

T. C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİO-YL-2003-0002

131680

AYDIN İLİ BOZKÖY-ALANGÜLLÜ TERMAL SULARINDAN
İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp. 4 ESTERAZ'ININ KISMİ
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ

HAZIRLAYAN: Z. Burcu BAKIR (ATEŞLİER)

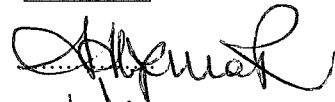
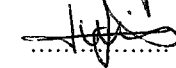
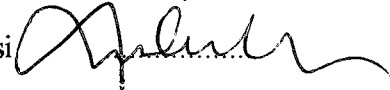
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN

AYDIN-2003

131680
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

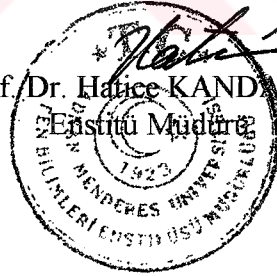
T.C
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Zehra Burcu BAKIR'ın hazırlamış olduğu Yüksek Lisans tezi aşağıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir. 40.09.2003

<u>ADI VE SOYADI</u> :	<u>ÜNİVERSİTESİ</u> :	<u>İMZASI:</u>
Prof. Dr. M. Ali AKPINAR	Cumhuriyet Üniversitesi	
Yrd.Doç. Dr. H. Halil BIYIK	Adnan Menderes Üniversitesi	
Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri Üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 22.09.2003 Tarih 17 sayılı kararıyla onaylanmıştır.....

Prof. Dr. Hatice KANDAMAR



İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	I
TABLolar LİSTESİ	II
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
KISALTMALAR VE SİMGELER	VI
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOD	17
2. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
2. 2. Mikroorganizmanın Seçimi	17
2. 2. 1. Tween 80 agar yöntemi	17
2. 3. Bakteri Straininin Karakterizasyonu	18
2. 3. 1. Büyüme eğrisi	18
2. 3. 2. Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisi	20
2. 3. 3. Ortam pH'ının enzim üretimi üzerine etkisi	20
2. 3. 4. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının büyüme eğrisine bağlı olarak pH ve enzim aktivitesindeki değişim	21
2. 4. Enzimin Üretimi	21
2. 5. Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Lokalizasyonu	21
2. 6. pNPB'm Farklı pH'lardaki Molar Absorbans Katsayılarının Belirlenmesi	22
2. 7. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	23
2. 8. Protein Tayini	24
2. 8. 1. Kullanılan kimyasal maddeler	24
2. 9. <i>Bacillus</i> sp. 4 Esterazının Karakterizasyonu	25
2. 9. 1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	25
2. 9. 2. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	25
2. 9. 3. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	25
2. 9. 4. Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisi	25
2. 9. 5. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	26
2. 9. 6. Polihidrik alkollerin enzim stabilitesi üzerine etkisi	26
2. 9. 7. Enzim aktivitesi üzerine EDTA ve metal iyonlarının etkisi	26

2. 9. 8. Esteraz aktivitesi üzerine aktive edici metal iyonları ve EDTA'nın etkisi	26
2. 9. 9. Çeşitli deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisi	28
2. 9. 10. Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	30
2. 9. 11. Enzim aktivitesi üzerine inhibe edici ajanların etkisi	30
2. 9. 12. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi	32
2. 10. Verilerin Değerlendirilmesi	32
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
3. 1. Mikroorganizmanın Seçimi	33
3. 1. 1. Tween 80 agar yöntemi	33
3. 2. Bakteri Straininin Karakterizasyonu	33
3. 2. 1. Mikroorganizmanın büyüme eğrisinin belirlenmesi	33
3. 2. 2. Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisi	33
3. 2. 3. Ortam pH'ının enzim üretimi üzerine etkisi	46
3. 2. 4. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının büyüme eğrisine bağlı olarak kültür ortamının pH ve enzim aktivitesindeki değişim	47
3. 3. Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Lokalizasyonu	49
3. 4. pNPB'nin Farklı pH'lardaki Molar Absorbans Katsayılarının Belirlenmesi	49
3. 5. Protein Tayini	49
3. 6. <i>Bacillus</i> sp. 4 Esterazının Karakterizasyonu	53
3. 6. 1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	53
3. 6. 2. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	54
3. 6. 3. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	56
3. 6. 4. Enzim stabilitesi üzerine pH'ının etkisi	57
3. 6. 5. Enzim aktivitesi üzerine substrat (pNPB) konsantrasyonunun etkisi	59
3. 6. 6. Polihidrik alkollerin enzim stabilitesi üzerine etkisi	61
3. 6. 7. Enzim aktivitesi üzerine EDTA ve metal iyonlarının etkisi	62
3. 6. 8. Esteraz aktivitesi üzerine aktive edici metal iyonları ve EDTA'nın etkisi	66
3. 6. 9. Çeşitli deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisi	67
Enzim aktivitesi üzerine iyonik deterjanların etkisi	67
Enzim aktivitesi üzerine non-iyonik deterjanların etkisi	68

Enzim aktivitesi üzerine zwitteriyonik deterjan etkisi	70
3. 6. 10. Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	71
3. 6. 11. Enzim aktivitesi üzerine inhibe edici ajanların etkisi	73
3. 6. 12. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi	74
4. TARTIŞMA	76
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	90
ÖZET	92
SUMMARY	93
TEŞEKKÜR	94
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	102



ÖZ

Bu araştırma, Aydın ili Bozköy-Alangüllü termal sularından elde edilen *Bacillus sp. 4* izolatının esterazının kısmi saflaştırmasının yapılması ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. *Bacillus sp. 4* izolatının maksimum enzim ürettiği koşullar belirlenmiştir. Esterazın lokalizasyonu, optimum sıcaklığı, pH'sı, sıcaklık ve pH stabilitesi, K_m ve V_{max} değerleri saptanmış, polihidrik alkollerin esteraz stabilitesi üzerine etkisi, çeşitli metal iyonlarının, deterjanların, organik çözücülerin ve inhibitörlerin esteraz aktivitesi üzerine etkisi ve esterazın substrat spesifitesi belirlenmiştir. Bulunan sonuçlar uygun literatürlerle karşılaştırılarak esteraz özellikleri açısından değerlendirilmiştir.

ABSTRACT

This study aims to carry out to make the partial purification and determination of the kinetic parameters of the esterase of *Bacillus sp. 4* isolated from Aydın Province, Bozköy-Alangüllü thermal spring water. In optimum conditions of *Bacillus sp. 4*, maximum amount of enzyme produced was determined. Optimum temperature, pH, temperature and pH stability, localization, K_m and V_{max} of the esterase, the effect of polyhidric alcohols on esteraz stability and the effects of various detergents, organic solvents and inhibitors on esterase activity was determined. The results were compared appropriate references and the esterase were evaluated by its property.

ANAHTAR SÖZCÜKLER / KEY WORDS: *Bacillus*, esteraz, lipaz, termostabil enzim, saflaştırma, karakterizasyon / *Bacillus*, esterase, lipase, thermostable enzyme, purification, characterization.

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Thermus agar ortamı.	19
Tablo 2. Castenholz 10X bazal tuz çözeltisi.	19
Tablo 3. Nitsch'in iz element çözeltisi.	19
Tablo 4. Kısmi olarak modifiye edilmiş Thermus agar ortamı.	20
Tablo 5. Kısmi olarak modifiye edilmiş Thermus ortamı.	20
Tablo 6. Diyaliz torbasının ön işleminden geçirilmesi.	22
Tablo 7. Standart deney ortamı.	23
Tablo 8. 1 mM metal iyonu ve EDTA bulunan deney ortamı.	27
Tablo 9. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı.	27
Tablo 10. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı.	27
Tablo 11. İnkübasyon sonrası standart reaksiyon bileşenleri.	28
Tablo 12. 1 mM metal iyonu (Mn ve Ni) ve EDTA bulunan deney ortamı.	28
Tablo 13. İnkübasyon sonrası standart reaksiyon bileşenleri.	28
Tablo 14. 2.5 mM deterjan içeren deney ortamı.	29
Tablo 15. 5 mM deterjan içeren deney ortamı.	29
Tablo 16. 10 mM deterjan içeren deney ortamı.	29
Tablo 17. 20 mM deterjan içeren deney ortamı.	30
Tablo 18. İnkübasyon sonrası standart reaksiyon bileşenleri.	30
Tablo 19. 1 mM inhibitör içeren deney ortamı.	31
Tablo 20. 5 mM inhibitör içeren deney ortamı.	31
Tablo 21. İnkübasyon sonrası standart reaksiyon bileşenleri.	31
Tablo 22. <i>Bacillus</i> sp. 4'ün 50 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim.	40
Tablo 23. <i>Bacillus</i> sp. 4'ün 55 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişimi.	41
Tablo 24. <i>Bacillus</i> sp. 4'ün 60 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim.	43
Tablo 25. <i>Bacillus</i> sp. 4'ün 65 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim.	44

Tablo 26. <i>Bacillus</i> sp. 4'ün 70 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim.	45
Tablo 27. <i>Bacillus</i> sp. esteraz aktivitesinin üzerine ortam pH'sının etkisi.	47
Tablo 28. <i>Bacillus</i> sp. 4'ün 65 °C'deki büyüme eğrisine bağlı olarak kültür ortamının pH ve enzim aktivitesindeki değişim.	48
Tablo 29. <i>Bacillus</i> sp. 4 esterazının saflaştırma basamakları.	50
Tablo 30. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.	53
Tablo 31. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz'ının farklı sıcaklıklardaki stabilitesi.	55
Tablo 32. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.	57
Tablo 33. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz'ının farklı pH'lardaki stabilitesi.	58
Tablo 34. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine substrat (pNPB) konsantrasyonunun (mM) etkisi.	60
Tablo 35. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi.	62
Tablo 36. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi.	63
Tablo 37. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine EDTA'lı ve EDTA'sız metal iyonlarının etkisi.	66
Tablo 38. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine iyonik deterjanların etkisi.	68
Tablo 39. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine non-iyonik deterjanların etkisi.	69
Tablo 40. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine zwitteriyonik ve katyonik deterjanların etkisi.	70
Tablo 41. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.	71
Tablo 42. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi.	73
Tablo 43. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz'ının substrat spesifitesi.	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1a. <i>Bacillus</i> sp. D3 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.	34
Şekil 1b. <i>Bacillus</i> sp. D3 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.	34
Şekil 2a. <i>Bacillus</i> sp. D4 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.	35
Şekil 2b. <i>Bacillus</i> sp. D4 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.	35
Şekil 3a. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.	36
Şekil 3b. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.	36
Şekil 4a. <i>Bacillus</i> sp. 1 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.	37
Şekil 4b. <i>Bacillus</i> sp. 1 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.	37
Şekil 5a. <i>Bacillus</i> sp. 3 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.	38
Şekil 5b. <i>Bacillus</i> sp. 3 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.	38
Şekil 6. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının büyüme eğrisi.	39
Şekil 7. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının 50 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.	40
Şekil 8. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının 55 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.	41
Şekil 9. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının 60 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.	43
Şekil 10. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının 65 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.	44
Şekil 11. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının 70 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.	45
Şekil 12. Ortam pH'sının enzim üretimi üzerine etkisi.	46
Şekil 13. <i>Bacillus</i> sp. 4 izolatının büyüme eğrisine bağlı olarak kültür ortamının pH'sı ve enzim aktivitesindeki değişim.	48
Şekil 14. p-nitrofenolün pH 4.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	51
Şekil 15. p-nitrofenolün pH 4.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	51
Şekil 16. p-nitrofenolün pH 5.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	51
Şekil 17. p-nitrofenolün pH 5.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	51
Şekil 18. p-nitrofenolün pH 6.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	51
Şekil 19. p-nitrofenolün pH 6.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	51
Şekil 20. p-nitrofenolün pH 7.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	52

Şekil 21. p-nitrofenolün pH 7.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	52
Şekil 22. p-nitrofenolün pH 8.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	52
Şekil 23. p-nitrofenolün pH 8.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.	52
Şekil 24. Standart protein eğrisi.	52
Şekil 25. <i>Bacillus</i> sp. 4 esterazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.	54
Şekil 26. <i>Bacillus</i> sp. 4 esterazının farklı sıcaklıklardaki stabilitesi.	56
Şekil 27. <i>Bacillus</i> sp. 4 esterazının aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.	57
Şekil 28. <i>Bacillus</i> sp. 4 esterazının farklı pH'lardaki stabilitesi.	59
Şekil 29. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michelis-Menten grafiği).	60
Şekil 30. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Linweaver-Burk grafiği).	61
Şekil 31. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi.	62
Şekil 32. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi.	64
Şekil 33. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine Hg ve Cu iyonlarının etkisi.	64
Şekil 34. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine Mn ve Ni iyonlarının etkisi.	65
Şekil 35. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi.	66
Şekil 36. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine EDTA-metal iyonları ve EDTA'nın etkisi.	67
Şekil 37. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine iyonik deterjanların etkisi.	68
Şekil 38. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine non-iyonik deterjanların etkisi.	69
Şekil 39. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine zwitteriyonik deterjanın etkisi.	70
Şekil 40. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.	72
Şekil 41. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.	72
Şekil 42. <i>Bacillus</i> sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi.	73
Şekil 43. <i>Bacillus</i> sp. 4 esterazının substrat spesifitesi.	75

KISALTMALAR VE SİMGELER

BSA	Sığır serum albumini
cm	Santimetre
dk	Dakika
ES	Enzim-substrat
g	Yer çekimi ivmesi
g	Gram
IU	Uluslararası enzim ünitesi
kHz	Kiloherz
Km	Michaelis-Menten sabitesi
L	Litre
ml	Mililitre
mg	Miligram
mmol	Milimol
mM	Milimolar
M	Molar
μ M	Mikromolar
μ l	Mikrolitre
μ mol	Mikromol
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
pNP	p-nitrofenol
pNPA	p-nitrofenil asetat
pNPB	p-nitrofenil butirat
pNPL	p-nitrofenil laurat
pNPP	p-nitrofenil palmitat
rpm	Dakikadaki devir sayısı
U	Enzim ünitesi
V _{max}	Maksimum enzim aktivitesi

1. GİRİŞ

Eski zamanlardan beri doğal kaynaklı enzimler peynir, maya, bira, şarap ve sirke gibi besinlerin ve deri, çivit ve keten gibi malların üretiminde kullanılmaktadır. Bu işlemler ya doğal olarak gelişen mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerle ya da dana rumeni veya papaya meyvesinden elde edilen enzimlerle gerçekleştirilirdi. Bu enzimler, saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmadan kullanılıyordu. Enzim endüstrisi modern biyoteknolojinin gelişimiyle son kırk yılda hızlı bir gelişim göstermiştir. Geçen yüzyılın son yarısında fermentasyon işlemlerinin gelişimiyle birlikte, enzim üreten mikroorganizmalar endüstride kullanılmaya başlanmıştır. Böylece saflaştırılmış ve iyi karakterize edilmiş enzimlerin ticari üretimi oldukça artmıştır. Bu gelişmeyle enzimlerin deterjan, tekstil ve nişasta endüstrisi gibi başlıca endüstriyel işlemlere girmesi sağlanmıştır. Rekombinant gen teknolojisinin kullanımı ticari enzim üretimini daha da arttırmış ve daha önceden üretilemeyen enzimlerin ticari olarak kullanımını sağlamıştır. Ayrıca, protein mühendisliği ve modern biyoteknolojideki en son gelişmeler endüstriyel enzimlerin gelişimini tamamen değiştirmiştir. Bu gelişmeler, yeni işlem şartlarına adapte olmuş ve yeni aktiviteler gösteren enzimlerin endüstriyel kullanımlarının daha da yaygınlaşmasını sağlamıştır.

Endüstride çeşitli doğal maddelerin parçalanmasında kullanılan enzimlerin çoğunluğu (% 75) hidrolitik aktivite gösterir. Proteazlar, deterjan ve süt endüstrilerindeki yaygın kullanımlarından dolayı (% 40) en baskın enzim tipidir (Sharma et al., 2001). Nişasta, tekstil, ekmek ve deterjan gibi endüstrilerde kullanılan çeşitli karbohidrazlar (özellikle amilazlar ve selülazlar), ikinci büyük grubu teşkil ederler. Deterjan, besin, ilaç, tekstil ve alkol endüstrilerinin hakim olduğu teknik endüstriler, endüstriyel enzimlerin en çok kullanıldığı alandır. Endüstriyel enzimlerin tüm dünyadaki kullanım değerleri 1995'te 1 milyar dolar iken, 2000 yılında 1.5 milyar dolara yükselmiştir. Bununla beraber bu büyümeyi başlıca deterjan endüstrisi olmak üzere bazı teknik endüstriler sağlamıştır. Son on yıldaki en hızlı gelişme ekmek ve hayvansal gıda endüstrilerinde görülmektedir, fakat organik sentezden kağıt endüstrisine ve insan sağlığına kadar uzanan çeşitli endüstriler de bu gelişmeye katkıda bulunmaktadır (Kirk et al., 2002).

Enzimlerin sınıflandırılması, ya substrat spesifitelerine ya da amino asit dizilimlerine dayanır. Karşılaştırılmak istenen bütün enzimlerin, aynı ya da en azından ilişkili bir substratla tercihen benzer reaksiyon koşulları altında denenmesi gerekir. Bu her ne kadar kimyacı ve biyokimyacılara uygun enzimi doğrudan teşhis etme imkanı verse de, yaygın bir strateji

değildir. Genel veritabanlarındaki amino asit dizilimlerine ulaşabilmek günümüzde çok kolaydır. Amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması, farklı orjinli enzimler arasındaki evrimsel ilişki hakkında daha açıklayıcı bilgiler sağlar. Diğer yandan, amino asit dizilim homolojisinin yüksek olması, enzimlerin özellikleriyle (substrat spesifitesi, stereoselektivite, optimum pH ve sıcaklık, çözücü stabilitesi gibi) ilişkili olmayabilir ve hatta bazı durumlarda tamamiyle farklı tipte reaksiyonlar katalizleyebilirler. Örneğin, *Streptomyces aureofaciens*'den elde edilen bir bromoperoksidaz, *Pseudomonas fluorescens*'in esterazı ile yaklaşık % 55 amino asit dizilim özdeşliği gösterir. Fakat substrat spesifiteleri çok az uygunluk gösterir (Bornscheuer, 2002).

Son on yılda, esteraz ve lipazlarla ilgili çalışmaların sayısı oldukça artmıştır. X-ışın kristallografik ve NMR (Nükleer magnetik rezonans) çalışmaları, bu proteinlerin 3 boyutlu yapıları hakkında atomik seviyede bilgi sağlamaktadır. Pek çok lipazın gösterdiği kapak benzeri yapı, kapak hareketini içeren mekanistik modelin oluşumunu başlatır. Kapağın katalizle ilişkili olduğu varsayılan uzaysal hareketi, çözünür olmayan kapalı kapak konformasyonundaki hidrofobik bölgeleri meydana getirir. Böylece hidrofobik kısımlar, yağ-su ara yüzeyine girebilir. Esterazlar ve birkaç lipaz bir kapak yapısı göstermez. *Fusarium solani pisi*'den elde edilen kütinaz ve *Candida antarctica* B'den elde edilen lipaz bu durumla ilgili göze çarpan örneklerdir.

