus* lipaz 30 dakika inkübe edildiğinde, aktivitesinin %50'sini kaybettiğini göstermektedir. *G. kaustophilus* lipaz ile yüksek dizi benzerliğine sahip olan L1, P1 ve T1 lipazlar üzerine PMSF kuvvetli inhibitör etkisine sahipken, BTL2 lipaz için böyle bir durum söz konusu değildir [40]. 1 mM PMSF varlığında BTL2 lipaz 30 dakika inkübe edildiğinde aktivitesinde değişme olmamıştır [41]. L1 lipaz ise 1 mM PMSF varlığında 10 ve 30 dakika inkübe edildiğinde sırasıyla %10 ve %23 inhibisyona uğramıştır [40]. P1 lipaz, 1 mM PMSF ile inkübe edildikten 10 dakika sonra %89, 30 dakika sonra %98 inhibisyona uğramıştır [58]. 5 mM PMSF ile 30 dakika inkübasyon sonrası ölçülen T1 lipaz ise %89 inhibe olmuştur [64]. I.5 sınıfına ait bu lipazların PMSF'ye karşı farklı etki göstermesinin nedeni tam olarak anlaşılamamaktadır. Proteaz inhibitörü olan PMSF kullanılmadan yapılan saflaştırmanın bir diğer sonucu olarakta, teorik olarak beklenenden daha kısa, moleküler ağırlığı ~41 kDa (teorik ~43 kDa) olan ve lipaz aktivitesi gösteren bir protein elde edildi. MALDI-TOF/MS ile yapılan analizlerde C-ucunda bulunan "LAEQLASLQP" peptidin (MW: 1069 kDa) eksik olduğu tespit edildi.

Ca²⁺ ve Zn²⁺ Etkisi

X-ray yapısı bilinen *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2) [27, 28], *Bacillus stearothermophilus* lipaz (L1 ve P1) [7, 8, 26, 34], *Geobacillus stearothermophilus* lipaz (T1) [65] enzimlerinin, kalsiyum ve çinko iyonlarına bağlandığı bölgeler aydınlatılmıştır. *G. kaustophilus* lipaz'a >%90'dan fazla dizi benzerliğine sahip olan I.5 sınıfına ait bu lipazlara, Ca²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının bağlanması enzimin yapısal kararlılığı için gerekli olduğu belirtilmiştir [7, 8, 34]. Zn²⁺ iyonu içinse her ne kadar

enzimin yapısal kararlılığı için gerekliliği belirtilmiş olsa da [8, 27], bazı yayınlarda Zn^{2+} iyonunun enzim aktivitesini inhibe ettiği de rapor edilmiştir [64, 58]. *G. kaustophilus* lipaz ile Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonu varlığında yapılan aktivite ölçümlerinde serbest 1 mM Ca^{2+} enzim aktivitesini %150 arttırırken (4100 unit/mg), serbest 1 mM Zn^{2+} enzim %75 oranında inhibe etmiştir (175 unit/mg) ve artan Zn^{2+} konsantrasyonlarında da agregasyona uğramaktadır. L1, P1 ve T1 enzimleriyle yapılan çalışmalarda ise, kontrol olarak EDTA kullanılmadığı için (EDTA ortamdaki olası metal iyonlarını tutmaktadır), Ca^{2+} 'un bu lipaz aktiviteleri üzerine etkisi çok düşük bulunmuştur [40, 64]. 1 mM Zn^{2+} iyonu varlığında P1 ve T1 lipazlar, sırasıyla %65 ve %78 inhibe olmaktadır [40, 64]. Bunun yanı sıra, T1 lipaz da, *G. kaustophilus* lipaz'da olduğu gibi Zn^{2+} varlığında agregasyon oluşumundan söz ederek, sebebini Zn^{2+} 'nin toksik etkisi olarak açıklamaktadır [64].