Proteinlerin 3 boyutlu yapılarıyla ilgili bilgilerin giderek artması, proteinleri kıvrımlarına göre sınıflandırma fikrini geliştirmiştir. Hidrolazlar α/β kıvrım grubu içinde yer alırlar ve α/β hidrolaz kıvrımı olarak adlandırılırlar. Bütün lipazlar ve esterazların çoğu bu kıvrım yapısını gösterir. Triasilgliserol lipazlar, bütün fungal, bakteriyel ve pankreatik lipazları kapsamaktadır. Esterazlar üç gruba ayrılır: flavodoksin benzeri kıvrım grubuna dahil olan kütinaz grubu, α/β hidrolaz kıvrımına sahip olan esteraz grubu ve asetilkolinesteraz grubudur. Bu α/β hidrolaz kıvrımı haloperoksidazlarda ve epoksid hidrolazlarda da bulunur (Fojan et al., 2000; Sharma et al., 2001). Katalitik merkez, Ser-Asp-His (bazı lipazlarda Asp yerine Glu) üçlüsünden oluşur ve aktif bölgedeki serininin etrafında genellikle ortak Gly-x-Ser-x-Gly dizilimi bulunur. Lipazların ve esterazların 53 amino asitlik dizilimleri karşılaştırılmış ve başka kalıpların da bulunduğu ortaya çıkmıştır. Örneğin, bazı lipazlar ve *Streptomyces seabies*'in esterazı Gly-Asp-Ser-Leu ortak dizilimini içerirler. Ayrıca bu esteraz, yaygın Ser-Asp-His üçlüsü yerine katalitik Ser-His ikilisini içermektedir. (Alvarez-Macarie et al., 1999; Lee et al., 1999; Fojan et al., 2000; Eggert et al., 2000; Bornscheuer, 2002).

Hidrolazlar, çok geniş substrat spesifitesi gösteren bir enzim sınıfıdır. Hidrolazlar, peptidleri, amidleri, halidleri, esterleri ve trigliseritleri hidrolizlerler. Esteraz aktivitesi gösteren enzimlerin non-ester bağlarını da hidrolizleyebilmesi, bu enzimlerin sınıflandırması ve terminolojisi ile ilgili olarak akılda ilginç sorular bırakmaktadır. Hidrolazların iki büyük sınıfı olan lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve “gerçek” esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilester hidrolazlar) son derece önemlidir (Sharma et al., 2001; Bornscheuer, 2002).

Bu enzimler eskiden, bilinen substrat spesifitelerine göre sınıflandırılırdı. Esterazlar, bir su molekülünün ilavesi ile ester bağlarını hidrolizleyen enzimler olarak tanımlanırdı. Genellikle bir esteraz, substratın ya alkol ya da asit kısmına spesifiktir. Fakat her ikisine birden spesifite gösteremez. 1972 yılında Whitaker esterazlar için bir sınıflandırma düzeni önerdi, bu sınıflandırma düzeni, onların substratlarının asit kısmına olan spesifitelerine dayanmaktadır. Örneğin; karboksilik ester hidrolazlar, karboksilik asit esterlerinin hidrolizini katalizlerler. Karboksil esterazlar, aril esterazlar, kolin esterazlar, kolesterol esterazlar ve ayrıca lipazlar da hidrolitik enzimlerin bu grubuna dahildir. Bu enzimlerin sınıflandırılmasında ya substrat spesifiteleri ya da enzimatik katalizde görevli aktif bölgeleri kullanılmaktadır. Esterazlar tercihen kısa zincirli yağ asitlerinin ester bağlarını kırarken, lipazlar daha geniş bir substrat aralığı gösterirler. Substratın fiziksel durumu, substrat spesifitesine etki eden önemli bir faktördür. Uzun zincirli yağ asitleri tipik olarak çözünür değildir veya en azından zayıf bir çözünürlük gösterir (emülsiyonlar). Bu nedenle, lipazlar çözünür olmayan veya kuvvetli şekilde kümeleşen bir substratı tanıyabilir. Çünkü lipazlar kümeleşen substratlara karşı aktiftir. Lipaz aktivitesi, substrat konsantrasyonuyla değil, doğrudan total substrat alanıyla ilişkilidir. Esterazlar ise, daha çok suda çözünen substratlara karşı yüksek aktivite gösterirler (Fojan et al., 2000; Sharma et al., 2001).

Ester hidrolizi veya oluşumuyla ilgili mekanizma, lipazlar ve esterazlar için temelde aynı olup, 4 adımdan oluşur. İlk olarak, substrat aktif serine bağlanarak katalitik His ve Asp residüelleri tarafından stabilize edilen bir tetrahedral ara ürün oluşturur. Sonra, alkol serbest kalır ve bir açıl-enzim kompleksi oluşur. Bir nükleofilin hücumu (suyun hidrolizi, alkol veya esterin (trans-) esterifikasyonu) tekrar bir tetrahedral ara ürün oluşturur. Son olarak da bu ara ürün ayrışarak, ürün (bir asit veya ester) ve serbest enzimi oluşturur (Bornscheuer, 2002).

Esterazlar klasik Michaelis-Menten kinetiklerine uyarlar. Oysa lipazlar, yüksek aktivite göstermeden önce minimum substrat konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar. Lipazlarda

görülen ara-yüzey aktivasyon özelliği lipazları esterazlardan ayıran en önemli özelliktir. Yapısal tanıma göre, ara-yüzey aktivasyonu lipazın aktif bölgesini çeviren bir hidrofobik alandan dolaydır. Hidrofobik alan, sadece minimum substrat konsantrasyonunun varlığında (yani, bir trigliserit fazı ya da bir hidrofobik organik çözücü) başka bir yöne hareket eder ve böylece aktif bölgenin önündeki engel kalkmış olur. Her iki enzim de organik çözücülerde stabil ve aktiftir. Ancak bu özellik daha çok lipazlar için geçerlidir (Sharma et al., 2001; Bornscheuer, 2002). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, lipazların ve esterazların amino asit dizilimleri ve 3 boyutlu yapıları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre, lipazlar ve esterazların, pH'ya bağlı olarak elektrostatik özelliklerine göre ayrılabilceği ileri sürülmüştür. Lipazların aktif bölgesi, maksimum aktivite gösterdikleri pH aralığında (özellikle pH 8.00'de) negatif bir potansiyel gösterir. Esterazlar da benzer bir durum gösterirler. Ancak, esterazlar genellikle daha düşük pH değerlerinde (pH 6.00 civarında) optimum aktivite gösterirler (Fojan et al., 2000).

Esterazların görüntülenmesi genellikle renk veren maddelerin (örneğin; p-nitrofenil esterler) ya da tributirinle desteklenmiş agar plaklarının kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Aktif esteraz üreten organizmalar, trigliseritler gibi suda çözünmeyen substratlar içeren plaklar üzerinde, şeffaf halka oluşumuyla teşhis edilir. Bu lipid damlacıklarının hidrolizi, kolonilerin etrafında şeffaf bir zon oluşumuyla sonuçlanır. Lipazlar substrat spesifiteleri ile esterazlardan ayrılabilirler. p-nitrofenil palmitat lipazlar tarafından yıkılırken, p-nitrofenil butirat esterazlar tarafından bazende lipazlar tarafından da yıkılır. Bu geleneksel yaklaşımın aksine, modern moleküler biyoloji teknikleri, DNA dizilimlerinin görüntülenmelerini mümkün kılar. Bu teknik "kültürü yapılamayan" organizmaların enzimlerinin görüntülenmesini sağlar (Bornscheuer, 2002).

Bir proteinin yüzeyi, fiziksel ve kimyasal şartlara karşı duyarlı olan bir ara yüzeyden meydana gelmiştir. Bir enzimin substratı veya inhibitörü arasındaki, bir reseptör ve ligandı arasındaki moleküler etkileşim temelde bir çok yüzey temasları ile gerçekleşmektedir. Doğadaki proteinlerde, 10-15 Å aralığındaki iç moleküler kuvvetlerin tümü, kullanılan çözücünün tipi, pH'sı ve sıcaklığına bağlı olmaksızın elektrostatiktir. Proteinin elektrostatik etkisi ortam pH'sına bağlı olarak değişir. Enzimler, fonksiyonları için, aktif pH aralığında uygun protonlanma durumuna sahip, katalitik amino asitlere ihtiyaç duyarlar. Dielektrik sabitesi, çözücünün iyonik gücü ve diğer yüklü amino asitlerin yakınlığı gibi çeşitli faktörler, bu katalitik amino asitlerin yük durumunu etkiler. pH'daki değişim katalitik amino asitlerin

protonlanmış ve protonlanmamış formlarının denge konsantrasyonlarında bir değişime neden olur. Bu değişimin en belirgin sonucu, katalitik amino asitlerin ortalama yükünde bir değişim meydana getirmesidir. Bu nedenle pH, enzim aktivitesi için anahtar bir öneme sahiptir (Fojan et al., 2000).

Memeli kaynaklı esterazlar ve lipazlar, çok çalışılmış ve karakterizasyonları yapılmıştır (Kademi et al., 1999). Bakteriler, kısa zincirli ($C \leq 12$) karboksilik asit esterlerini hidrolizleyen karboksilesterazlar ve suda çözünmeyen uzun zincirli ($C \geq 12$) açilgliseritlere karşı maksimum aktivite gösteren lipazları da içeren oldukça farklı lipolitik enzimler üretirler (Eggert et al., 2000)

Hem esterazlar (EC 3.1.1.1) hem de lipazlar (EC 3.1.1.3), esterifikasyon ve transesterifikasyon gibi yeni reaksiyonları katalizledikleri için , günümüzde düşük su içerikli ortamlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu yeni reaksiyonlar, yeni uygulamalar için oldukça büyük bir potansiyele sahiptirler. Bu enzimler, kiral yapıli blokların hazırlanması için rasemik karışımların ayrılması, ilaç endüstrisinde saf kimyasalların sentezi, gıda endüstrisinde lezzet veren esterlerin sentezi ile katı ve sıvı yağ endüstrisinde trigliseritlerin fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesi gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılır (Kademi et al., 1999).

Esteraz ve lipazların birçoğu, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter globiformis*, *Candida cylindracea*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Brevibacterium linens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis* ve *Aspergillus niger* gibi 45°C'nin altında gelişim gösteren mezofilik mikroorganizmalardan izole edilmiştir. İlginç özelliklere sahip olmalarının yanı sıra, bu enzimlerin kullanıldığı birkaç özel endüstriyel işlem geliştirilmiştir. Örneğin, rasemik karışımların ayrılmasında kullanılır (Meghji et al., 1990; Kademi et al., 1999).

Esterazlar, lipazlardan farklı olarak, genellikle, nötrale yakın pH değerlerinde (genellikle pH 6.00 civarında) optimum aktivite gösterirler (Fojan et al., 2000). *Pseudomonas fluorescens* esterazı pH 7.50 (Khalameyzer et al., 1999), *Arthrobacter viscosus* NRRL B-1973 esterazı pH 7.40 (Cui et al., 1999), *Arthrobacter nicotianae* 9458 ve *Pyrobaculum calidifontis* VA1 esterazları pH 7.00 (Smacchi et al., 2000; Hotta et al., 2002), *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazı pH 6.00 (Kakariari et al., 2000) ve *Lactobacillus casei* CL96 esterazı pH 7.00 (Choi and Lee, 2001)'de optimum

aktivite göstermişlerdir. Bunun aksine, lipazlarla bazı benzer özellikleri paylaştıkları saptanan, *Bacillus subtilis* NRRL 365 esterazı pH 8.00 (Meghji et al., 1990), *Bacillus circulans* esterazı pH 8.00-9.50 (Kademi et al., 1999), *Bacillus licheniformis* esterazı pH 8.00-8.50 (Alvarez-Macarie et al., 1999), *Bacillus* genusuna ait bir esteraz pH 9.00-9.50 (Owusu and Cowan, 1991) ve *Sulfolobus acidocaldarius* esterazı pH 7.50-8.50 (Sobek and Görisch, 1988)'da optimum aktivite göstermişlerdir. *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazı pH 4.00'de maksimum aktivitesinin yalnızca % 14'ünü göstermiştir. Buna karşın alkalın pH'larda çok daha stabil olduğu görülmüş ve pH 8.00'de % 72 ve pH 9.00'da % 66 aktivite göstermiştir (Kakariari et al., 2000). *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazı pH 5.50, 6.00 ve 6.50'de maksimum aktivitesinin sırasıyla % 50, 75 ve 90'ını geri kazanmıştır (Smacchi et al., 2000). *Bacillus licheniformis* esterazı pH 6.00'da maksimum aktivitesinin % 71'ini ve pH 9.00'da ise % 77'sini geri kazanmıştır (Alvarez-Macarie et al., 1999). Başka bir *Bacillus*'dan elde edilen esteraz ise pH 7.00'de optimum aktivitesinin % 7'sini gösterebilmiştir (Owusu and Cowan, 1991).

Buna karşın, *Acinetobacter radioresistens* CMC-1, *Bacillus* spp. TG43 ve ATAD2, *Pseudomonas* sp., *Streptomyces rimosus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp. RSJ-1 ve *Pseudomonas* sp. LP7315 lipazlarının pH 7.00-11.50 arasında maksimum aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Hong and Chang, 1998; Abramic et al., 1999; Bell et al., 1999; Dong et al., 1999; Ghanem et al., 2000; Dosanj and Kaur, 2001; Lee et al., 2001; Nthangeni et al., 2001; Sakiyama et al., 2001; Sharma et al., 2001).

Mikrobiyal esteraz ve lipazların pH stabiliteleri optimum pH değerleriyle ilişkilidir. Bununla birlikte enzimlerin genellikle aktivite gösterdikleri pH aralığından daha geniş bir pH aralığında stabil olduğu görülmüştür. *Bacillus circulans* esteraz maksimum aktivitesini pH 8.00-9.50 arasında göstermiş, pH 6.00'dan 8.00'e kadar stabil olduğu ve pH 8.00'in üzerinde ise hafif bir düşüş olduğu saptanmıştır (Kademi et al., 2000). *Lactobacillus casei* CL96 esterazı ise, maksimum aktivitesini pH 7.00'de göstermiş, pH 6.00-8.00 arasında aktivitesinin % 60'dan fazlasını korumuştur (Choi and Lee, 2001). *Bacillus subtilis* esterazı ise, pH 11.00-12.00 arasında orijinal aktivitesinin % 80-95'ini korumuştur. Daha düşük pH değerlerinde ise aktivite % 20'ye kadar düşmüştür (Eggert et al., 2000).

Bacillus alcalophilus lipazının pH 10.00-10.80 arasında oldukça stabil olduğu ve pH 11.00'de aktivitenin % 80'inin geri kazanıldığı görülmüştür (Ghanem et al., 2000). *Bacillus*

licheniformis lipazı pH 7.00-12.00 arasında aktivitesinin % 80'den fazlasını korumuştur (Nthangeni et al., 2001). *Ophistoma piceae* lipazı pH 4.00-8.00 arasında, *Aspergillus terreus* lipazı ise, pH 4.00-10.00 arasında, *Pseudomonas* sp. lipazı, pH 6.00-12.00 arasında ve *Cryptococcus* sp. S-2 lipazı pH 5.00-9.00 arasında oldukça stabil olduğu belirlenmiştir (Gao and Breuil, 1998; Yadav et al., 1998; Dong et al., 1999; Kamini et al., 2000). *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazı pH 8.00-9.00'da 120 dakika boyunca oldukça stabil kalmış ve aktivitesinin, sırasıyla % 84 ve 82'sini geri kazanmıştır. Ancak pH 5.00'de tamamen inaktif olmuş ve pH 12.00'de ise orijinal aktivitesinin % 96'sını kaybetmiştir (Sharma et al., 2001). *Streptomyces rimosus* lipazının pH 4.00-10.00 arasında stabil olduğu ve aktivitenin pH 10.70'de yaklaşık % 55'i ve pH 11.20'de yaklaşık % 42'si geri kazanılmıştır (Abramic et al., 1999). *Rhizopus oryzae* lipazı, pH 4.50-7.50 arasında, *Bacillus* sp. GK8 lipazı pH 7.00-10.00 arasında ve *Pseudomonas* sp. LP7315 lipazı da pH 7.00-8.00 arasında stabil kalmıştır (Hiol et al., 2000; Dosanj and Kaur, 2001; Sakiyama et al., 2001). *Bacillus* sp. J33 lipazı ise, pH 7.00-9.50 arasında 30 dakika stabil kalmış, pH 6.80'de ve pH 10.00'da aktivitesinin % 75'ini geri kazanmıştır (Nawani et al., 1998).

Mikrobiyal esterazlar ve lipazlarla yapılan araştırmalarda, enzimin optimum sıcaklığının türler arasında oldukça büyük farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. *Ophistoma piceae* lipazının ve *Arthrobacter nicotianae* 9458 in esterazının 30 °C'de (Gao and Breuil, 1998; Smacchi et al., 2000), *Rhizopus oryzae* lipazının 35 °C'de (Hiol et al., 2000), *Cryptococcus* sp. S-2 lipazının ve *Lactobacillus casei* CL96 esterazının 37 °C'de (Kamini et al., 2000; Choi and Lee, 2001), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 ve *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 lipazlarının ve *Arthrobacter viscosus* esterazının 40 °C'de (Lin et al., 1996; Hong and Chang, 1998; Cui et al., 1999), *Pseudomonas fluorescens* esterazının 43 °C'de (Khalameyzer et al., 1999) optimum aktivite gösterdikleri saptanmıştır. *Aeromonas sobria* LP004 lipazının ve *Bacillus licheniformis* esterazının 45 °C'de (Lotrakul and Dharmstithi, 1997; Alvarez-Macarie et al., 1999), *Aspergillus terreus* ve *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazlarının 50 °C'de (Yadav et al., 1998; Sharma et al., 2001), *Streptomyces rimosus* lipazının 55 °C'de (Abramic et al., 1999) optimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. *Bacillus* sp. TG43 ve ATAD2 ve *Bacillus alcalophilus* lipazlarının ve *Bacillus circulans* esterazının 60 °C'de (Sugihara et al., 1991; Nawani et al., 1998; Bell et al., 1999; Ghanem et al., 2000; Kademi et al., 2000), *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazının 65 °C'de (Kakariari et al., 2000), *Bacillus stearothermophilus* lipazının 68 °C'de

(Kim et al., 2000), *Bacillus* sp. THL027 ve *Pseudomonas* sp. LP7315 lipazlarının 70 °C’de (Dharmsthiti and Luchai, 1999; Sakiyama et al., 2001), *Bacillus thermoleovorans* ID-1 lipazının 75 °C’de (Lee et al., 1999), *Pyrobaculum calidifontis* VA1 esterazının 90 °C’de (Hotta et al., 2002) optimum aktivite gösterdikleri saptanmıştır.