G. kaustophilus lipaz ile yapılan Sirküler Dikroizm çalışmaları ile lipazın sekonder yapısına Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının etkisi de incelendi. Sadece EDTA varlığında (metalsiz) 70 °C'de sekonder yapısını kaybeden enzim, Ca^{2+} varlığında 80 °C'ye kadar yapısını korumaktadır. Ca^{2+} 'un yapı stabilitesine olan katkısı termal denatürasyon çalışmalarıyla da desteklenmiştir. Sadece EDTA varlığında 76.7 °C olan T_m değeri, Ca^{2+} iyonu varlığında 77.1 °C'ye yükselmiştir. Zn^{2+} iyonunun aktivite üzerine olan negatif etkisi, Sirküler Dikroizm sonuçlarıyla da desteklenmiştir. Zn^{2+} iyonu *G. kaustophilus* lipaz stabilitesini arttırmamış, aksine azaltmıştır. Sadece EDTA varlığında 70 °C'de bozulan lipazın sekonder yapısı, serbest 1 mM Zn^{2+} varlığında 50 °C'de tamamen bozulmaktadır.

Sirküler Dikroizm ölçümlerinin yanısıra, *G. kaustophilus* lipaz'ın Ca^{2+} ve Zn^{2+} varlığında triptofan ve ANS emisyonları da ölçülerek, intensitedeki değişim incelendiğinde, Ca^{2+} varlığında enzimin triptofan ve ANS emisyonları değişmeyerek, yapıda bozulma meydana gelmediği görülmüştür. Artan Zn^{2+} konsantrasyonlarında ise yapı bozulmasıyla triptofan emisyonu azalmakta ve enzim agregate olmaktadır. ANS emisyon ölçümlerinde de, Zn^{2+} konsantrasyonu arttırılmasına paralel olarak ANS emisyon intensitesi de artmıştır. Bütün bu sonuçlar, Zn^{2+} 'nin lipazın yapısını bozarak denatürasyona neden olduğunu göstermektedir.

Surfaktanların Etkisi

Surfaktanlar su-yag arayüzeyini arttırıp, stabiliteyi ve çözünürlüğü arttırdıklarından dolayı lipaz katalizörlü reaksiyonlarda düşük konsantrasyonlarda sıkça kullanılırlar [27]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Triton X-100 *G. kaustophilus* lipaz aktivitesi üzerine değişken etki göstermektedir. 0-0.03 mM aralığında Triton X-100 lipaz aktivitesini %70, 0.03-0.17 mM aralığında ise enzimi %75 inhibe etmektedir. Triton X-100 konsantrasyonu daha da arttırıldığında enzim tekrar inhibe olmakta ve 17.1 mM'da ise aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Aktivite de gözlenen bu düzensizlik, Triton X-100 varlığında yaptığımız Sirküler Dikroizm ölçümlerinde de görülmüştür. 0.03 ve 0.0171 mM Triton X-100 varlığında ölçülen T_m değerleri aynı olup 74.7 C'dir. Ani aktivite artışı gözlenen 0.171 mM Triton X-100 varlığında ise T_m değeri 76.1 C'ye artmıştır. *G. kaustophilus* lipaz ile yüksek aminoasit dizi benzerliğine sahip BTL2 ve P1 lipaz, %0.1 (1.71 mM) Triton X-100 varlığında yüksek aktivite göstermektedir [41, 58]. Lipazın bir diğer non-iyonik deterjan olan Tween deterjanlarıyla yapılan aktivite ölçümlerinde de, *G. kaustophilus* lipaz da kuvvetli inhibisyona uğramaktadır. BTL2 ve P1 lipazda aynı şekilde inhibe olmakta [40, 58], T1 lipaz ise aksine %88 aktive olmaktadır [64].