Mikrobiyal esteraz ve lipazların sıcaklık stabilitelerinin, genellikle optimum sıcaklıklarıyla ilişkili olduğu görülmüştür. Termostabiliteyi etkileyen diğer bir faktör de enzimin molekül ağırlığıdır. Düşük molekül ağırlıklı enzimler daha büyük olan temsilcilerine göre, genellikle daha yüksek bir termostabilite gösterirler. Esterazların molekül ağırlığı genellikle 20-160 kDa arasındadır. 1.57 kDa molekül ağırlığındaki termostabil bir esterazın 70 °C’de, 96 saat ve 90 °C’de 2 saat inkübe edildikten sonra orijinal aktivitesinin % 90’dan fazlasının geri kazandığı saptanmıştır (Simoes et al., 1997). 34.35 kDa molekül ağırlığına sahip bir karboksilesteraz ile yapılan çalışmada ise, enzimin 100 °C’de 2 saat inkübasyondan sonra halen aktivitesini tamamen koruduğu görülmüştür (Hotta et al., 2002). 40 kDa molekül ağırlığına sahip olan bir karboksilesteraz ile yapılan çalışmada ise, 105 °C’de 2 saat inkübe edildikten sonra, orijinal aktivitesinin % 90’ını koruduğu saptanmıştır (Owusu and Cowan, 1991). Buna karşın, 94 kDa molekül ağırlığına sahip bir termostabil esterazın 70 °C’de 1 saat inkübasyondan sonra aktivitesini tamamen koruduğu ancak 85 °C’de ise aktivitesinin % 50’sini geri kazanabildiği görülmüştür (Kademi et al., 2000). Molekül ağırlığı 117-128 kDa olduğu saptanan bir esterazın, 80 °C’de 1 saat inkübasyondan sonra aktivitesini tamamen koruduğu, 90 °C’de % 92’sini ve 100 °C’de ise % 50’sini geri kazandığı görülmüştür (Sobek and Görisch, 1988). *Bacillus licheniformis*’den elde edilen esteraz ise 64 °C’de 1 saat inkübasyondan sonra aktivitesinin % 50’sini geri kazanabilmiştir (Alvarez-Macarie et al., 1999).

Esteraz ve lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi konusunda yapılan araştırmalarda ise, kullanılan substrat tipine ve enzimin optimum koşullarına bağlı olarak, oldukça farklılık göstermektedir. *Bacillus subtilis* NRRL 365 esteraz I ve esteraz II substrat olarak p-nitrofenil asetat kullanıldığında Km değerleri sırasıyla, 0.91mM ve 0.67mM, *Bacillus stearothermophilus* esterazı fluorescien dibutirat kullanıldığında Km değeri 0.91 µM ve V_{max} değeri 35 ng dk⁻¹.(mg protein)⁻¹, *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazı α-naftil-asetat kullanıldığında Km değeri 1.2 mM ve V_{max} değeri 0.16 U.mg⁻¹, *Bacillus circulans* esterazı p-nitrofenil kaprilat kullanıldığında Km değeri 0.24 mM ve V_{max} değeri 4.3 nmol.min⁻¹ mg⁻¹, *Bacillus* sp. J33 lipazı pNP-laurat kullanıldığında Km değeri, 2.5

mM ve $V_{\max}$ değeri, $0.4 \mu\text{M min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ ve *Bacillus* sp. GK8 lipazı, p-nitrofenil laurat kullanıldığında ise, K_m değeri, 3.63 mM, $V_{\max}$ değeri ise, $0.26 \mu\text{M min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Meghji et al., 1990; Simoes et al., 1997; Kakariari et al., 2000; Kademi et al., 2000; Nawani and Kaur, 2000; Dosanj and Kaur, 2001).

Esterazlar kısa zincirli yağ asitlerinin ester bağlarını hidrolizleyebilirler. *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazının, sadece α -naftil-asetat (C2), α -naftil-propionat (C3) ve α -naftil-bütirat (C4)'ı hidrolizleyebildiği ve *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazının, β -naftil esterleri arasında en yüksek aktiviteyi β -naftil bütirat (C4)'a karşı gösterdiği, β -naftil asetat (C2), β -naftil kaproat (C6), β -naftil kaprilat (C8) ve β -naftil kaprat (C10) kullanıldığında ise, maksimum aktivitenin sırasıyla % 69, 74, 53 ve 36'sını gösterdiği, ayrıca C12-C18:1'lu yağ asitlerinin β -naftil esterlerine karşı ise hiçbir aktivite göstermediği saptanmıştır (Kakariari et al., 2000; Smacchi et al., 2000). *Bacillus licheniformis* esterazının kısa zincirli yağ asitlerine karşı aktivite göstermekle birlikte, maksimum aktivitesini p-nitrofenil kaproat (pNPC6)'a karşı gösterdiği, daha uzun zincirli substratlara (pNPC10-pNPC18) karşı ise, aktivitenin çok düşük olduğu (maksimum aktivitenin % 3'ünden az) saptanmıştır (Alvarez-Macarie et al., 1999). *Arthrobacter viscosus* esterazının en yüksek aktiviteyi asetik esterlere karşı göstermiş, p-nitrofenil asetatla (C2) karşılaştırıldığında, p-nitrofenil propionat (C3) karşı % 36 ve p-nitrofenil bütirata (C4) karşı ise sadece % 3 aktivite gösterdiği, p-nitrofenil kaproat (C6), p-nitrofenil kaprilat (C8) ve p-nitrofenil laurat (C12)'a karşı ise hiçbir aktivite göstermediği saptanmıştır (Cui et al., 1999). *Bacillus circulans* esterazı, maksimum aktivitesini pNPC2'ye karşı göstermiş, daha uzun zincirli yağ asitleri kullanıldığında (pNPC4-pNPC8) aktivite hızlı bir şekilde düşmüş ve karbon zincir uzunluğu 8'den büyük olan substratlara karşı ise, aktivitenin oldukça azaldığı belirlenmiştir (Kademi et al., 2000). *Bacillus licheniformis*'den elde edilen esteraz, p-nitrofenil kaprilat (pNPC8) kullanıldığında 1.6 U mg^{-1} aktivite gösterirken, p-nitrofenil palmitat (pNPC16) ile aktivitenin normalden 600 kat daha düşük olduğu (0.0026 U mg^{-1}) görülmüştür (Alvarez-Macarie et al., 1999). Termofilik bakteri soylarının esteraz aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada, pNPC8 kullanılarak, substrat spesifitesine bakıldığında, pNPC2'deki aktivitenin pNPC8'dekinden 7.5 kat fazla olduğu görülürken, pNPC16'daki aktivitenin ise yaklaşık 190 kat daha az olduğu saptanmıştır (Kademi et al., 1999).

Lipazlar daha geniş bir substrat aralığı göstermekle birlikte, uzun zincirli yağ asitlerine karşı daha yüksek bir aktivite gösterirler. Lipazların substrat spesifiteleri ile yapılan

çalışmalarda ise, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 lipazının maksimum aktivitesini laurat (C12) ve miristat (C14)'a karşı gösterdiği ve lipolitik aktivitenin kısa-zincirli yağ asidi esterlerine karşı oldukça düşük olduğu grlmştş (Lin et al., 1996). *Bacillus thermoleovorans* ID-1 BTID-A ve BTID-B lipazlarının ikisi de, maksimum aktiviteilerini trikaprilin (C8) ve trikaprin (C10) zerine göstermiştir (Lee et al., 1999). *Aeromonas sobria* LP004, *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 ve *Bacillus* sp. THL027 lipazları maksimum aktiviteilerini trikaprilin (C8) zerine göstermiştir, *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 lipazının triasetine karşı ise aktivitesi yok denecek kadar azdır (Lotrakul and Dharmsthiti, 1997; Rua et al., 1997; Dharmsthiti and Luchai, 1999). Bunların dışında, çeşitli mikrobiyal lipazlarla yapılan substrat spesifitesi çalışmalarında, uzun zincirli yağ asit esterlerine karşı daha yüksek aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Gao and Breuil, 1998; Hong and Chang, 1998; Abramic et al., 1999; Hiol et al., 2000; Kamini et al., 2000; Sakiyama et al., 2001; Lee et al., 2001; Lescic et al., 2001).

Çeşitli metal iyonlarının mikrobiyal lipaz ve esterazlar üzerine etkisi ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Hem esterazların hem de lipazların genellikle Hg^{+2} tarafından inhibe edildiği grlmştş. *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazı, Cu^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Fe^{+2} ile tamamen ve Zn^{+2} ile ise, kısmen inhibe edilmiştir (Kakariari et al., 2000). *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazı, Ca^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} ile kısmen inhibe olmuş, ancak Fe^{+2} ve Sn^{+2} ise, tamamen inaktivasyona neden olmuştur. Mg^{+2} ve Na^{+} ise aktivite üzerine hiçbir etkide bulunmamıştır (Smacchi et al., 2000). *Bacillus licheniformis* esterazı üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi incelendiğinde ($ZnCl_2$, $CoCl_2$, $FeCl_3$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $CuCl_2$, $SnCl_2$, $HgCl_2$) bunların, enzimi ne aktive ne de inhibe ettikleri saptanmıştır (Alvarez-Macarie et al., 1999). *Bacillus* soyunun esterazı, $HgCl_2$ ile sadece % 8.4 oranında inhibe olurken (Owusu and Cowan, 1991), *Bacillus subtilis* NRRL 365 esteraz I-II'si ve *Arthrobacter viscosus* esterazı tamamen inhibe olmuştur (Meghji et al., 1990; Cui et al., 1999).

Bacillus sp. lipazını, Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} iyonları % 70 oranında inhibe etmiş, buna karşın Mg^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} , Cd^{+2} , Sn^{+2} ve Ba^{+2} iyonları enzim aktivitesini etkilememiştir (Sugihara et al., 1991). *Bacillus licheniformis* lipazının Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Sn^{+2} ile kalan aktivitesi, sırasıyla % 98, 95 ve 92'dir. Cu^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Mn^{+2} ve Ni^{+2} lipaz aktivitesini inhibe etmiş ve aktivitenin yaklaşık % 60'ı, Zn^{+2} ve Co^{+2} ile ise, aktivitenin % 30'dan daha azı geri kazanılmıştır. Bununla beraber Hg^{+2} lipaz aktivitesini tamamen inhibe etmiştir

(Nthangeni et al., 2001). *Bacillus thermoleovorans* ID-1 lipazı, Ca^{+2} ve Zn^{+2} (1 mM) ile aktive edilmiş (kalan aktivite sırasıyla % 118 ve % 126), Li^{+2} , Mn^{+2} , K^{+} , Na^{+} ve Mg^{+2} enzim aktivitesini önemli ölçüde etkilememiştir (Lee et al., 1999). *Bacillus* sp. THL027 lipazı Fe^{+3} tarafından % 53 oranında inhibe edilmiş, Cu^{+2} ve Co^{+2} varlığında aktivitenin % 85'den, Ca^{+2} ve K^{+} da % 75'den ve Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} ve NH_4^{+2} da ise, % 65'den fazlası geri kazanılmıştır (Dharmsthiti and Luchai, 1999). *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazı Ca^{+2} , Na^{+} , Mg^{+2} ve Ba^{+2} varlığında aktive olurken, Cs^{+} , K^{+} , Co^{+2} ve Zn^{+2} enzim aktivitesinin yaklaşık yarısını inhibe etmiştir (Sharma et al., 2001). *Bacillus thermoleovorans* ID-1'den BTID-A ve BTID-B olarak iki termostabil lipaz izole edilmiştir. BTID-A'nın aktivitesi, Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Co^{+2} tarafından inhibe edilirken, BTID-B lipazı Ca^{+2} , Co^{+2} , Na^{+} ve Mn^{+2} tarafından az da olsa aktive edilmiştir (Lee et al., 2001). *Bacillus* sp. GK 8 lipazı, MgSO_4 , Na_2CO_3 , BaCl_2 , NaCl ve Na_2CO_3 ile aktivite artırmış, KCl , LiCl ve CaCl_2 aktiviteyi etkilememiş, Co^{+2} , Zn^{+2} ve Ni^{+2} ise aktiviteyi inhibe etmiştir. Hg^{+2} ise aktiviteyi sadece % 20 oranında inhibe etmiştir (Dosanj and Kaur, 2001). *Bacillus* sp. J33 lipazı, Mg^{+2} , Na^{+} ve Li^{+} ile sırasıyla, % 63, 63 ve 23 oranında aktive edilmiş, Hg^{+2} ve Cd^{+2} kuvvetli bir inhibitör etkide bulunmuş, Ca^{+2} , Fe^{+2} ve K^{+} varlığında ise aktivite tamamen geri kazanılmıştır (Nawani et al., 1998).

Bir kelat ajanı olan EDTA'nın mikrobiyal esterazlar üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda genelde mikrobiyal esterazlar üzerine ya hiçbir etkide bulunmadığı ya da kısmen etkili olduğu saptanmıştır. *Sulfolobus acidocaldarius* (Sobek and Görisch, 1988), *Bacillus licheniformis* (Alvarez-Macarie et al., 1999), *Arthrobacter viscosus* (Cui et al., 1999) ve *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 (Kakariari et al., 2000) esterazları üzerine EDTA'nın herhangi bir inhibe edici etkisi saptanamamıştır. *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazı ile yapılan bir çalışmada ise, enzim EDTA ile muamele edildiğinde aktivitesinin % 42'sini geri kazanabilmiştir (Smacchi et al., 2000).

EDTA'nın mikrobiyal lipazlar üzerine etkisi ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, EDTA bazı lipazlar üzerinde inhibe edici etki yapmamış, bazıları üzerine ise kısmen de olsa inhibe edici bir etki yapmıştır. *Bacillus* sp. (Sugihara et al., 1991), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 (Lin et al., 1996), *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 (Hong and Chang, 1998), *Aspergillus terreus* (Yadav et al., 1998), *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee et al., 1999), *Streptomyces rimosus* (Abramic et al., 1999), *Cryptococcus* sp. S-2 (Kamini et al., 2000), *Bacillus* sp. RSJ-1 (Sharma et al., 2001) ve *Pseudomonas* sp. LP7315 (Sakiyama et al., 2001) lipazları üzerine EDTA'nın herhangi bir

inhibe edici etkisi saptanamamıştır. *Bacillus* sp. GK 8 lipazı ise, EDTA varlığında aktivitesinin % 90'dan fazlasını geri kazanmıştır (Dosanj and Kaur, 2001). *Aeromonas sobria* LP004 lipazı EDTA varlığında aktivitesinin % 85'den fazlasını (Lotrakul and Dharmsthiti, 1997) ve *Bacillus* sp. J33 lipazı ise, EDTA varlığında aktivitesinin % 40'ını kaybetmiştir (Nawani et al., 1998). *Bacillus* sp. THL027 lipazının EDTA'ya karşı oldukça hassas olduğu görülmüştür (Dharmsthiti and Luchai, 1999). *Bacillus stearothermophilus* P1 lipazının, EDTA varlığında aktivitesinin % 76'sı kalmıştır (Sinhaikul et al., 2001). *Bacillus thermoleovorans* ID-1 BTID-A ve BTID-B lipazları EDTA ile muamele edildikten sonra kalan aktiviteleri sırasıyla, % 32 ve % 55 olarak bulunmuştur (Lee et al., 2001).

Esterazlar genelde katalizden sorumlu olan aktif bölgelerinde serin amino asidi içerirler. Bu nedenle, bir serin grubu inhibitörü olan fenil metil sülfonil fulorit (PMSF) tarafından, kuvvetle inhibe edilirler. Lipazların da aktif bölgelerinde serin amino asidi bulunmaktadır. Ancak, lipazlar genellikle aktif bölgenin etrafını çeviren, ara-yüzey aktivasyonu ile ilişkili hidrofobik bir alana sahiptirler. Bu nedenle lipazlar genellikle PMSF tarafından inhibisyona uğramazlar ya da çok az bir inhibisyon gözlenir (Fojan et al., 2000; Sharma et al., 2001). *Sulfolobus acidocaldarius* ve *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazları PMSF tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir (Sobek and Görisch 1988; Smacchi et al., 2000). *Bacillus* genusuna ait bir soydan elde edilen esteraz 1 mM PMSF tarafından, % 40 oranında inhibe edilmiş, 10 mM denendiğinde ise, % 100'lük bir inhibisyon gözlenmiştir (Owusu and Cowan, 1991). Hipertemofilik bir arkeon olan *Pyrobaculum calidifontis* VA1 esterazı ise, PMSF tarafından % 94 oranında inhibe edilmiştir (Hotta et al., 2002). *Bacillus subtilis* NRRL 365, *Arthrobacter viscosus*, *Bacillus licheniformis* ve *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazları ise PMSF'den önemli oranda etkilenmemişlerdir (Meghji et al., 1990; Cui et al., 1999; Alvarez-Macarie et al., 1999; Kakariari et al., 2000).

Bacillus licheniformis lipazı PMSF tarafından % 60 oranında, (Nthangeni et al., 2001) ve *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 lipazı, 10 mM PMSF tarafından inhibe olmuştur (Hong and Chang, 1998). *Ophistoma piceae* lipazı % 6, *Bacillus thermoleovorans* ID-1 lipazı % 36, *Bacillus stearothermophilus* P1 lipazı % 77 oranında PMSF ile inhibe edilmiştir (Gao and Breuil, 1998; Lee et al., 1999; Sinhaikul et al., 2001). *Aeromonas sobria* LP004, *Streptomyces rimosus* ve *Rhizopus oryzae* lipazları PMSF'den etkilenmemişlerdir (Lotrakul and Dharmsthiti, 1997; Abramic et al., 1999; Hiol et al., 2000). *Bacillus* sp. J33 ve *Bacillus* sp. GK8 lipazlarının PMSF varlığında sırasıyla, % 60 ve 65 oranında inhibe oldukları saptanmıştır (Nawani et al., 1998; Dosanj and Kaur, 2001).

Aeromonas sobria LP004, *Acinetobacter radioresistens* CMC-1, *Aspergillus terreus* ve *Bacillus licheniformis* lipazları disülfid bağlarının inhibitörü olan β -merkaptetanol'den etkilenmemiştir (Lotrakul and Dharmstithi, 1997; Hong and Chang, 1998; Yadav et al., 1998; Nthangeni et al., 2001). *Bacillus thermoleovorans* ID-1 ve *Bacillus stearothermophilus* P1 lipazları β -merkaptetanol tarafından çok az inhibe edilmişlerdir (Lee et al., 1999; Sinchaikul et al., 2001). *Streptomyces rimosus* lipazı ise β -merkaptetanol tarafından yaklaşık % 20 oranında inhibe edilmiştir (Abramic et al., 1999).

Organik çözücülerin esteraz aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Buna karşın, bu konuda lipazlar üzerine daha çok çalışılmıştır. Aslında her iki enzim de organik çözücülerde stabil ve aktiftir, ancak bu özellik daha çok lipazlar için geçerlidir (Bornscheuer, 2002). *Arthrobacter viscosus* esterazı, % 50'lik (v/v) asetonitril ve dimetilsülfoksit (DMSO) ile aktivitesinin % 60'ını, % 30'luk tetrahidrofuran, N,N-dimetilformamid ve dioksanda ise, orijinal aktivitenin % 50'den fazlasının kaybettiği saptanmıştır (Cui et al., 1999). Hipertermofilik bir bakteri olan *Pyrobaculum calidifontis* VA1 % 50 ve % 80'lik metanol, etanol, 2-propanol, asetonitril, dimetilsülfoksit (DMSO) ve dimetilformamid'e karşı oldukça yüksek bir stabilite gösterdiği belirlenmiştir (Hotta et al., 2002). *Bacillus* sp. lipazı % 20-60'lık aseton aktive ettiği görülmüş, ancak % 60'ın üzerinde aktivitede hızlı bir düşüş gözlenmiştir. Bunun aksine, hekzanın bütün konsantrasyonları enzimi inhibe etmiştir (Sugihara et al., 1991). *Cryptococcus* sp. S-2 lipazı dietil eter, kloroform ve hekzan karşısında stabilitesini büyük oranda korumuştur. Ancak, % 50'lik benzen ve etanol sırasıyla, % 46.3 ve 47.4 oranında inhibisyona neden olmuştur (Kamini et al., 2000). *Bacillus* sp. THL027 lipazı, % 50'lik isopropanol ve metanol varlığında aktivitesinin % 87'sini, etanol ve asetonitril varlığında % 76'sını ve aseton varlığında % 65'ini geri kazanmıştır (Dharmstithi and Luchai, 1999). *Aspergillus terreus* lipazı % 90'lık etanol ve % 40'lık propan-2-ol varlığında inhibe olmuştur (Yadav et al., 1998). *Streptomyces rimosus* lipazı % 50'lik 1,4-dioksan ile % 100, asetonitril ile % 92, etanol ile % 91, aseton ile % 80 ve DMSO ile % 63 oranında aktivitesini geri kazanmıştır (Lescic et al., 2001). *Bacillus thermocatemulatus* lipazı % 30'luk metanol, 2-propanol ve aseton tarafından çok az inhibe olmuştur (Rua et al., 1997). *Rhizopus oryzae* lipazı metanol, etanol ve aseton tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir (Hiol et al., 2000). *Bacillus* sp. J33 lipazı % 50'lik metanol, propanol, asetonitril ve dioksan tarafından inhibe edilmiş, % 60'lık benzen, hekzan ve DMSO

tarafından kuvvetle stimüle edilmiş ve % 90'luk benzen ve hekzan ile ise, kuvvetle stimüle edildiği saptanmıştır (Nawani et al., 1998).

Polihidrik alkollerin enzim aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar oldukça az olup genellikle araştırmalar lipazlar üzerinedir. *Bacillus* sp. J33 lipazının etilen glikol, gliserol ve sorbitol tarafından aktive edildiği görülmüştür (Nawani and Kaur, 2000). *Bacillus* sp. GK8 lipazının, ortama % 30 glikol ve gliserol eklendiğinde tamamen stabil kaldığı görülmüştür (Dosanj and Kaur, 2001).

Pseudomonas pseudoalcaligenes F-111 lipazı sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum tripolifosfat, sodyum dodesil benzen sulfonat ve sodyum alkilbenzen sulfonat gibi katyonik deterjanlardan etkilenmezken, non-iyonik deterjanlar, aktive edici etkide bulunmuş ve enzim aktivitesi, Triton X-100 ile % 149, Tween 80 ile % 111 ve Span 80 ile % 134 oranında geri kazanılmıştır (Lin et al., 1996). *Bacillus thermoleovorans* ID-1 lipazı SDS varlığında aktivitesinin % 30'unu geri kazanabilmiştir (Lee et al., 1999). *Bacillus* sp. THL027 lipazı % 1 oranında SDS ile 2 saat inkübasyondan sonra % 90 ve 24 saat inkübasyondan sonra % 87 oranında aktif kalmıştır (Dharmstithi and Luchai, 1999). *Aspergillus terreus*'un lipaz aktivitesi üzerine iyonik ve non-iyonik deterjanların etkisi 2.5-20 mM'lık konsantrasyonlarda denenmiş ve bütün iyonik deterjanların (sodyum deoksikolat, saponin, sodyum taurokolat, SDS) enzim aktivitesini inhibe ettiği, non-iyonik deterjanların (Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, n-octyl- β -D-glukopiranozid) ise aktive ettiği belirlenmiştir. SDS'nin güçlü bir inhibitör, n-octyl- β -D-glukopiranozid'in ise iyi bir aktivatör olduğu sonucuna varılmıştır (Yadav et al., 1998). *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazının non-iyonik deterjanlara karşı oldukça stabil olduğu ve Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 ile orijinal aktivitenin sırasıyla, % 100, 92 ve 82'sini geri kazandığı belirlenmiştir. Buna karşın enzimin, anyonik deterjanlara karşı daha az stabil olduğu ve deoksikolat ile aktivitenin % 54'ünü geri kazandığı saptanmıştır (Sharma et al., 2001). *Bacillus thermocatenulatus* lipazı SDS, Tween 20 ve Tween 80 tarafından inhibe edilirken, kolat ve Triton X-100'ün aktiviteyi % 80, CHAPS'ın ise % 40 oranında artırdığı belirlenmiştir (Rua et al., 1997). Diğer bir lipazla yapılan çalışmada ise, Triton X-100'ün enzim aktivitesini kuvvetle inhibe ettiği belirlenmiştir (Margesin et al., 2002). *Rhizopus oryzae* lipazı sodyum kolat ve taurokolat tarafından aktive edilirken, SDS tarafından inhibe edilmiştir (Hiol et al., 2000). *Bacillus* sp. GK8 lipazı Brij 35, setrimid ve Triton X-100 ile aktivitesini tamamen kaybettiği, SDS ile aktivitenin artığı, Tween 80, Tween 60 ve sodyum taurokolatın ise aktiviteyi etkilemediği saptanmıştır (Dosanj and Kaur, 2001). *Bacillus* sp. J33

lipazının Triton X-100, Tween 80, Tween 20 ve deoksikolik asit varlığında sırasıyla % 40, 20, 60 ve 40 oranında stimule edildiği, SDS varlığında ise tamamen inhibe olduğu belirlenmiştir (Nawani et al., 1998).

Bir çok çalışmada mikrobiyal kaynaklardan esteraz ve lipazların saflaştırılması amacıyla çok çeşitli saflaştırma teknikleri kullanılmıştır (amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, elektroforez, izoelektrik fokus, jel filtrasyonu, iyon değişim kromatografisi, affinite kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve yoğunluk gradyanlı santrifüjleme gibi). Bu araştırmalarda, saflaştırma tekniklerinden biri veya birkaçının birlikte kullanılmasıyla, bu enzimler kısmi veya tamamen saflaştırılmıştır (Sobek and Görisch 1988; Meghji et al., 1990; Kordel et al., 1991; Sztajer et al., 1992; Maliszewska and Mastalerz, 1992; Lee et al., 1993; Schmidt-Dannert et al., 1997; Simoes et al., 1997; Cui et al., 1999; Kakariari et al., 2000; Smacchi et al., 2000; Pernas et al., 2000; Nawani and Kaur, 2000; Kim et al., 2000; Kamini et al., 2000; Sakiyama et al., 2001; Sharma et al., 2001).

Mezofilik enzimler, enzim stabilitesinin olmamasından veya noksanlığından dolayı sert reaksiyon koşullarında gerçekleşen endüstriyel işlemler için, genellikle pek uygun değildirler. Bu enzimlerin endüstriyel kullanımını sınırlayan en önemli unsur, endüstriyel koşullar altında başta yüksek sıcaklıklar karşısında stabil olmamalarıdır. Bu yüzden, yeni termostabil enzimlerin araştırılması, yeni uygulamaların geliştirilmesi için önemlidir. Ayrıca, enzimin organik çözücülerde denatürasyona karşı dirençli olmasının sudaki termostabiliteleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple, termostabil enzimler, yalnızca sulu ortamlarda değil, organik ortamlarda kullanılırken de caziptir (Meghji et al., 1990; Kademi et al., 1999). Bu nedenle, eskiden potansiyel endüstriyel pazarda organik reaksiyonlar için biyokatalizörlerin kullanımı sınırlıydı. Yeni ekstremofilik mikroorganizmaların keşfedilmesiyle bu mikroorganizmaların enzimleri biyokatalizlerde önemli bir yer almıştır. Ekstremofilik mikroorganizmalar termofiller, asidofiller, alkalofiller, psikrofiller ve barofiller (piezofiller) gibi çeşitli ekstrem çevrelerde yaşayan organizmalardır. Bu organizmalar, derindeniz hidrotermallerinde, sıcak su kaynaklarında ve sülfürlü alanlar gibi ekstrem ekolojik çevrelerde yaşamaya adapte olmuşlardır. Bunun sonucu olarak bu mikroorganizmalar, mezofilik temsilcilerinin yaşayamadığı koşullar altında iş gören eşsiz biyokatalizörler üretirler ve böylece yeni endüstriyel işlemlerin gelişimine katkıda bulunurlar (Demirjian et al., 2001).

Esterazlar hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde bulunurlar. Memeli kaynaklı esterazlar ve lipazlar üzerine bir çok çalışma yapılmış ve karakterizasyonları

yapılmıştır. Günümüzde, pahalı memeli enzimlerine karşı iyi bir alternatif olan mikrobiyal lipolitik enzimlere olan ilgi artmaktadır. Bu enzimler, karbon kaynaklarına kolaylıkla girebilmeleri veya birçok katabolik metabolizmada iş gördüklerinden dolayı, geniş bir substrat spesifitesi gösterirler. Ayrıca, esterazların yüksek bir yer spesifitesi ve stereospesifite de gösterirler ki, bu özellik onları, optikçe saf-kimyasalların sentezinde oldukça cazip biyokatalizörler yapar. Bakteriyal esterazlar, bir kofaktöre ihtiyaçlarının olmaması, geniş bir optimum pH aralığına sahip olmaları, organik çözücülerde genellikle oldukça stabil ve hatta aktif olmaları, sadece lipidlerin hidrolizi için değil, aynı zamanda endüstriyel olarak değerli özel ürünlerin sentezi için de kullanılmaları, araştırmaların bu enzimler üzerine yoğunlaşmasını sağlamıştır. Mikrobiyal lipolitik enzimler konusunda ülkemizde yapılan çalışma sayısı yok denecek kadar azdır (Fadıloğlu ve Erkmen, 2002; Yılmaz, 2002). Bu nedenlerden dolayı, Aydın ili Germencik ilçesi Bozköy-Alangüllü termal sularından izole edilen, optimum 65 °C’de ve pH 6.00’da gelişen termofilik *Bacillus* sp. 4 izolatının esterazı kısmi olarak saflaştırılarak, enzimin optimum pH ve sıcaklığı, pH ve sıcaklık stabilitesi, substrat konsantrasyonunun etkisi, substrat spesifitesi, metal iyonlarının, EDTA’nın, polihidrik alkollerin, inhibitörlerin, çeşitli deterjanların ve organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi gibi karakterizasyon çalışmaları yapılarak, gelecekteki yeni potansiyel endüstriyel işlemlerin gelişimine katkıda bulunması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Pepton, nutrient agar, agar-agar, p-nitrofenol (pNP), Folin-Ciocalteu fenol belirteci, gliserol, Triton X-100, Tween 80, sodyum dodesil sülfat (SDS), etanol, metanol, β -merkaptotanol, etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA- $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), sodyum sitrat, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $NaNO_3$, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, KNO_3 , $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, H_3BO_3 , $CoCl_2$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, H_2SO_4 , $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, CH_3COONa , CH_3COOH , Na_2CO_3 , $NaHCO_3$, NaOH, $HgCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve KCl; Merck (Darmstadt, Germany) firmasından; p-nitrofenil asetat (pNPA), p-nitrofenil laurat (pNPL) ve fenil metil sülfonil florid (PMSF); Fluka (Buchs, Switzerland) firmasından; p-nitrofenil butirat (pNPB), p-nitrofenil palmitat (pNPP), sığır serum albumini (BSA) ve Brij 35; Sigma (Taufkirchen, Germany) firmasından, Na_2O_3Se , LiCl, 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilamonyo]-1-propansulfonat (CHAPS), n-hekzadesil trimetilamonyum bromid (Setrimid), nitrilotriasetik asit ve sodyum taurokolat AVOCADO (Karlsruhe, Germany) firmasından; etilen glikol, Tween 20, 1,4-dioksan, dimetilsülfoksit (DMSO), $(NH_4)_2SO_4$ ve aseton Pancreac (Barcelona, Spain) firmasından; D-sorbitol, n-oktil- β -D-glikopiranozit ve sodyum deoksikolat ACROS (Geel, Belgium) firmasından; maya özütü idg (Lancashire, UK) firmasından, asetonitril sds (Peypin, France) firmasından sağlanmıştır.

2. 2. Mikroorganizmanın Seçimi

2. 2. 1. Tween 80 agar yöntemi

Aydın ili Germencik ilçesi Bozköy-Alangüllü termal sularından *Bacillus* genusuna ait 5 izolat elde edilmiştir (Başbülbul, 2002). Bu çalışmada izolatların 4 °C de yatık Thermus agar ortamında saklanan stok kültürleri kullanılmıştır. Thermus agar ortamının içeriği Tablo 1-3 de sunulmuştur. Bu kültürler, 120 °C'de, 1.5 psi'de 20 dakika Hirayama marka otoklavda sterilize edilmiş 10 ml Thermus ortamı içeren tüplere inoküle edilerek, Heraeus marka etüvde 65 °C sıcaklıkta bir gece inkübe edilmiştir.

Bu izolatların esteraz üretilip üretilmediğini tayin etmek için, Tween 80 agar yöntemi kullanılmıştır (Haba et al., 2000). Bu yöntem gere, Tween 80 agar ortamında lipolitik

aktivite gösteren bakteriler, Tween 80'i substrat olarak kullandığında açığa çıkan oleik asit ortamdaki Ca ile birleşip çökerek besiyerindeki kolonilerin çevresinde opak bir zon oluşturmaktadır. Bu zon oluşumu da bakterinin lipolitik aktivite gösterdiğinin işaretidir. Oluşan opak zonun çapı lipolitik aktivitenin derecesini göstermektedir. Bu prensibe dayanarak elde edilen izolatların lipolitik aktivite gösterip göstermediği ve lipolitik aktivite derecesi aşağıdaki yöntemle belirlenmiştir.

% 0.01' lik $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ içeren nutrient agar ortamı ve Tween 80 ayrı olarak 120 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilize edilen bu ortam 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, Tween 80 final konsantrasyonu % 1 olacak şekilde steril koşullarda agar ortamına eklendi. Tween 80 tamamen çözünene kadar karıştırıldı ve daha sonra steril koşullarda petrilere döküldü. Bir gece inkübe edilen kültürlerden, steril koşullarda steril saf sulara 10^3 , 10^4 ve 10^5 'lik seyreltmeler yapıldı. Bu seyreltilmiş kültürlerden, petrilere 0.1 ml inoküle edildi. Petriler 65 °C'de, etüvde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında opak zon oluşumu kontrol edildi. Opak zon oluşumu gösteren bakteri kolonilerinin çapları ölçülerek en iyi derecede lipolitik aktivite gösteren izolat bundan sonraki denemeler için seçildi. Ayrıca, *Bacillus* sp. izolatları kontrol amaçlı olarak nutrient agar ortamında da geliştirildi. D3, D4, 1, 3 ve 4 numaralı izolatlar arasında en iyi zon oluşumu 4 numaralı izolatta gözlemlendi ve çalışmalara bu izolatla devam edildi.

2. 3. Bakteri Straininin Karakterizasyonu

Aydın ili Germencik ilçesi Bozköy-Alangüllü termal sularında, sıcaklığı 59 °C ve pH'sı 6.50 olan doğal kaynak suyundan izole edilen *Bacillus* sp. 4 Bergey' in Sistematik Bakteriyoloji kriterlerine göre tanımlanmıştır. Organizma, Gram pozitif, çubuk şeklinde, endosporlu, kapsül oluşturmaktadır. Bu izolat, *Bacillus* genusuna ait tipik morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakteristikleri göstermektedir. Organizma 40 °C'nin altında gelişme gösterememekte ve optimum 65 °C'de gelişmektedir. Bu nedenle termofilik olarak nitelendirilmiştir (Başbülbül, 2002).

2. 3. 1. Büyüme eğrisi

Yatık Thermus agar stoklarında saklanan *Bacillus* sp. 4 izolatı, kısmi olarak değiştirilen Thermus agar ortamında saklandı (Tablo 4). Organizmanın büyüme eğrisi daha önceden belirlenen optimum koşullar altında (65 °C'de ve pH 6.00'da) belirlendi

(Başbülül, 2002). *Bacillus* sp. 4 izolatı kısmi olarak değiştirilen yatık Thermus agar ortamından 10 ml üretim ortamına (kısmi olarak değiştirilmiş Thermus ortamı, Tablo 5) inoküle edildi ve 65 °C sıcaklıktaki etüvde bir gece inkübe edildi. Gecelik kültürden, 100 ml üretim ortamı içeren 250 ml'lik erlene, 1ml inoküle edildi ($OD_{600} = 0.1$). Bu kültür, 65 °C sıcaklıktaki Memmert marka çalkalamalı su banyosunda, 150 rpm hızda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon esnasında 0. saatten itibaren her saat başı kültürden örnekler alınarak sıcaklık kontrollü Shimadzu UV-1601 model spektrofotometride 600 nm dalga boyunda ölçüm alındı.

Tablo 1. Thermus agar ortamı

Kimyasal Maddeler	Miktarı
Tripton	% 0.3
Maya özütü	% 0.1
Castenholz 10X bazal tuz çözeltisi	% 10 (v/v)
Agar-agar	% 2

Tablo 2. Castenholz 10x bazal tuz çözeltisi

Kimyasal Maddeler	Miktarı
Nitilotriasetik asit	% 0.1
CaSO ₄ .2H ₂ O	% 0.06
MgSO ₄ .7H ₂ O	% 0.1
NaCl	% 0.008
NaNO ₃	% 0.689
Na ₂ HPO ₄	% 0.111
KNO ₃	% 0.103
Ferrik klorit çözeltisi (0.28g/L)	% 1 (v/v)
Nitsch iz element çözeltisi	% 1 (v/v)

Tablo 3. Nitsch' in iz element çözeltisi

Kimyasal Maddeler	Miktarı
H ₃ BO ₃	% 0.05
CoCl ₂ .6H ₂ O	% 0.0046
CuSO ₄ .5H ₂ O	% 0.0016
MnSO ₄ .H ₂ O	% 0.22
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	% 0.0025
H ₂ SO ₄	% 0.05 (v/v)
ZnSO ₄ .5H ₂ O	% 0.05

Tablo 4. Kısmi olarak modifiye edilmiş Thermus agar ortamı

Kimyasal Maddeler	Miktarı
Pepton	% 0.2
Maya özütü	% 0.1
Castenholz 10X bazal tuz çözeltisi	% 10 (v/v)
Agar-agar	% 2

Tablo 5. Kısmi olarak modifiye edilmiş Thermus ortamı

Kimyasal Maddeler	Miktarı
Pepton	% 0.2
Maya özütü	% 0.1
Castenholz 10X bazal tuz çözeltisi	% 10 (v/v)

2. 3. 2. Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisi

Bacillus sp. 4 izolatı, kısmi olarak değiştirilen yatık Thermus agar ortamından 10 ml üretim ortamına inoküle edildi ve 65 °C sıcaklıktaki etüvde bir gece inkübe edildi. Bu gecelik kültürden, 100 ml üretim ortamı içeren 250 ml'lik erlene 1ml inoküle edildi ($OD_{600} = 0.1$). Bu kültür, farklı sıcaklıklarda (50, 55, 60, 65 ve 70 °C) ve pH 6.00 da çalkalamalı su banyosunda, 150 rpm hızda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon esnasında 0. saatten itibaren her saat başı kültürden örnekler alınarak, sıcaklık kontrollü spektrofotometride 600 nm dalga boyunda ölçüm alındı ve log fazının ortalarından itibaren enzim aktivitesi tayin edildi.