KAYNAKÇA

- [1] Arpigny J.L, Jaeger K.E, (1999) “Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties” *Biochemical Journal*, **343**,177-183.
- [2] Derewenda Z.S, Sharp A.M, (1993) “News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases” *Trends in Biochemical Sci.*, **18**, 20–25.
- [3] Secundo F, Carrea G, Tarabiono C, Gatti-Lafranconi P, Brocca S, Lotti M, Jaeger K.E, Puls M, Eggert T, (2006) “The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity” *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **39**, 166–170.
- [4] Mingarro I, Abad C, Braco L, (1995) “Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 3308–3312.
- [5] González-Navarro H, Abad C., (2001) “The closed/open model for lipase activation. Addressing intermediate active forms of fungal enzymes by trapping of conformers in water-restricted environments” *Biochemistry*, **40**, 3174–3183.
- [6] Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Ortiz C., Segura R.L., Mateo C., Fuentes M., Hermoso J., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M., (2005) “Conformational engineering of lipases via directed immobilization improving the resolution of chiral drugs” *Med. Chem. Rev.*, **2**, 369–378.
- [7] Tyndall J.D.A., Sinchaikul S., Fothergill-Gilmore L.A., Taylor P., Walkinshaw M.D., (2002) “Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1” *J. Mol. Biol.*, **323**, 859–869.
- [8] Jeong S.-T, Kim H.-K, Kim S.-J, Chi S.-W, Pan J.-G, Oh T.-K, Ryu, S.-E, (2002) “Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase” *J. Biol.Chem.*, **277**, 17041–17047.
- [9] Kalay Ş., (2006) “Lipaz katalizli Ayçiçek yağın metanoliz reaksiyon mekanizmasının HPLC ile incelenmesi” Yüksek Lisans Tezi, GebzeYüksekTeknoloji Enstitüsü, Gebze, KOCAELİ.
- [10] Marangoni, A.G., (2002) “Enzyme Kinetic a Modern Approach.”, Wiley Publishers, Edition: 1, ISBN-10: 0471159859, ISBN-13: 978-0471159858.

- [11] Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. (1999) "Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases" *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 315–351.
- [12] Erdoğan D., (2012) "Lipaz Geninin Termofilik *Geobacillus kaustophilus*'tan Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması" Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze, KOCAELİ.
- [13] Intra A., Bava A., Nasini G., Riva S., (2004) "Regioselective enzymatic acylation of polyhydroxylated sesquiterpenoids" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **29**, 95–98.
- [14] Aravindan R., Anbumathi P., Viruthagiri T., (2007) "Lipase applications in food industry" *Indian J. Biotechnol.*, **6**, 141–158.
- [15] Gunasekaran V., Das D., (2005) "Lipase fermentation: Process and prospects" *Indian J. Biotechnol.*, **4**, 437–445.
- [16] Hasan F., Shah A.A., Hameed A., (2006) "Industrial Applications of Microbial Lipases" *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 235–251.
- [17] Gupta R., Gupta N., Rath P., (2004) "Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 763–781.
- [18] Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C., (2001) "Production, purification, characterization and applications of lipases" *Biotechnol. Adv.*, **19**, 627–662.
- [19] Alkan H., Baysal Z., Uyar F., Dogru M., (2007) "Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes" *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **136**, 183–192.
- [20] Becker P., Abu-Reesh I., Markossian S., Antranikian G., Märkl H., (1997) "Determination of kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 184–190.
- [21] Khyami-Horani H., (1996) "Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase" *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 399–401.
- [22] Nawani N., Khurana J., Kaur J., (2006) "A Thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization" *Mol. Cell. Biochem.*, **290**, 17–22.

- [23] Kim H.-K., Sung M.-H., Kim H.-M., Oh T. K., (1994) “Purification and partial characterization of thermostable carboxyl esterase from *Bacillus stearothermophilus* L1” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 961–962.
- [24] Wang Y., Srivastava K.C., Shen G.-J., Wang H.Y., (1995) “Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841)” *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 433–438.
- [25] Bora L., Kalita M.C., (2008) “Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from a thermophilic *Bacillus* sp. DH4, characterization and its potential applications as detergent additive” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**, 688–693.
- [26] Sinchaikul S., Tyndall J.D.A., Fothergill-Gilmore L.A., Taylor P., Phutrakul S., Chen S.T., Walkinshaw M.D., (2002) “Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1” *Acta Cryst.*, **D58**, 182–185.
- [27] Carrasco-López C., Godoy C., De Las Rivas B., Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Martínez-Ripoll M., Hermoso J.A., (2009) “Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements” *J. Biol.Chem.*, **248**, 4365–4372.
- [28] Carrasco-López C., Godoy C., De Las Rivas B., Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Martínez-Ripoll M., Hermoso J.A., (2008) “Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the BTL2 lipase from the extremophilic microorganism *Bacillus thermocatenulatus*” *Acta Cryst.*, **F64**, 1043–1045.
- [29] Van Pouderoyen G., Eggert T., Jaeger K.-E., Dijkstra B.W., (2001) “The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme ” *J. Mol. Biol.*, **309**, 215–226.
- [30] Acharya P., Rajakumara E., Sankaranarayanan R., Rao N.M., (2004) “Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase.” *J. Mol. Biol.*, **341**, 1271–1281.
- [31] Kawasaki K., Kondo H., Suzuki M., Ohgiya S., Tsuda S., (2002) “Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution” *Acta Cryst.*, **D58**, 1168–1174.