2. 3. 3. Ortam pH' sının enzim üretimi üzerine etkisi

Bacillus sp. 4 izolatı, kısmi olarak değiştirilen yatık Thermus agar ortamından 10 ml üretim ortamına inoküle edildi ve 65 °C sıcaklıktaki etüvde bir gece inkübe edildi. Gecelik kültürden, 100 ml üretim ortamı içeren 250 ml'lik erlene 1ml inoküle edildi ($OD_{600} = 0.1$). Bu kültür, farklı pH'lardaki üretim ortamında (pH 5.00; 5.50; 6.00; 7.00; 8.00; 9.00) ve 65°C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda 150 rpm hızda 9 saat inkübasyona bırakıldı ve 9. saat sonunda (durgunluk fazının ortasında) enzim aktivitesi tayin edildi.

2. 3. 4. *Bacillus* sp. 4 izolatının büyüme eğrisine bağlı olarak ortam pH'sı ve enzim aktivitesindeki değişim

Bacillus sp. 4 izolatı kısmi olarak değiştirilen yatık Thermus agar ortamından 10 ml üretim ortamına inoküle edildi ve 65 °C sıcaklıktaki etüvde bir gece inkübe edildi. Bu gecelik kültürden, 100 ml üretim ortamı içeren 250 ml'lik erlene 1ml inoküle edildi ($OD_{600}=0.1$). Bu kültür, optimum koşulları olan 65°C ve pH 6.00'da çalkalamalı su banyosunda 150 rpm hızda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon esnasında 0. saatten itibaren her saat başı kültürden örnekler alınarak sıcaklık kontrollü spektrofotometride 600 nm dalga boyunda absorbansı, ortam pH'sı (WTW model Multiline P4 pH metre) ve enzim aktivitesi ölçüldü.

2. 4. Enzimin Üretimi

Yatık agar stoklarında 4°C'de saklanan *Bacillus* sp. 4 izolatından, 10 ml'lik üretim ortamı içeren tüpe inoküle edilerek bir gece inkübasyona bırakıldı. Gecelik kültürden, 100 ml üretim ortamı içeren 1L'lik erlene 1ml inoküle edildi ($OD_{600}=0.1$). Kültür, 65°C'de, pH 6.00'da 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 9 saat boyunca inkübe edildi. 9. saatte inkübasyon sonlandırıldı. Bu kültür daha sonra enzimin kısmi saflaştırılması ve lokalizasyonu için kullanıldı.

2. 5. Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Lokalizasyonu

Enzim üretimi yapılan kültür ortamı, 5.500 g'de 4°C'de 15 dakika Hettich model Universal 32 R tipi santrifüjde santrifüjlenerek süpernatant 1 (S_1) ve presipitant 1 (P_1) ayrıldı. P_1 , yaş hücre ağırlığı, 100 ml'sinde 50 g olacak şekilde pH 6.00 0.05 M fosfat tamponunda çözüldükten sonra buzlu ortamda Bandelin HD 2200 (MS 73) marka sonikatörde 20 kHz hızda ve 3 siklusa 5 dakika boyunca sonike edildi. Sonikasyondan sonra parçalanmış hücre artıklarını ayırmak için, 5.500 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant tekrar 23.900 g'de 1 saat boyunca santrifüjlendi. Süpernatant 2 (S_2) ve presipitant 2 (P_2) birbirinden ayrıldı. Hacmi ölçülen S_2 'ye 0°C'de doymuş % 85'lik amonyum sülfat yavaş yavaş eklenerek 0 °C'deki inkübatörde (VELP Scientifica model FTC 90 E) düşük hızda manyetik karıştırıcıda (IKA model IKAMAG RH) 30 dk çözündürüldü. Bu işlemten sonra amonyum sülfatlı süpernatant 13.000 g'de, 4°C'de 30 dakika santrifüjlendi. Santrifüjlemenin sonunda

süpernatant 3 (S₃) ve presipitant 3 (P₃) birbirinden ayrıldı. P₃ uygun hacimde pH 6.00 0.05 M fosfat tamponunda çözündürülerek diyaliz işlemine geçildi.

Diyaliz işlemine geçilmeden önce Sigma marka selüloz membranlı diyaliz torbası enzim çözeltisini alacak şekilde uygun boyda kesildi. Diyaliz torbası tektip gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantlarını gidermek için bir ön işlemden geçirildi (Tablo 6). Ön işlemden geçirilmiş diyaliz torbası kullanılmadan önce pH 6.00 0.05 M fosfat tamponuyla yıkandı. Diyaliz torbasının bir ucu bağlandı. Enzim çözeltisi torbanın içine konuldu ve torbadaki hava uzaklaştırılacak şekilde torbanın diğer ucu da sıkıca bağlandı. Diyaliz torbası, pH 6.00 0.05 M fosfat tamponuyla doldurulmuş beherin içine konuldu. 4°C'deki inkübatörde, manyetik karıştırıcıyla yavaş yavaş karıştırılarak 18 saat boyunca pH 6.00 0.05 M fosfat tamponuna karşı diyalize bırakıldı. Diyaliz sonunda diyalizat hacmi ölçüldü. Kısmi saflaştırmanın her bir fraksiyonunda enzim aktivitesi ve protein tayinleri üç tekrarlı olarak yapıldı. Aktivite ölçümlerine dayanarak esteraz'ın hücrenin hangi fraksiyonunda bulunduğu karar verildi.

Tablo 6. Diyaliz torbasının ön işlemden geçirilmesi

1.	Diyaliz torbası %2 NaHCO ₃ ve %0.05 EDTA içeren çözelti içine tamamen daldırılarak 10 dk kaynatılır. Kaynatma sırasında torbanın sıvıya daldırılmış olmasına özen gösterilir.
2.	Kaynama sıvısı atılır ve diyaliz torbası distile su ile 10 dk kaynatılır. Bu işlem bir kez daha tekrarlanır.
3.	Diyaliz torbası soğutulur ve işleme geçilir.

2. 6. pNPB'nin Farklı pH'lardaki Molar Absorbans Katsayılarının Belirlenmesi

pNPB'nin farklı pH'lardaki molar absorbans katsayılarını belirlemek için saf p-nitrofenol (pNP) kullanıldı. pNP'nin 1mM'lık stok çözeltisi hazırlandı (bu işlemden önce pNP 50 °C'deki etüvde 24 saat kurutuldu). Çeşitli pH'larda tamponlar hazırlandı (pH 4.00, 4.50, 5.00, 5.50, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 8.00, 8.50). Stok pNP çözeltisinden, final konsantrasyonu 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 mM olacak şekilde uygun hacimde, denenen tamponlara eklendi ve 346 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak her bir pH için absorbans-konsantrasyon grafiği çizildi. Grafiğin eğiminden molar absorbans katsayıları hesaplandı. pH 4.00-5.50 arasında 0.05 M asetat tamponu (Sodyum asetat- Asetik

asit), pH 6.00-8.00 arasında 0.05 M fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) ve pH 8.50 için ise 0.05 M karbonat tamponu ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) kullanıldı.

2. 7. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bacillus sp. 4 izolatından kısmi olarak saflaştırılan esteraz aktivitesi Winkler ve Stuckmann'ın (1979) kısmi olarak değiştirilmiş yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Substrat olarak p-nitrofenil butirat (pNPB) kullanıldı. Deneyde kullanılan stok çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı. Standart deney ortamının reaksiyon bileşenleri Tablo 7'de sunulmuştur.

- 0.05 M Sodyum fosfat tamponu 65 °C'de pH 6.00 olacak şekilde hazırlandı.
- 0.05 M pNPB saf asetonda çözündürüldü ve kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.
- Enzim kaynağı olarak S_2 uygun hacimlerde seyreltilerek (10 kat) kullanıldı.

Tablo 7. Standart deney ortamı aşağıdaki reaksiyon karışımından oluşmaktadır

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	930 μl	980 μl
Enzim çözeltisi	50 μl	---
İnkübasyon (65 °C)	5 dk	5 dk
50 mM pNPB	20 μl	20 μl
Toplam reaksiyon hacmi	1000 μl	1000 μl

Enzim aktivitesinin başlangıç hızı, 346 nm'de, ilk 5 dakikada oluşan p-nitrofenol miktarının optik dansite farkı ölçülerek saptanmıştır. Çünkü, enzim substratı ile ES kompleksi yaparak geriye dönüşüm olmadan ürüne dönüşmektedir. İlk 5 dakikada enzim derişimleri ile tepkime hızları arasında doğrusal bir bağıntı vardır ve $v = k [E]$ bağıntısı geçerlidir. Başlangıç aktivitesinin uygun olmayan bir zaman diliminde ölçülmesi, substrat azalması ve ürün inhibisyonu sebebiyle doğrusallıktan sapmaya neden olur. p-nitrofenol'ün 346 nm'deki molar absorbens katsayısı $5480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olarak alınmıştır.

Bir enzim ünitesi (IU), 65 °C'de, 1 dakikada, pNPB'dan 1 μmol p-nitrofenolü serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivitesi ve spesifik aktivite aşağıda verilen formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\text{Volüm Aktivite} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E / \Delta T [U / ml]$$

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{V}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot c_{\text{protein}}} \cdot \Delta E / \Delta T [U / mg]$$

V = Toplam deney karışımının hacmi (ml)

$\Delta E / \Delta T$ = Dakikadaki optik dansite farkı (nm)

ϵ = Molar absorptans katsayısı ($5480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = 5.48 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$)

d = Işık yolu (cm)

v = Deney karışımındaki enzim miktarı (ml)

c_{protein} = mg protein miktarı / ml

2. 8. Protein Tayini

Bacillus sp. 4 esterazının kısmi saflaştırılmasının her basamağında protein derişimlerinin tayini, Lowry ve arkadaşlarının (1951) yöntemi kullanılarak yapıldı (Lowry et al., 1951). Standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.

2. 8. 1. Kullanılan kimyasal maddeler

A Çözeltisi: 0.5 g bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ve 1 g sodyum sitrat 100 ml distile suda çözündürüldü.

B Çözeltisi: 20 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve 4 g sodyum hidroksit (NaOH) 1 litre distile suda çözündürüldü.

C Çözeltisi: B çözeltisinin 50 ml'sine, 1 ml A çözeltisi eklenerek taze olarak hazırlandı.

D Çözeltisi: 10 ml Folin Ciocalteu fenol belirtecine 10 ml distile su eklenerek taze olarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: 0.5 ml örnek üzerine, 2.5 ml C çözeltisi eklendi ve IKA model MS2 tüp karıştırıcısıyla karıştırılarak 5-10 dk beklendi. Bu süre sonunda, örnek üzerine 0.25 ml D çözeltisi eklendi ve karıştırıcıda karıştırılarak 20-30 dk eklendi. Oluşan renk 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

2. 9. *Bacillus* sp. 4 Esterazının Karakterizasyonu

2. 9. 1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Bacillus sp. 4 esterazı, pH 6.00 0.05 M fosfat tamponunda farklı sıcaklıklarda (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 ve 85 °C) 15 dk ön inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda, pNPB final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde deney karışımına eklendi ve kalan enzim aktiviteleri ölçüldü. Denenen her sıcaklık için fosfat tamponu pH 6.00'ya ayarlanmıştır.

2. 9. 2. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Bacillus sp. 4 esterazı, pH 6.00 0.05 M fosfat tamponunda farklı sıcaklıklarda (25, 40, 65 ve 75 °C) inkübe edildi. Enzim çözeltisinden belirli zaman aralıklarıyla örnekler alınarak standart deney koşulları altında aktivitesi tayin edildi. Her bir deneme için, 0. saatteki aktivite ölçümü (kontrol) 100 olarak kabul edildi ve kontrol değerine göre geride kalan aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

2. 9. 3. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Bacillus sp. 4 esterazı, 65 °C'de farklı pH larda (pH 4.00, 4.50, 5.00, 5.50, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50) 15 dk ön inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda, pNPB final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde deney karışımına eklendi ve kalan enzim aktiviteleri ölçüldü. pH 4.00-5.50 arasında 0.05 M asetat tamponu (Sodyum asetat- Asetik asit), pH 6.00-7.50 arasında ise 0.05M fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) kullanıldı. pNPB alkali koşullarda kendiliğinden hidrolize uğradığı için pH 7.50'in üstündeki pH'lar denenemedi.

2. 9. 4. Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisi

Bacillus sp. 4 esterazı, oda sıcaklığında (28 °C) ve farklı pH'larda (pH 4.00, 6.00, 8.00, 10.00) inkübe edildi. Enzim çözeltisinden belirli zaman aralıklarında örnek alınarak standart deney koşulları altında aktivitesi tayin edildi. pH 4.00 için, 0.05 M asetat tamponu (Sodyum asetat- Asetik asit), pH 6.00 ve 8.00 için 0.05 M fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$), pH 10.00 için 0.05 M karbonat tamponu ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) kullanıldı. Her bir deneme için, 0. saatteki aktivite ölçümü (kontrol) 100 olarak kabul edildi ve kontrol değerine göre geride kalan aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

2. 9. 5. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi optimum sıcaklık (65°C) ve pH'da (pH 6.00), sabit inkübasyon süresinde (5 dk) ve farklı konsantrasyonlarda substrat (pNPB) kullanılarak (10-200 µM) enzim aktivitelerinin ölçülmesiyle belirlendi.

2. 9. 6. Polihidrik alkollerin enzim stabilitesi üzerine etkisi

Etilen-glikol, sorbitol ve gliserol gibi polihidrik alkollerin enzim stabilitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, bu maddeler final konsantrasyonları 2.5 M olacak şekilde deney ortamına eklendi. Enzim çözeltisi, bu karışımda 65 °C'de 3 saat inkübe edildi. Inkübasyon esnasında saat başı deney ortamından örnek alınarak standart deney koşulları altında aktiviteleri tayin edildi. Herhangi bir kimyasal içermeyen kontrol grubunun da aktivitesi aynı koşullar altında belirlendi. Her bir deneme için, 0. saatteki aktivite ölçümü 100 olarak kabul edildi ve bu değere göre geride kalan aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

2. 9. 7. Enzim aktivitesi üzerine EDTA ve metal iyonlarının etkisi

Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla metal iyonları (FeCl₃, HgCl₂, CoCl₂, CuCl₂, MnCl₂, MnCl₂, CaCl₂, NiCl₂, KCl, NaCl, LiCl ve Na₂O₃Se) 1, 5 ve 10 mM final konsantrasyonlarda, EDTA ise 1 mM final konsantrasyonda deney ortamına eklendi (Tablo 8-10). Enzim çözeltisi bu konsantrasyonlardaki metal iyonları ve EDTA ile oda sıcaklığında (28 °C) 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda geride kalan enzim aktivitesi standart deney koşulları altında belirlendi (Tablo 11). Herhangi bir metal iyonu veya EDTA içermeyen 0.saatteki kontrolün aktivitesi de standart deney koşulları altında belirlendi. Her bir deneme için, 0. saatteki aktivite ölçümü (kontrol) 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre geride kalan aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

2. 9. 8. Esteraz aktivitesi üzerine aktive edici metal iyonları ve EDTA'nın etkisi

Enzimin aktivasyonuna neden olan metal iyonlarının, EDTA'nın inhıbe edici etkisini tolere edip etmeyeceğini denemek amacıyla metal iyonları (MnCl₂ ve NiCl₂) ve EDTA'nın final konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde deney ortamına eklendi (Tablo 12). Enzim çözeltisi bu karışımda oda sıcaklığında (28 °C) 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda

geride kalan enzim aktivitesi standart deney koşulları altında belirlendi (Tablo 13). Her bir deneme için, 0. saatteki aktivite ölçümü (kontrol) 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre geride kalan aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

Tablo 8. 1 mM metal iyonu ve EDTA bulunan deney ortamı

Deney Bileşenleri (1 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	358 µl	398 µl
Enzim çözeltisi	40 µl	-----
0.2 M Metal iyonu veya EDTA	2 µl	2 µl
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	400 µl	400 µl

Tablo 9. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Deney Bileşenleri (5 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	175 µl	195 µl
Enzim çözeltisi	20 µl	-----
0.2 M Metal iyonu	5 µl	5 µl
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 µl	200 µl

Tablo 10. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Deney Bileşenleri (10 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	170 µl	190 µl
Enzim çözeltisi	20 µl	-----
0.2 M Metal iyonu	10 µl	10 µl
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 µl	200 µl

Tablo 11. İnkübasyon sonrası standart reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	930 µl	930 µl
Deney ortamı	50 µl	50 µl
İnkübasyon (65 °C)	5 dk	5 dk
0.05 M pNPB	20 µl	20 µl
Toplam reaksiyon hacmi	1000 µl	1000 µl

Tablo 12. 1 mM metal iyonu (Mn ve Ni) ve EDTA bulunan deney ortamı

Deney Bileşenleri	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	172 µl	192 µl
Enzim çözeltisi	20 µl	-----
0.05 M Metal iyonu	4 µl	4 µl
0.05 M EDTA	4 µl	4 µl
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 µl	200 µl

Tablo 13. İnkübasyon sonrası standart reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	930 µl	930 µl
Deney ortamı	50 µl	50 µl
İnkübasyon (65 °C)	5 dk	5 dk
0.05 M pNPB	20 µl	20 µl
Toplam reaksiyon hacmi	1000 µl	1000 µl

2. 9. 9. Çeşitli deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çeşitli deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, deterjanlar (Triton X-100, Tween 20, Tween 80, n-oktil-β-D-glukopiranozid, Brij 35, sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat, SDS, CHAPS ve Setrimid) final konsantrasyonları 2.5, 5, 10

ve 20 mM olacak şekilde deney ortamına eklendi (Tablo 14-17). Enzim çözeltisi bu konsantrasyonlardaki deterjanlarla oda sıcaklığında (28 °C) 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geride kalan enzim aktivitesi standart deney koşulları altında belirlendi (Tablo 18). Her bir deneme için, 0. saatteki aktivite ölçümü (kontrol) 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre geride kalan aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

Tablo 14. 2.5 mM deterjan içeren deney ortamı

Deney Bileşenleri (2.5 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	177.5 µl	197.5 µl
Enzim çözeltisi	20 µl	-----
0.2 M Deterjan	2.5 µl	2.5 µl
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 µl	200 µl

Tablo 15. 5 mM deterjan içeren deney ortamı

Deney Bileşenleri (5 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	175 µl	195 µl
Enzim çözeltisi	20 µl	-----
0.2 M Deterjan	5 µl	5 µl
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 µl	200 µl

Tablo 16. 10 mM deterjan içeren deney ortamı

Deney Bileşenleri (10 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	170 µl	190 µl
Enzim çözeltisi	20 µl	-----
0.2 M Deterjan	10 µl	10 µl
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 µl	200 µl

Tablo 17. 20 mM deterjan içeren deney ortamı

Deney Bileşenleri (20 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	160 µl	180 µl
Enzim çözeltisi	20 µl	-----
0.2 M Deterjan	20 µl	20 µl
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 µl	200 µl

Tablo 18. İnkübasyon sonrası standart reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	930 µl	930 µl
Deney ortamı	50 µl	50 µl
İnkübasyon (65 °C)	5 dk	5 dk
0.05 M pNPB	20 µl	20 µl
Toplam reaksiyon hacmi	1000 µl	1000 µl

2. 9. 10. Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, kullanılan organik çözücülerden aseton, asetonitril ve 1,4-dioksan % 20 ve 50, etanol, metanol ve dimetilsülfoksit (DMSO) % 50 ve 80'lik final konsantrasyonlarda deney ortamına eklendi. Enzim çözeltisi bu konsantrasyonlardaki organik çözücülerle oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geride kalan enzim aktivitesi standart deney koşulları altında belirlendi. Her bir deneme için, 0. saatteki aktivite ölçümü (kontrol) 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre geride kalan aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

2. 9. 11. Enzim aktivitesi üzerine inhibe edici ajanların etkisi

İnhibe edici ajanların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, bir serin inhibitörü olan fenil metil sülfonil florit (PMSF) ve SH-grubu inhibitörü olan β -

merkapttoetanol kullanıldı. PMSF'nin 1 mM final konsantrasyonu ve β -merkapttoetanol'ün 1 ve 5 mM final konsantrasyonları deney ortamına eklendi (Tablo 19-20). Enzim çözeltisi bu konsantrasyonlardaki inhıbe edici ajanlarla oda sıcaklığında (28 °C) 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geride kalan enzim aktivitesi standart deney koşulları altında belirlendi (Tablo 21). Her bir deneme için, 0. saatteki aktivite ölçümü (kontrol) 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrol değerine göre geride kalan aktivite değişimi % değer olarak belirlendi.