- [32] Rajakumara E., Acharya P., Ahmad S., Shanmugam V.M., Rao N.M., Sankaranarayanan R., (2004) “Crystallization and preliminary X-ray crystallographic investigations on several thermostable forms of a *Bacillus subtilis* lipase” *Acta Cryst.*, **D60**, 160–162.
- [33] Ahmad S., Kamal M.Z., Sankaranarayanan R., Rao N.M., (2008) “Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: in vitro evolution and structural insight” *J. Mol. Biol.*, **381**, 324–340.
- [34] Jeong S.-T, Kim H.-K, Kim S.-J, Chi S.-W, Pan J.-G, Oh T.-K., Ryu S.-E, (2002) “Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase” *J. Biol.Chem.*, **277**, 17041–17047.
- [35] Simons J.W.F.A., Götz F., Egmond M.R., Verheij H.M., (1998) “Biochemical properties of staphylococcal (phospho)lipases” *Chem. Phys. Lipids*, **93**, 27–37.
- [36] Dutta S., Ray L., (2009) “Production and Characterization of an Alkaline Thermostable Crude Lipase from an Isolated Strain of *Bacillus cereus* C₇” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **159**, 142–154.
- [37] Kim H.K., Choi H.J., Kim M.H., Sohn C.B., Oh T.K., (2002) “Expression and characterization of Ca⁽²⁺⁾-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26” *Biochim. Biophys. Acta*, **1583**, 205–212.
- [38] Dosanjh N.S., Kaur J., (2002) “Biochemical Analysis of a Native and Proteolytic Fragment of a High-Molecular-Weight Thermostable Lipase from a Mesophilic *Bacillus* sp.” *Protein Expr. Purif.*, **24**, 71–75.
- [39] Chen S., Qian L., Shi B., (2007) “Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C₇” *Process Biochem.*, **42**, 988–994.
- [40] Kim H.-K., Park S.-Y., Lee J.-K., Oh T.-K., (1998) “Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 66–71.
- [41] Schmidt-Dannert C., Rúa M.L., Atomi H., Schmid R.D., (1996) “Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties” *Biochim. Biophys. Acta*, **1301**, 105–114.
- [42] Helistö P., Korpela T., (1998) “Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method” *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 113–117.

- [43] Sekhon A., Dahiya N., Tiwari R.P., Hoondal G.S., (2005) "Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1" *J. Basic Microbiol.*, **45**, 147–154.
- [44] Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., Kanwar S.S., Gupta R., (2005) "Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3" *Protein Expr. Purif.*, **41**, 4138–4144.
- [45] Ahmed E.H., Raghavendra T., Madamwar D., (2010) "Thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: Characterization, partial purification and application in organic synthesis" *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**, 2102–2113.
- [46] Lee D.W., Koh Y.-S., Kim K.-J., Kim B.-C., Choi H.-J., Kim D.-S., Suhartono M.T., Pyun Y.R., (1999) "Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1" *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 393–400.
- [47] Chakraborty K., Raj R.P., (2008) "An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization" *Food Chem.*, **109**, 727–736.
- [48] Hasan F., Shah A.A., Hameed A., (2007) "Purification and characterization of a mesophilic lipase from *Bacillus subtilis* FH5 stable at high temperature and pH" *Acta Biol. Hung.*, **58**, 115–132.
- [49] Lee D.W., Kim H.W., Lee K.W., Kim B.C., Choe E.A., Lee H. S., Kim D.S., Pyun Y.R., (2001) "Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1" *Enzyme Microb. Technol.*, **29**, 363–371.
- [50] Nawani N., Singh R., Kaur J., (2006) "Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme" *Electron. J. Biotechnol.*, **9**, 559–565.
- [51] Takac S., Marul B., (2008) "Effects of Lipidic Carbon Sources on the Extracellular Lipolytic Activity of a Newly Isolated *Bacillus subtilis*" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1019–1025.
- [52] Kanwar S.S., Ghazi I.A., Chimni S.S., Joshi G.K., Rao G.V., Kaushal R.K. Gupta, Punj R.V., (2006) "Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate" *Protein Expr. Purif.*, **46**, 421–428.

- [53] Nawani N., Dosanjh N.S., Kaur J., (1998) "A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: Characterization and esterification studies" *Biotechnol. Lett.*, **20**, 997–1000.
- [54] Sabri S., Rahman R.N.Z.R.A., Leow T.C., Basri M., Salleh A.B., (2009) "Secretory expression and characterization of a highly Ca^{2+} -activated thermostable L2 lipase" *Protein Expr. Purif.*, **68**, 161–166.
- [55] Nawani N., Kaur J., (2000) "Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33." *Mol. Cell. Biochem.*, **206**, 91–96.
- [56] Castro-Ochoa L.D., Rodríguez-Gómez C., Valerio-Alfaro G., Ros R.O., (2005) "Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11" *Enzyme Microb. Technol.*, **37**, 648–654.
- [57] Schmidt-Dannert C., Sztajer H., Stöcklein W., Menge U., Schmid R.D., (1994) "Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*" *Biochim. Biophys. Acta.*, **1214**, 43–53.
- [58] Sinchaikul S., Sookkheo B., Phutrakul S., Pan F.-M., Chen S.-T., (2001) "Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification, and characterization" *Protein Expr. Purif.*, **22**, 388–398.
- [59] Bora L., Kalita M.C., (2008) "Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from a thermophilic *Bacillus* sp. DH4, characterization and its potential applications as detergent additives" *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**, 688–693.
- [60] Goto M., Ogawa H., Isobe T., Kawasaki M. and Kometani T., (2003) "2-Propanol treatment of *Candida rugosa* lipase and its hydrolytic activity" *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **67**, 24-25.
- [61] Salgın U., Salgın S., Takac S., (2007) "The enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester in supercritical CO_2 using *Candida rugosa* lipase" *The Journal of Supercritical Fluids*, **43**, 310-316.
- [62] Chung C.T., Niemela S. L., Miller R. H., (1989) "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 2172-2175.

- [63] Laemmli U.K., (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature*, **227**, 680-685.
- [64] Thean C.L., Raja N.Z.R.A.R., Mahiran B, Abu Bakar S., (2007) "A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1" *Extremophiles*, **11**, 527-535.
- [65] Matsumura H, Yamamoto T, Leow TC, Mori T, Salleh AB, Basri M, Inoue T, Kai Y, Rahman R., (2008) "Novel cation- π interaction revealed by crystal structure of thermoalkalophilic lipase" *Proteins*, **70**, 592-598.
- [66] Jennifer C. M., Dennis A. D., (1997) "The cation- π interaction", *Chem. Rev.*, **97**, 1303–1324.
- [67] Dougherty D.A., Stauffer D.A., (1990) "Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition", *Science*, **250**, 1558-1560.
- [68] Hiroyoshi M., Takahiko Y., Then C.L., Tadashi M., Abu B.S., Mahiran B., Tsutoshi I., Yasushi K., Raja N.Z.R.A.R., (2007) "Novel cation- π interaction revealed by crystal structure of thermoalkalophilic lipase" *Proteins*, **70**, 592-598.
- [69] Kok Whye C., Thean Chor L., Raja N.Z.R.A.R., Mahiran B., (2010) "Reductive Alkylation Causes the Formation of a Molten Globule-Like Intermediate Structure in *Geobacillus zalihae* Strain T1 Thermostable Lipase" *App. Biochem. Biotechnol.*, **164**, 362-375
- [70] Suriana S., Raja N.Z.R.A.R., Thean C.L., Mahiran B., Abu Bakar S., (2009) "Secretory expression and characterization of a highly Ca^{2+} -activated thermostable L2 lipase" *Protein Expr. Purif.*, **68**, 161-166
- [71] Lesuisse E., Schanck K., Colson C., (1993) "Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme" *Eur. J. Biochem.*, **216**, 155-160
- [72] Thomas E. F., (1968) "Handbook of Food Additives", Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio.
- [73] Maya G., Diana Z., (2011) "Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases" *Journal of Molecular Catalysis B*, **68**, 1-21
- [74] Cruise C., Blanco A., Diaz P., (2002) "Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase" *FEMS Microbiol. Lett.*, **217**, 263-267
- [75] Cruise C., Falcocchio S., Xoxi E., (2004) "Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*-related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay" *Biochim Biohys Acta*, **1672**, 184-191