Tablo 19. 1 mM inhibitör içeren deney ortamı

Deney Bileşenleri (1 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	176 μ l	196 μ l
Enzim çözeltisi	20 μ l	-----
0.05 M İnhıbe edici ajan	4 μ l	4 μ l
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 μ l	200 μ l

Tablo 20. 5 mM inhibitör içeren deney ortamı

Deney Bileşenleri (5 mM)	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	175 μ l	195 μ l
Enzim çözeltisi	20 μ l	-----
0.2 M İnhıbe edici ajan	5 μ l	5 μ l
İnkübasyon (28 °C)	1 saat	1 saat
Toplam reaksiyon hacmi	200 μ l	200 μ l

Tablo 21. İnkübasyon sonrası standart reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Örnek	Kör
0.05 M fosfat tamponu	930 μ l	930 μ l
Deney ortamı	50 μ l	50 μ l
İnkübasyon (65 °C)	5 dk	5 dk
0.05 M pNPB	20 μ l	20 μ l
Toplam reaksiyon hacmi	1000 μ l	1000 μ l

2. 9. 12. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla, p-nitrofenil asetat (pNPA), p-nitrofenil butirat (pNPB), p-nitrofenil laurat (p-NPL) ve p-nitrofenil palmitat (p-NPP) kullanıldı. Deneyde kullanılan stok çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- 0.05 M Sodyum fosfat tamponu 65 °C’de pH 6.00 olacak şekilde hazırlandı.
- 0.05M pNPA saf asetonda çözündürüldü.
- 0.05 M pNPB saf asetonda çözündürüldü.
- 0.05 M pNPL saf asetonda çözündürüldü.
- 0.05 M pNPP saf asetonda çözündürüldü. Fosfat tamponuna (pH 6.00, 0.05 M) %1 oranında Triton X-100 eklendi. Stok pNPP çözeltisi final konsantrasyonu 1mM olacak şekilde bu çözeltiliye eklendi, 5 saniye karıştırıldı ve daha sonra 2 dk boyunca sonike edildi.
- Enzim kaynağı olarak süpernatant 2 uygun hacimlerde seyreltilerek (10 kat) kullanıldı.

Enzim aktivitesi standart deney koşulları altında belirlendi. pNPB için ölçülen değer kontrol olarak kabul edilerek, bu değere göre geride kalan aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

2. 10. Verilerin Değerlendirilmesi

Bacillus sp. 4’ün esterazı ile ilgili kesitlerin protein derişimi, pNPB’ın molar absorbens katsayıları, Vmax ve Km değerleri lineer regrasyon analizi ile saptanmıştır (SPSS Inc, 1999).

Esteraz aktivitesi üzerine ortam sıcaklığının, ortam pH’sının etkisi, sıcaklık, sıcaklık stabilitesi, pH, pH stabilitesi, substrat konsantrasyonu, çeşitli metal iyonları, EDTA, çeşitli inhibe edici ajanlar, polihidrik alkoller, deterjanlar, organik çözücüler ve substrat spesifitesinin etkilerini saptamak için her deney üç tekrar üzerinden yapılmıştır. Gruplar arasında farkın belirlenmesi ve gruplar arasındaki farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi (Duncan Testi) yapılmıştır (SPSS Inc, 1999). Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde eşlenmiş örneklerde T-testi uygulanmıştır (SPSS Inc, 1999).

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3. 1. Mikroorganizmanın Seçimi

3. 1. 1. Tween 80 agar yöntemi

Aydın ili Germencik ilçesi Bozköy-Alangüllü termal sularından elde edilen *Bacillus* sp. genusuna ait 5 izolatın esteraz üretilip üretilmediği Tween 80 agar yöntemine göre belirlendi (Haba et al., 2000). Tween 80 agar ortamında lipolitik aktivite gösteren D3, D4 ve 4 numaralı izolatlar, Tween 80'i substrat olarak kullandığında açığa çıkan oleik asit Ca ile birleşip çökelerek lipolitik aktivite derecesine göre opak bir zon oluşturmuştur (Şekil 1a, 2a, 3a). 1 ve 3 numaralı izolatlar ise, lipolitik aktivite göstermemiştir (Şekil 4a, 5a). Opak zon oluşumu gösteren bakteri kolonilerinin çapları ölçülerek, en iyi derecede lipolitik aktivite gösteren izolat, bundan sonraki denemeler için seçilmiştir. Ayrıca, *Bacillus* sp. izolatları kontrol amaçlı olarak nutrient agar ortamında da geliştirilmişlerdir (Şekil 1b, 2b, 3b, 4b ve 5b). *Bacillus* sp. genusuna ait, D3, D4 ve 4 numaralı izolatlar arasında en iyi zon oluşumu 4 numaralı izolatla gözlemlendiğinden (Şekil 3a), çalışmalara bu izolatla devam edilmiştir.

3. 2. Bakteri Straininin Karakterizasyonu

3. 2. 1. Mikroorganizmanın büyüme eğrisinin belirlenmesi

Bacillus sp. 4 izolatının büyüme eğrisi, daha önceden saptanan optimum koşullar altında (65 °C'de ve pH 6.00'da) (Başbülbül, 2000) ve kısmi olarak modifiye edilen *Thermus* ortamı (üretim ortamı) kullanılarak belirlendi (Şekil 6). Organizma 2. saatten sonra gelişmeye başlamış ve log fazına geçmiştir. Log fazını 6. saatten itibaren tamamlamış ve durgunluk dönemine girmiştir.

3. 2. 2. Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisi

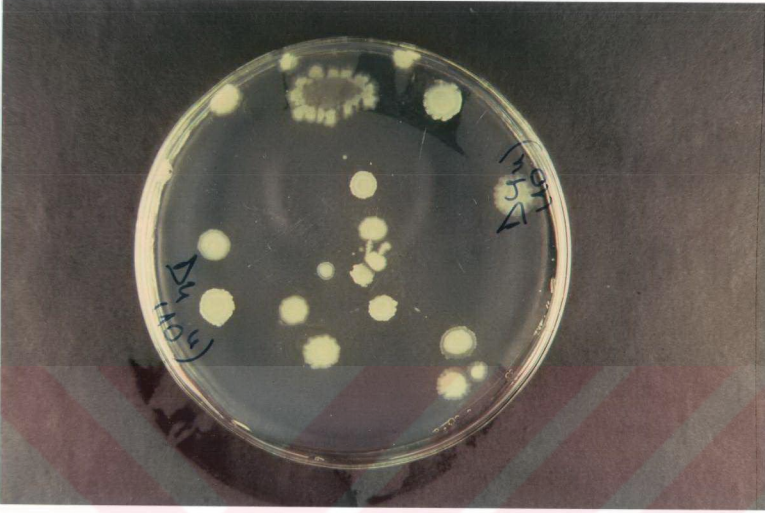
Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 22-26'da ve Şekil 7-11'de gösterilmiştir. *Bacillus* sp. 4 izolatı, farklı sıcaklıklarda (50, 55, 60, 65 ve 70 °C) ve pH 6.00'da üretim ortamında geliştirilerek büyüme eğrileri çıkartılmıştır. Her sıcaklıktaki büyüme durumunun farklı olması nedeniyle, aktivite tayinlerine, log fazının ortalarından itibaren başlanmıştır.



Şekil 1a. *Bacillus* sp. D3 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.



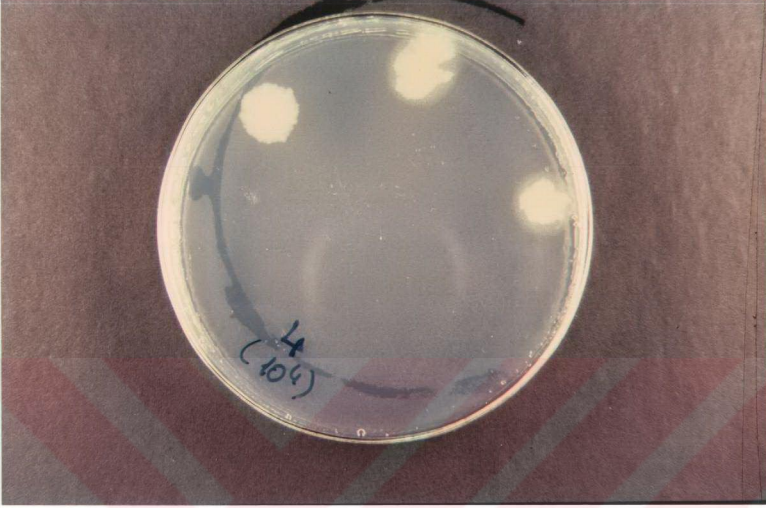
Şekil 1b. *Bacillus* sp. D3 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.



Şekil 2a. *Bacillus* sp. D4 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.



Şekil 2b. *Bacillus* sp. D4 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.



Şekil 3a. *Bacillus* sp. 4 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.



Şekil 3b. *Bacillus* sp. 4 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.



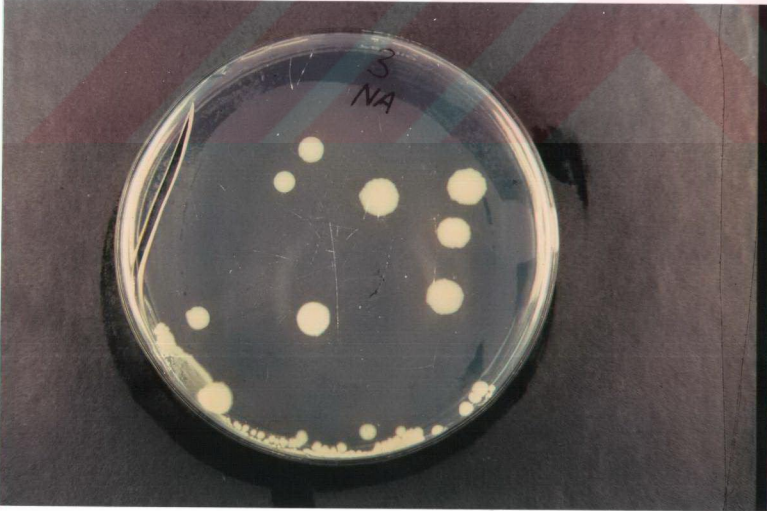
Şekil 4a. *Bacillus* sp. 1 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.



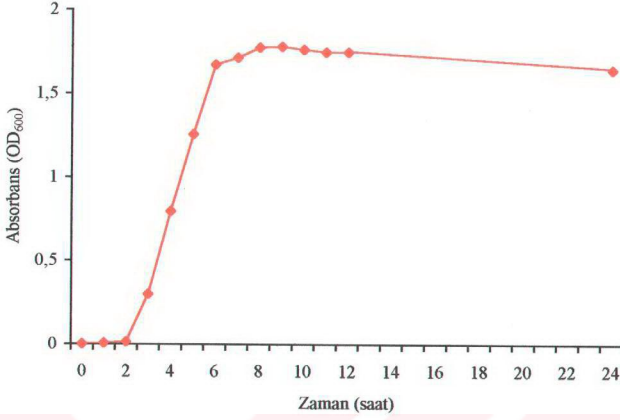
Şekil 4b. *Bacillus* sp. 1 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.



Şekil 5a. *Bacillus* sp. 3 izolatının Tween 80 agar ortamındaki gelişimi.



Şekil 5b. *Bacillus* sp. 3 izolatının nutrient agar ortamındaki gelişimi.



Şekil 6. *Bacillus* sp. 4 izolatının büyüme eğrisi.

50 °C’de, *Bacillus* sp. 4’ün 0-5. saat arasında absorbansında önemli bir artış olmamış, 6. saatten itibaren ise absorbansda önemli bir artış gözlemlenmiştir. Bu saatten sonra mikroorganizma log fazına geçmiştir. 7-13. saatler arası mikroorganizmanın log fazında olduğu dönemdir. 13. saatten sonra ise mikroorganizma durgunluk fazına geçmiştir (Şekil 7, Tablo 22). Esteraz aktivitesinin ölçümü, 10-15. saatler arasında yapılmıştır. 11. saatteki enzim aktivitesinin en yüksek değerde olduğu (61.49 ± 0.32 U/ml) ve diğer saatlerdeki aktivite sonuçlarıyla arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. 12. saatten itibaren ise enzim aktivitesi düşmüştür.

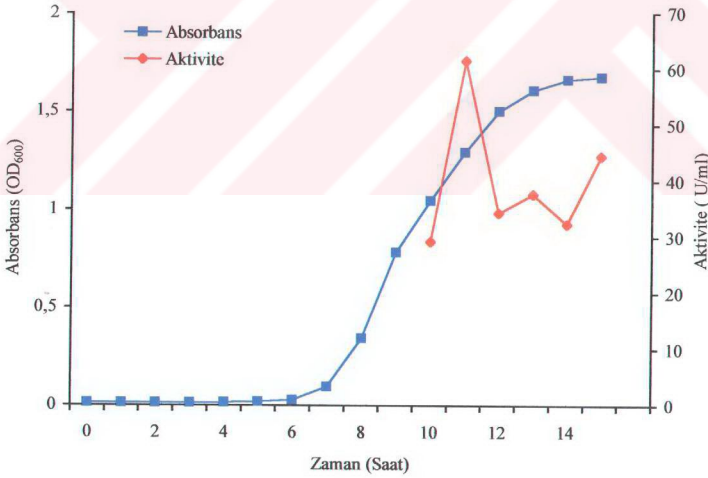
55 °C’de, *Bacillus* sp. 4’ün 0-4. saat arasında absorbansında önemli bir artış olmamış, 5. saatten itibaren ise absorbansda önemli bir artış gözlemlenmiştir. Bu saatten sonra mikroorganizma log fazına geçmiştir. 5-11. saatler arası mikroorganizmanın log fazında olduğu dönemdir. 11. saatten sonra ise mikroorganizma durgunluk fazına geçmiştir (Şekil 8, Tablo 23). Esteraz aktivitesinin ölçümü, 10-14. saatler arasında yapılmıştır. 10 ve 11. saatlerde ölçülen enzim aktivitesi oldukça düşük olup, aralarındaki fark önemli değildir. 12. saatteki enzim aktivitesi en yüksek değerdedir (46.53 ± 1.58 U/ml) ve diğer saatlerdeki aktivite sonuçlarıyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. 13. saatten itibaren enzim aktivitesi istatistiksel olarak önemli bir düşüş göstermiştir.

Tablo 22. *Bacillus* sp. 4'ün 50 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim

İnkübasyon Zamanı (Saat)	Absorbans (OD ₆₀₀)	Aktivite (U/ml) (ORT. ± S.H.)	x
0	0.013	-	
1	0.014	-	
2	0.014	-	
3	0.014	-	
4	0.015	-	
5	0.019	-	
6	0.029	-	
7	0.096	-	
8	0.342	-	
9	0.780	-	
10	1.044	29.20 ± 1.05	a
11	1.291	61.49 ± 0.32	b
12	1.500	34.36 ± 4.09	ac
13	1.608	37.71 ± 3.09	cd
14	1.663	32.38 ± 2.37	ac
15	1.676	44.52 ± 2.53	d
24	1.931	-	
F= 21.10***			

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : $p < 0.001$.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 7. *Bacillus* sp. 4'ün 50 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.

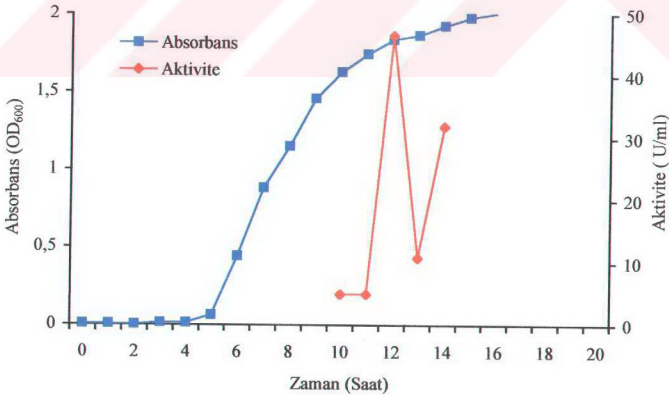
Tablo 23. *Bacillus* sp. 4'ün 55 °C' deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim

İnkübasyon Zamanı (Saat)	Absorbans (OD ₆₀₀)	Aktivite (U/ml) (ORT. ± S.H.)	x
0	0.006	-	
1	0.006	-	
2	0.004	-	
3	0.013	-	
4	0.015	-	
5	0.063	-	
6	0.444	-	
7	0.883	-	
8	1.150	-	
9	1.458	-	
10	1.628	4.92 ± 0.74	a
11	1.744	4.92 ± 0.32	a
12	1.838	46.53 ± 1.58	b
13	1.864	10.77 ± 0.53	c
14	1.927	31.94 ± 1.05	d
15	1.979	-	
16	2.005	-	
24	2.022	-	
25	2.022	-	
27	2.005	-	

F= 362.60***

ORT: Her veri üç tekrarı ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : p < 0.001.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 8. *Bacillus* sp. 4'ün 55 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.

60 °C'de, *Bacillus* sp. 4'ün 0-2. saat arasında absorbandsında önemli bir artış olmamış, 3. saatten itibaren ise absorbandsa önemli bir artış gözlemlenmiştir. Bu saatten sonra mikroorganizma log fazına geçmiştir. 3-7. saatler arası mikroorganizmanın log fazında olduğu dönemdir. 7. saatten sonra ise mikroorganizma durgunluk fazına geçmiştir (Şekil 9, Tablo 24). Esteraz aktivitesinin ölçümü 6-12. saatler arasında yapılmıştır. 6. saatte enzim aktivitesi en düşük değerde olup, 7-9. saatler arasındaki enzim aktiviteleri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. 10. saatteki enzim aktivitesinin en yüksek değerde olduğu (55.23 ± 2.32 U/ml) ve diğer saatlerdeki aktivite sonuçlarıyla arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. 11. saatten itibaren enzim aktivitesi belirgin bir şekilde düşmüştür.