ÖZGEÇMİŞ

Kübra EKŞİLER, 1990 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladıktan sonra, 2007 yılında lisans eğitimine Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde başladı. 4 yıllık eğitimin ardından 2011 yılında mezun oldu ve yine aynı yıl içerisinde Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Bilimdalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

EKLER

EK 1

LB (Luria-Bertani) broth besiyeri (1 L, pH 7)

Trypton	10 g
Maya Özütü	5 g
NaCl	10 g
dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.	

Kanamisin (4 mL, 30 mg/mL)

0.12 g kanamisin dH₂O ile 4 mL'ye tamamlanır.

Ampisilin (4 mL, 50 mg/mL)

0.2 g amipisilin dH₂O ile 4 mL'ye tamamlanır.

IPTG (1 M, 2 mL)

0.567 g IPTG dH₂O ile 2 mL'ye tamamlanır.

Liziz Tamponu

Tris-HCl	20 mM
NaCl	500 mM
İmidazol	5 mM
Lizozim	10 mg/mL

Ni-NTA Kolonu İçin Yıkama Tamponu

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
İmidazol	10 mM

Ni-NTA Kolonu İçin Elüsyon Tamponu

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
İmidazol	300 mM

50X TAE Tamponu (1 L)

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

%1'lik Agaroz Jel (40 mL)

Agaroz	0.4 g
EtBr (10µg/µL stok)	3 µL
1X TAE Tampon	40 mL

4X Örnek Tamponu (SDS İçin)

SDS	%4
Gliserol	%20
2-merkaptoetanol	%10
Bromfenol mavisi	%0.004 g
Tris	0.125 M

10X SDS Yürütme Tamponu (1 L)

Tris	151.5 g
Glisin	72 g
SDS	50 g
dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.	

%30 Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi (pH 7.0, 500 mL)