65 °C'de, *Bacillus* sp. 4'ün 0-2. saat arasında absorbandsında önemli bir artış olmamış, 3. saatten itibaren ise absorbandsa önemli bir artış gözlemlenmiştir. Bu saatten sonra mikroorganizma log fazına geçmiştir. 3-6. saatler arası mikroorganizmanın log fazında olduğu dönemdir. 6. saatten sonra ise mikroorganizma durgunluk fazına geçmiştir (Şekil 10, Tablo 25). Esteraz aktivitesinin ölçümü 3-12. saatler arasında yapılmıştır. 3. saatte enzim aktivitesi en düşük değerde olup, 6. saatten itibaren enzim aktivitesi önemli bir şekilde artarak, 9. saatteki enzim aktivitesinin en yüksek değerde olduğu (74.82 ± 3.16 U/ml) saptanmıştır. 9. saatteki aktivite değeri ile diğer saatlerdeki aktivite sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. 10. saatten itibaren enzim aktivitesi belirgin bir şekilde düşmüştür.

70 °C'de, *Bacillus* sp. 4'ün 0-4. saat arasında absorbandsında önemli bir artış olmamış, 5. saatten itibaren ise absorbandsa önemli bir artış gözlemlenmiştir. Bu saatten sonra mikroorganizma log fazına geçmiştir. 5-10. saatler arası mikroorganizmanın log fazında olduğu dönemdir. 10. saatten sonra ise mikroorganizma durgunluk fazına geçmiştir (Şekil 11, Tablo 26). Esteraz aktivitesinin ölçümü 10-13. saatler arasında yapılmıştır. 11. saatteki enzim aktivitesinin en yüksek değerde olmasına rağmen (39.15 ± 5.22 U/ml) bu değer ile 10. saatteki aktivite sonucu (36.50 ± 2.11 U/ml) arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. 24. saatteki enzim aktivitesinin (10.95 ± 2.11 U/ml) ölçüm yapılan diğer saatlere göre, oldukça düşük olduğu bulunmuştur.

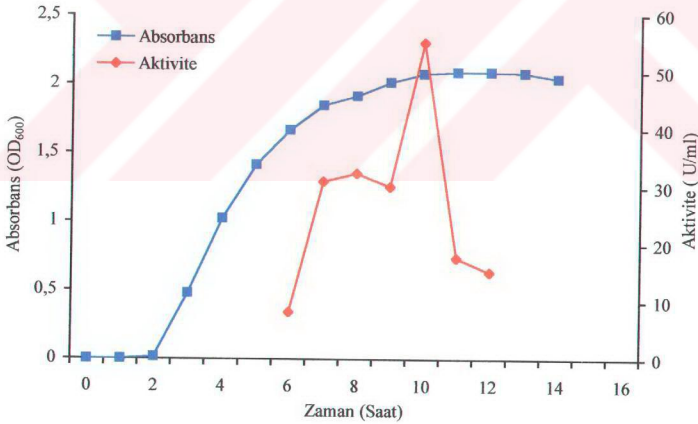
Tablo 24. *Bacillus* sp. 4'ün 60 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim

İnkübasyon Zamanı (Saat)	Absorbans (OD ₆₀₀)	Aktivite (U/ml) (ORT. ± S.H.)	x
0	0.000	-	
1	0.000	-	
2	0.017	-	
3	0.478	-	
4	1.023	-	
5	1.414	-	
6	1.665	8.21 ± 0.53	a
7	1.845	31.02 ± 2.11	b
8	1.913	32.39 ± 1.84	b
9	2.011	30.11 ± 2.64	b
10	2.075	55.23 ± 2.32	c
11	2.088	17.64 ± 0.60	d
12	2.088	15.20 ± 1.33	d
13	2.081	-	
14	2.039	-	
24	2.081	-	

F= 54.65***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : p < 0.001.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Şekil 9. *Bacillus* sp. 4'ün 60 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.

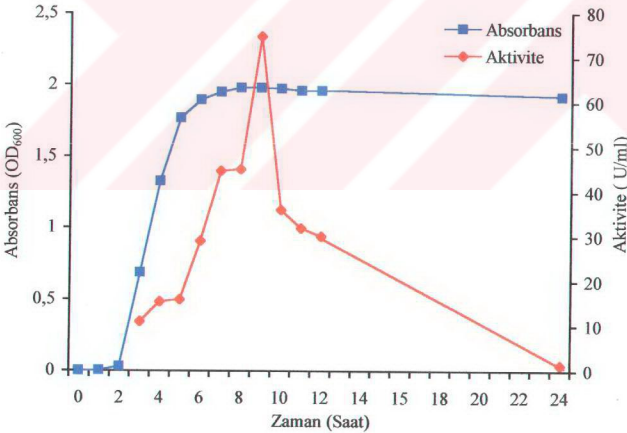
Tablo 25. *Bacillus* sp. 4'ün 65 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim

İnkübasyon Zamanı (Saat)	Absorbans (OD ₆₀₀)	Aktivite (U/ml) (ORT. ± S.H.)	x
0	0.001	-	
1	0.003	-	
2	0.030	-	
3	0.688	10.95 ± 0.53	a
4	1.326	15.51 ± 2.64	a
5	1.768	15.97 ± 1.84	a
6	1.896	29.10 ± 4.69	b
7	1.950	44.71 ± 5.79	c
8	1.979	45.16 ± 0.27	c
9	1.979	74.82 ± 3.16	d
10	1.974	36.04 ± 1.32	bc
11	1.959	31.93 ± 3.69	b
12	1.959	30.11 ± 3.69	b
24	1.917	1.37 ± 0.26	e

F= 42.67***

ORT: Her veri üç tekrarı ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : p < 0.001.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 10. *Bacillus* sp. 4'ün 65 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.

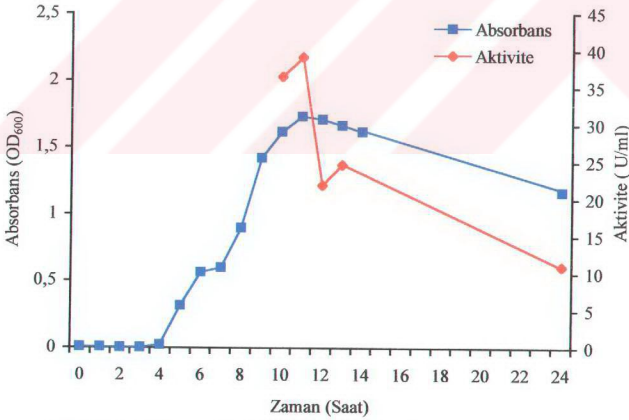
Tablo 26. *Bacillus* sp. 4'ün 70 °C'deki büyüme durumu ve enzim aktivitesindeki değişim

İnkübasyon Zamanı (Saat)	Absorbans (OD ₆₀₀)	Aktivite (U/ml) (ORT. ± S.H.)	x
0	0.005	-	
1	0.005	-	
2	0.002	-	
3	0.002	-	
4	0.022	-	
5	0.317	-	
6	0.565	-	
7	0.600	-	
8	0.896	-	
9	1.421	-	
10	1.616	36.50 ± 2.11	a
11	1.732	39.15 ± 5.22	a
12	1.707	21.90 ± 2.11	b
13	1.665	24.64 ± 0.53	b
14	1.616	-	
24	1.166	10.95 ± 2.11	c

F= 16.12***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : p < 0.001.

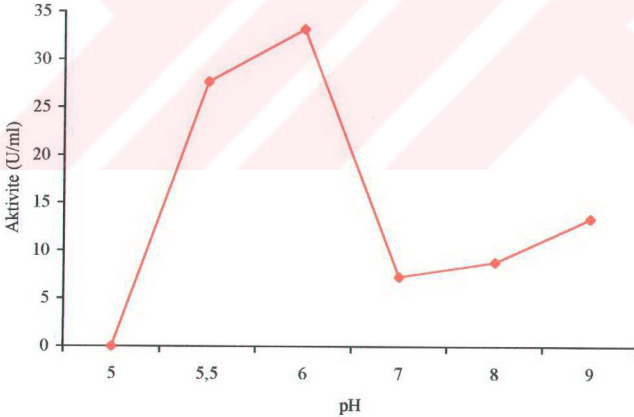
x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 11. *Bacillus* sp. 4'ün 70 °C'deki büyüme eğrisi ve enzim aktivitesindeki değişim.

3. 2. 3. Ortam pH'ının enzim üretimi üzerine etkisi

Ortam pH'sının enzim üretimi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 27 ve Şekil 12'de gösterilmiştir. *Bacillus* sp. 4 izolatı, farklı pH'lardaki üretim ortamında (pH 5.00; 5.50; 6.00; 7.00; 8.00; 9.00) ve enzim üretiminin en yüksek olduğu sıcaklık olan 65 °C'de ve 9 saat boyunca üretilmiş (aktivitenin maksimum olduğu saat) ve 9. saat sonunda enzim aktiviteleri tayin edilmiştir (Şekil 12). *Bacillus* sp. 4 izolatı, pH'sı 5.00 olan ortamda gelişme göstermemiştir. Organizma, pH'sı 6.00 olan üretim ortamında geliştirildiğinde, enzim aktivitesi en yüksek değerde bulunmuş (33.15 ± 3.51 U/ml) ve bu değer diğer pH'lardaki aktivite sonuçlarıyla arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Organizma pH'sı 7.00, 8.00 ve 9.00 olan ortamlarda geliştirildiğinde ise aktivitede belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Bununla beraber, organizma pH'sı 5.50 olan ortamda geliştirildiğinde elde edilen aktivite değeri (27.69 ± 1.11 U/ml) maksimum değerden istatistiksel olarak farklı olsa da, pH 7.00, 8.00 ve 9.00'daki kadar düşük olmaması dikkat çekicidir.



Şekil 12. Ortam pH'sının enzim üretimi üzerine etkisi.

Tablo 27. *Bacillus* sp. esteraz aktivitesinin üzerine ortam pH'sının etkisi

Ortam pH'sı	Aktivite (U/ml) (ORT. $\pm$ S.H.)	x
5.00	0.00 $\pm$ 0.00	a
5.50	27.69 $\pm$ 1.11	b
6.00	33.15 $\pm$ 3.51	c
7.00	7.30 $\pm$ 0.00	d
8.00	8.82 $\pm$ 0.30	de
9.00	13.38 $\pm$ 1.10	e

F= 45.78***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : p < 0.001.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

3. 2. 4. *Bacillus* sp. 4 izolatının büyüme eğrisine bağlı olarak kültür ortamının pH ve enzim aktivitesindeki değişim

Bacillus sp. 4 izolatının büyüme eğrisine bağlı olarak kültür ortamının pH'sı ve enzim aktivitesindeki değişim ile ilgili sonuçlar Tablo 28 ve Şekil 13'de gösterilmiştir. Organizma, 3. saatten itibaren gelişmeye başlamış, 6. saatten itibaren ise durgunluk fazına girmiştir. Enzim aktivitesine 0-12. saatler arasında ve 24. saatte bakılmıştır. 0-2. saatler arasında herhangi bir enzim aktivitesi saptanmamıştır. 3-5. saatler arasında enzim aktivitesi çok az da olsa görülmeye başlanmış olup, 6. saatten itibaren enzim aktivitesinde bir artış başlamıştır. Maksimum enzim aktivitesi durgunluk fazının ortaları olan 9. saatte gözlenmiştir (64.33 ± 0.79 U/ml). Bu değer ile diğer saatlerdeki değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. 9. saatten itibaren enzim aktivitesi istatistiksel olarak önemli bir şekilde düşmüştür. 24. saatte ise enzim aktivitesi 10.04 ± 1.05 U/ml olarak bulunmuştur.

Ortam pH'sının ölçümü 0-12. saatler arasında ve 24. saatte yapılmıştır. 0. saatte ortam pH'sı 5.76 olarak ölçülmüştür. Gelişimin başladığı 3. saatten itibaren pH, yavaş ama devamlı bir yükseliş göstermiştir. 12. saatte ise pH 7.87'ye kadar yükselmiştir. Bu da organizmanın alkali ürünler oluşturduğunu göstermektedir.

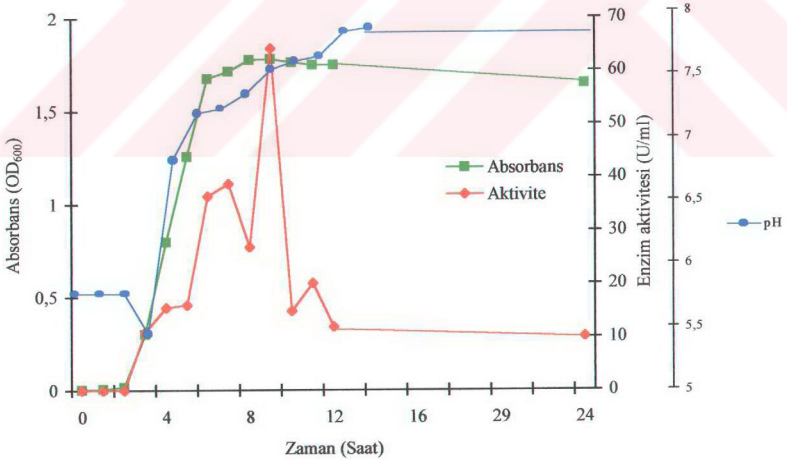
Tablo 28. *Bacillus* sp. 4'ün 65 °C'deki büyüme eğrisine bağlı olarak kültür ortamının pH ve enzim aktivitesindeki değişim

İnkübasyon Zamanı (Saat)	pH değişimi	Absorbans (OD ₆₀₀)	Aktivite (U/ml) (ORT. ± S.H.)	x
0	5.76	0.002	0.00 ± 0.00	a
1	5.76	0.007	0.00 ± 0.00	a
2	5.76	0.016	0.00 ± 0.00	a
3	5.45	0.301	10.95 ± 0.53	bc
4	6.83	0.796	15.51 ± 2.64	bcd
5	7.20	1.257	15.97 ± 1.85	cd
6	7.23	1.673	36.50 ± 1.05	e
7	7.35	1.713	38.78 ± 2.37	e
8	7.54	1.774	26.92 ± 3.43	f
9	7.61	1.780	64.33 ± 0.79	g
10	7.65	1.762	14.90 ± 1.52	bcd
11	7.84	1.747	20.07 ± 0.00	d
12	7.87	1.747	11.86 ± 2.79	bc
24	7.76	1.643	10.04 ± 1.05	b

F= 99.15***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : p < 0.001.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 13. *Bacillus* sp. 4 izolatının büyüme eğrisine bağlı olarak kültür ortamının pH ve enzim aktivitesindeki değişim.

3. 3. Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Lokalizasyonu

Enzimin kısmi saflaştırılması ile ilgili sonuçlar Tablo 29'da özetlenmiştir. Direk kültürün spesifik aktivitesi 158.51 ± 2.10 U/mg protein olarak bulunmuştur. Bu fraksiyonun verimi (%) 100.00 ve saflaştırma katsayısı 1.00 olarak kabul edilip, daha üst fraksiyonların verim ve saflaştırma katsayıları, bu fraksiyon temel alınarak hesaplanmıştır. S₁'in spesifik aktivitesi 43.87 ± 2.61 U/mg protein, verimi % 22.37 ± 0.79 ve saflaştırma katsayısı 0.28 ± 0.02 kat olarak bulunmuştur. P₁'in spesifik aktivitesi 587.4 ± 24.62 U/mg protein, verimi % 0.62 ± 0.02 , saflaştırma katsayısı ise 3.70 ± 0.12 kat olarak saptanmıştır. Enzim aktivitesinin büyük kısmının P₁'de elde edilmesinden dolayı enzimin bu fraksiyonda bulunduğu sonucuna varılmıştır. S₂'nin spesifik aktivitesi 767.07 ± 148.52 U/mg protein, verimi % 3.13 ± 0.11 ve saflaştırma katsayısı ise 4.82 ± 0.94 kat olarak bulunmuştur. Diyalizatin spesifik aktivitesi 657.63 ± 7.64 U/mg protein, verimi % 2.27 ± 0.09 ve saflaştırma katsayısı ise 4.15 ± 0.06 kat olarak bulunmuştur.

3. 4. pNPB'nin Farklı pH'lardaki Molar Absorbans Katsayılarının Belirlenmesi

pNPB'nin farklı pH'lardaki molar absorbans katsayıları saf p-nitrofenol (pNP) kullanılarak materyal ve metotda belirtildiği gibi saptanmıştır. Molar absorbans katsayısı, pH 4.00 için, $6.32 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$; pH 4.50 için, $5.85 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$; pH 5.00 için, $5.72 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$; pH 5.50 için, $5.54 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$; pH 6.00 için, $5.48 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$; pH 6.50 için, $5.24 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$; pH 7.00 için, $4.57 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$; pH 7.50 için, $4.82 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$; pH 8.00 için, $4.44 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$ ve pH 8.50 için, $4.43 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}$ olarak bulunmuştur (Şekil 14-23).

3. 5. Protein Tayini

Bacillus sp. 4 esterazının kısmi saflaştırılmasının her basamağında protein derişimlerinin tayini, Lowry ve arkadaşlarının (Lowry et al., 1951) yöntemi ile kullanılarak yapıldı. Standart olarak sığır serum albumini kullanıldı. Konsantrasyona karşı absorbans doğru grafiği çizilerek, bilinmeyen örneğin protein miktarı, bu grafiğin denklem formülü ($y = 0.0028x + 0.006$, $R^2 = 0.99$) kullanılarak belirlendi (Şekil 24).

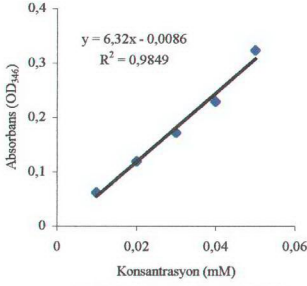
Tablo 29. *Bacillus* sp. 4 esterazının saflaştırma basamakları

Saflaştırma basamakları	Fraksiyon hacmi(ml)	Protein (mg/ml) (ORT. $\pm$ S.H.)	Total protein (mg) (ORT. $\pm$ S.H.)	Enzim aktivitesi (U/ml) (ORT. $\pm$ S.H.)	Total aktivite (U) (ORT. $\pm$ S.H.)	Spesifik aktivite (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S.H.)	Verim (%) (ORT. $\pm$ S.H.)	Saflaştırma katsayısı (ORT. $\pm$ S.H.)
Direkt kültür	200	0.87 $\pm$ 0.036	174.00 $\pm$ 7.21	137.77 $\pm$ 4.11	27554.00 $\pm$ 822.68	158.51 $\pm$ 2.10	100	1
Supernatant 1	186	0.76 $\pm$ 0.009	140.74 $\pm$ 1.64	33.15 $\pm$ 1.61	6165.90 $\pm$ 299.13	43.87 $\pm$ 2.61	22.37 $\pm$ 0.79	0.28 $\pm$ 0.02
Pellet 1	1.5	0.19 $\pm$ 0.009	0.29 $\pm$ 0.013	113.14 $\pm$ 1.05	169.71 $\pm$ 1.58	587.40 $\pm$ 24.62	0.62 $\pm$ 0.02	3.70 $\pm$ 0.12
Supernatant 2	6	0.20 $\pm$ 0.032	1.20 $\pm$ 0.19	143.25 $\pm$ 2.63	859.50 $\pm$ 15.80	767.07 $\pm$ 148.52	3.13 $\pm$ 0.11	4.82 $\pm$ 0.94

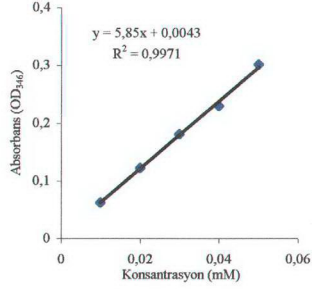
Diyalizat % 85'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 0.95 $\pm$ 0.006 0.95 $\pm$ 0.006 624.70 $\pm$ 5.80 624.70 $\pm$ 5.80 657.63 $\pm$ 7.64 2.27 $\pm$ 0.09 4.15 $\pm$ 0.06

ORT: Her veri üç tekrarin ortalamasidir.