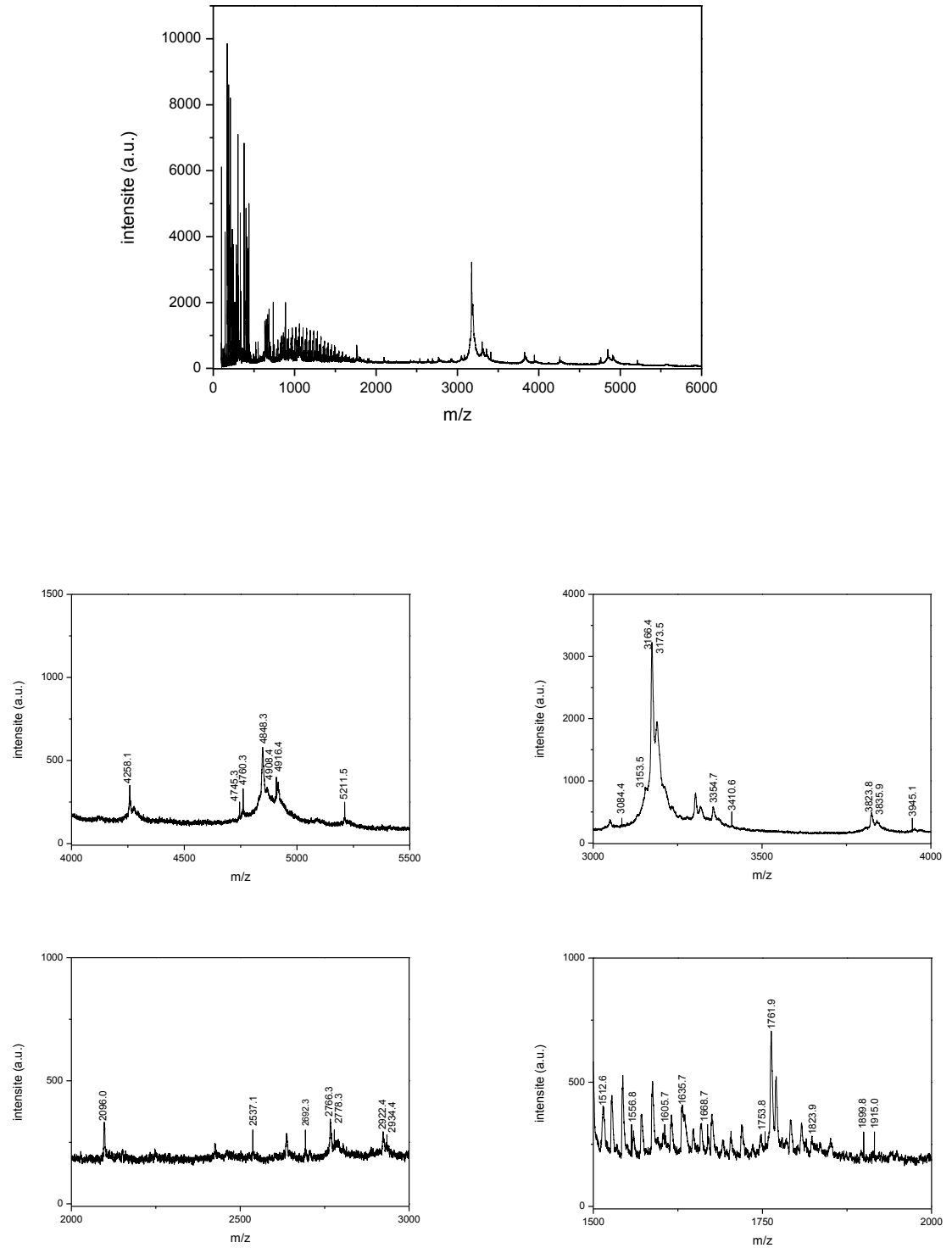
Akrilamid	145 g
N,N'-metilbisakrilamid	5 g
dH ₂ O ile 500 mL'ye tamamlanır.	

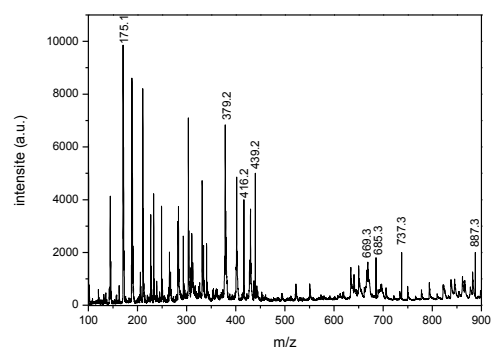
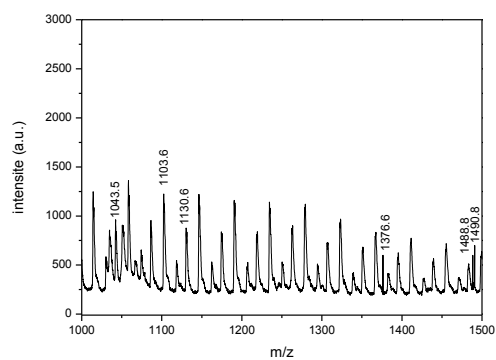
Coomassie Blue Boyama Çözeltisi (250 mL)

Coomassie Blue R-250	0.25 g
Metanol	112.5 mL
Glasiyel Asetik Asit	25 mL
dH ₂ O	112.5 mL

EK 2

Tripsinle Kesilen His₆-Lipazın MALDI-TOF/Kütle Spektrometre ile Peptit Analizi





EK 3

Tripsinle Kesilen Lipazın MALDI-TOF/Kütle Spektrometre ile Peptit Analizi