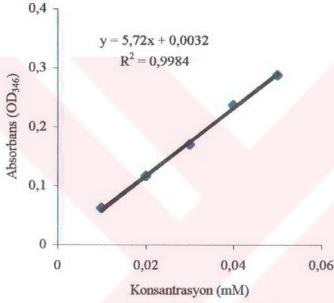
S.H.: Standart hata.



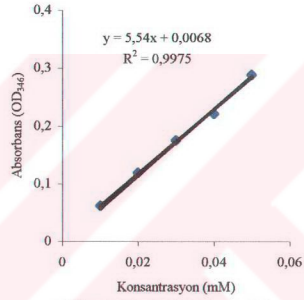
Şekil 14. p-Nitrofenol'ün pH 4.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



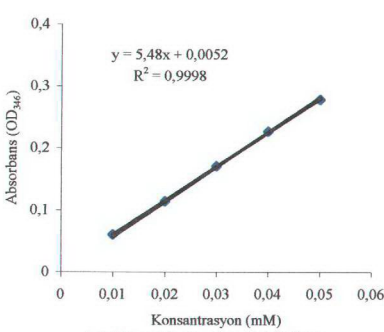
Şekil 15. p-Nitrofenol'ün pH 4.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



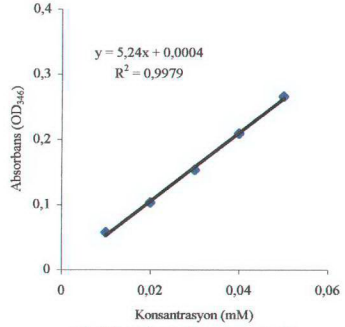
Şekil 16. p-Nitrofenol'ün pH 5.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



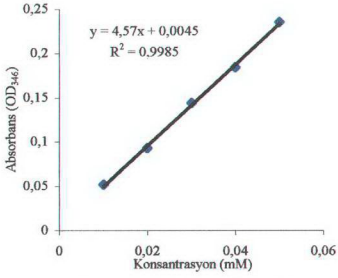
Şekil 17. p-Nitrofenol'ün pH 5.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



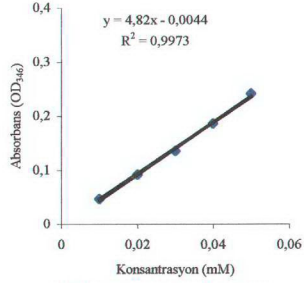
Şekil 18. p-Nitrofenol'ün pH 6.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



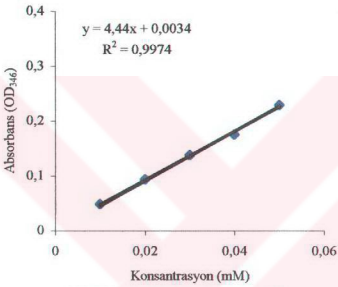
Şekil 19. p-Nitrofenol'ün pH 6.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



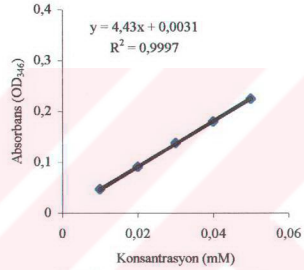
Şekil 20. p-Nitrofenolün pH 7.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



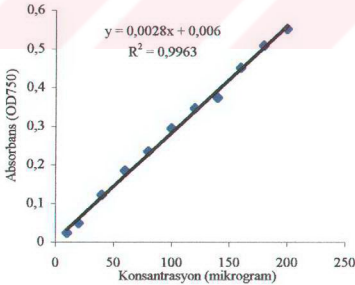
Şekil 21. p-Nitrofenolün pH 7.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



Şekil 22. p-Nitrofenolün pH 8.00'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



Şekil 23. p-Nitrofenolün pH 8.50'deki konsantrasyona bağlı absorbans değişimi.



Şekil 24. Proteinin (BSA) standart eğrisi

3. 6. *Bacillus* sp. 4 Esterazının Karakterizasyonu

3. 6. 1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzim aktivitesi (U/mg protein) üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 30 ve Şekil 25'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla, 30-85 °C arasındaki sıcaklıklarda 5 °C aralıklarla enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesi 30 °C'de en düşük değerde (103.39 ± 1.54 U/mg protein) olup, sıcaklığın kademeli olarak artırılması ile enzim aktivitesi de belirli bir hızda artarak 65 °C'de maksimum değere (301.09 ± 6.97 U/mg protein) ulaşmıştır ve bu değer ile diğer sıcaklıklarda bulunan aktivite değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. Her ne kadar maksimum aktivite 65 °C'de saptanmış ise de, 40, 45, 50, 55, 60 ve 70 °C'lerde aktivitenin sırasıyla % 50, 63, 75, 86, 95 ve 70'i görülmüştür. Sıcaklığın 85 °C'ye kademeli olarak çıkartılması ile enzim aktivitesi belli bir hızda azalarak 41.62 ± 2.31 U/mg protein değerine düşmüştür. Bunun yanında, 75, 80 ve 85 °C'de bulunan aktivite değerlerinin arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. 70 °C'den sonra aktivitede ani bir düşüş olduğu gözlenmiştir.

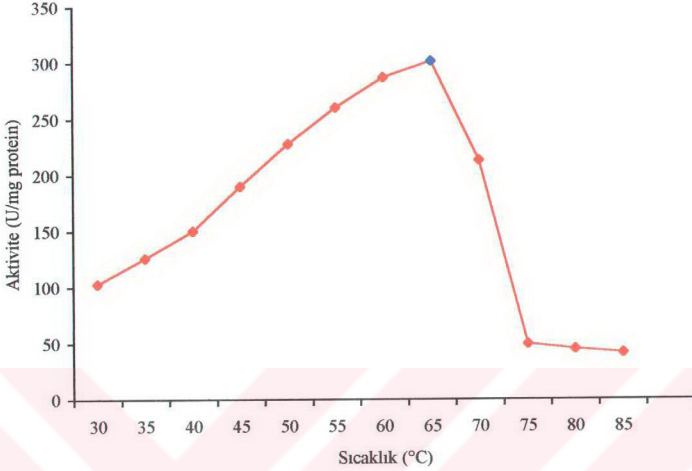
Tablo 30. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık °C	Spesifik Aktivite (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S.H.)	x
30	103.39 ± 1.54	a
35	126.21 ± 2.01	b
40	150.54 ± 2.28	c
45	190.08 ± 4.02	d
50	227.64 ± 2.67	e
55	260.03 ± 5.27	f
60	286.64 ± 2.01	g
65	301.09 ± 6.97	h
70	212.89 ± 4.02	i
75	49.42 ± 4.99	k
80	44.85 ± 2.97	k
85	41.62 ± 2.31	k

F= 625.09***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : $p < 0.001$.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 25. *Bacillus* sp. 4 esterazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

3. 6. 2. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 31 ve Şekil 26'de gösterilmiştir. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla enzim, farklı sıcaklıklarda (25, 40, 65 ve 75 °C) inkübe edildi. Enzim çözeltilisinden belli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktivitesi tayin edildi ve kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlendi.

Enzim, 25 °C'de 1-70 saat arasında inkübasyona bırakılmıştır. Enzimin, 20 saat inkübasyon sonunda aktivitesini büyük ölçüde koruduğu ($\% 95.6 \pm 2.30$) ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. 25 saat sonunda aktivitenin $\% 87.5 \pm 1.07$ 'si ve 30 saat sonunda ise $\% 78.8 \pm 1.36$ 'sı korunmuştur. 45. saatten itibaren aktivite büyük oranda düşmüştür.

Enzim, 40 °C'de 1-100 saat arasında inkübasyona bırakılmış ve 10 saat boyunca aktivitesini $\% 100$ korumuştur. Bulunan değerler ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. 100. saat sonunda ise enzimin aktivitesinin $\% 82.86 \pm$

4.81'ini koruduğu ve bu değerin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

Enzim, 65 °C'de 1-25 saat arasında inkübasyona bırakılmıştır. Enzim 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin % 69.95 ± 1.74 'ünü korumuş ve bu değer ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. 10. saat sonunda ise aktivitenin % 53.60 ± 0.88 'i korunmuştur.

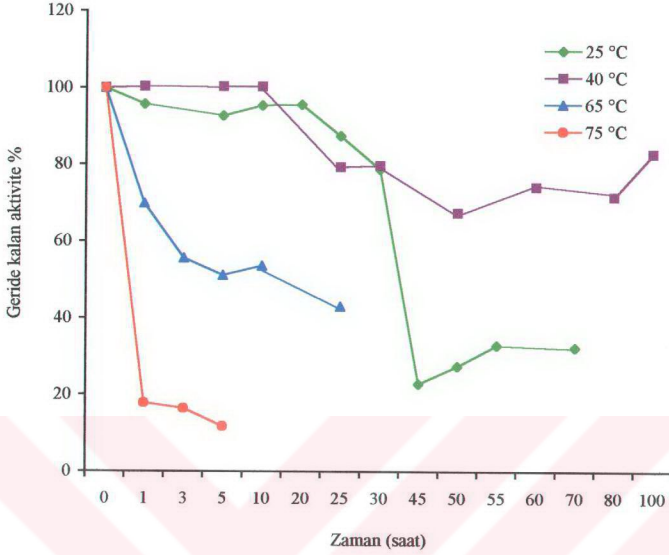
Enzim, 70 °C'de 1-5 saat arasında inkübasyona bırakılmıştır. Enzim, 1 saat inkübasyon sonunda ise, aktivitesinin sadece % 17.95 ± 3.23 'ünü geri kazanabilmiş ve bu değer ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır.

Enzimin, 25 °C'de 20 saat boyunca, 40 °C'de ise 10 saat boyunca aktivitesinin neredeyse tamamını koruduğu görülmektedir.

Tablo 31. *Bacillus* sp. 4 esteraz'ının farklı sıcaklıklardaki stabilitesi

İnkübasyon Zamanı (Saat)	Farklı sıcaklıklarda arta kalan aktivite %							
	25 °C (ORT. $\pm$ S.H.)	x	40 °C (ORT. $\pm$ S.H.)	x	65 °C (ORT. $\pm$ S.H.)	x	75 °C (ORT. $\pm$ S.H.)	x
Kontrol	100		100		100		100	
1	95.73 ± 2.42	#	100.31 ± 2.56	#	69.95 ± 1.74	**	17.95 ± 3.23	**
3	-	-	-	-	55.61 ± 1.53	**	16.49 ± 4.87	**
5	92.71 ± 1.20	*	100.29 ± 1.43	#	51.19 ± 2.98	**	11.75 ± 1.50	***
10	95.40 ± 0.45	*	100.30 ± 1.20	#	53.60 ± 0.88	***	-	-
20	95.60 ± 2.30	#	-	-	-	-	-	-
25	87.50 ± 1.07	**	79.33 ± 1.93	**	43.11 ± 0.15	***	-	-
30	78.80 ± 1.36	**	79.74 ± 1.62	**	-	-	-	-
45	22.90 ± 2.30	**	-	-	-	-	-	-
50	27.50 ± 0.90	***	67.31 ± 4.32	*	-	-	-	-
55	33.00 ± 2.58	**	-	-	-	-	-	-
60	-	-	74.16 ± 1.31	**	-	-	-	-
70	32.40 ± 1.81	**	-	-	-	-	-	-
80	-	-	71.62 ± 6.18	*	-	-	-	-
100	-	-	82.86 ± 4.81	#	-	-	-	-

ORT: Her veri üç tekrarı ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Farklı saatlerdeki kalan aktivite değerleri ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Farklı saatlerdeki kalan aktivite değerleri ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.



Şekil 26. *Bacillus* sp. 4 esterazının farklı sıcaklıklardaki stabilitesi.

3. 6. 3. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Enzim aktivitesi (U/mg protein) üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Tablo 32 ve Şekil 27'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla, enzimin pH 4.00-7.50 arasında aktiviteyi ölçülmüştür. Enzim aktivitesi, pH 7.50'nin üstündeki pH değerlerinde, pNPB'nin kendiliğinden hidroliz olması ve pH 7.00'den itibaren aktivitede düşüş olması sebebiyle ölçülmemiştir. Enzim aktivitesi pH 4.00'de en düşük seviyede olup (46.93 ± 3.44 U/mg protein), pH'daki 0.50'şer birimlik artışlarla beraber enzim aktivitesi de istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir. Maksimum enzim aktivitesi pH 6.00'da görülmekle birlikte (488.82 ± 12.69 U/mg protein), pH 5.50'de bulunan değer (478.24 ± 17.35 U/mg protein) arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. pH 6.50'den itibaren enzim aktivitesi önemli bir düşüş göstermiştir. Her ne kadar maksimum enzim aktivitesi pH 6.00'da görülmüş ise de, pH 4.50, 5.00, 5.50, 6.50, 7.00'de maksimum aktivitenin, sırasıyla % 40, 83, 98, 69, 42'si görülmüştür.

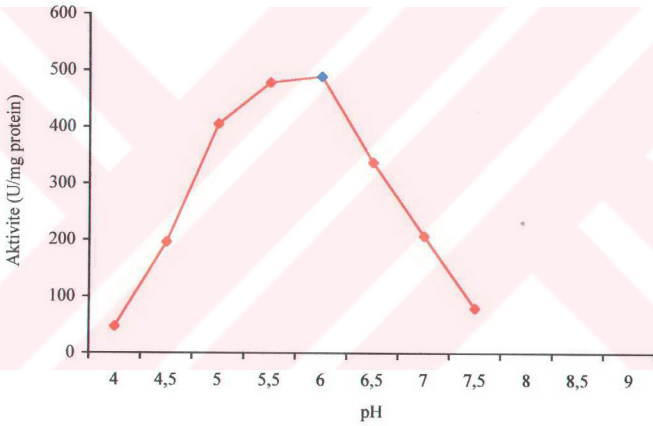
Tablo 32. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Spesifik aktivite (U/mg protein) (ORT. $\pm$ S.H.)	x
4.00	46.93 $\pm$ 3.44	a
4.50	196.58 $\pm$ 5.72	b
5.00	405.06 $\pm$ 12.37	c
5.50	478.24 $\pm$ 17.35	d
6.00	488.82 $\pm$ 12.69	d
6.50	336.75 $\pm$ 6.67	e
7.00	207.17 $\pm$ 4.47	b
7.50	79.33 $\pm$ 6.11	f

F= 313.09***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata ***: $p < 0.001$.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

**Şekil 27. *Bacillus* sp. 4 esterazının aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.**

3. 6. 4. Enzim stabilitesi üzerine pH'ın etkisi

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 33 ve Şekil 28'de gösterilmiştir. Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla enzim, farklı pH'larda (pH 4.00, 6.00, 8.00, 10.00) inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktivitesi tayin edilmiştir ve kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi, % olarak belirlenmiştir.

Enzim, pH 4.00'de 1-80 saat arasında inkübe edilmiştir. 1 saat inkübasyon sonunda aktivitenin neredeyse tamamını korumuş (% 98.87 ± 0.98) ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Enzimin ilk 10 saatlik inkübasyon sonunda, aktivitesinin % 83.21 ± 0.47'sini koruduğu ve bu değer ile kontrol arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür. 60. saatte enzim aktivitesinin yaklaşık % 50'den fazlası korunmuştur.

Enzim, pH 6.00'da 1-30 saat arasında inkübe edilmiştir. Enzim, 10 saat boyunca stabil kalmış ve bulunan değerlerin (yaklaşık % 100) kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Enzim, 24. saat sonunda ise aktivitesinin % 68.69 ± 1.22'sini, 30. saat sonunda ise % 29.75 ± 1.86'sını korumuştur.

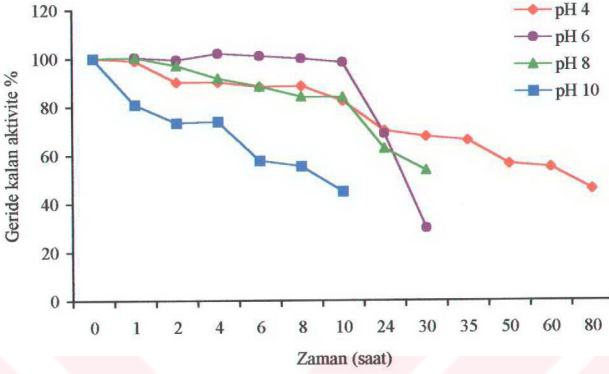
Enzim, pH 8.00'de 1-30 saat arasında inkübe edilmiştir. Enzim, 4. saate kadar aktivitesinin % 91.56 ± 2.23'ünü korumuş olup kontrol grubuyla arasındaki fark önemsiz çıkmıştır. 30. saat sonunda ise aktivitenin yaklaşık % 50'den fazlası geri kazanılmıştır.

Enzim, pH 10.00'da 1-30 saat arasında inkübe edilmiştir. 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin % 80.84 ± 2.74'ünü korumuştur. Aktivite, zaman ilerledikçe düşüş göstermiş, ancak 6-30. saatler arasında aktivitenin yaklaşık % 50'si korunmuştur. Enzimin, geniş bir pH aralığında stabil olduğu görülmüş ve pH 4.00'de 1 saat boyunca, pH 6.00'da 10 saat boyunca ve pH 8.00'de ise 4 saat boyunca aktivitesini tamamen korumuştur.

Tablo 33. *Bacillus* sp. 4 esteraz'ının farklı pH'lardaki stabilitesi

İnkübasyon Zamanı (Saat)	Farklı pH'larda arta kalan aktivite %							
	pH 4.00 (ORT. ± S.H.)	x	pH 6.00 (ORT. ± S.H.)	x	pH 8.00 (ORT. ± S.H.)	x	pH 10.00 (ORT. ± S.H.)	x
Kontrol	100		100		100		100	
1	98.87 ± 0.98	#	100.20 ± 2.25	#	100.19 ± 1.46	#	80.84 ± 2.74	*
2	89.96 ± 1.76	*	99.22 ± 1.76	#	96.88 ± 1.65	#	73.24 ± 1.52	**
4	89.96 ± 0.57	**	101.85 ± 0.51	#	91.56 ± 2.23	#	73.87 ± 2.32	**
6	88.13 ± 2.35	*	100.78 ± 1.87	#	88.25 ± 0.48	**	57.62 ± 2.03	**
8	88.47 ± 2.49	*	99.81 ± 1.55	#	84.04 ± 0.66	**	55.30 ± 1.87	**
10	82.21 ± 0.47	**	98.23 ± 1.70	#	83.85 ± 1.51	**	44.96 ± 5.75	*
24	69.99 ± 0.22	***	68.69 ± 1.22	**	62.57 ± 0.73	***	-	-
30	67.41 ± 0.46	***	29.75 ± 1.86	**	53.58 ± 1.83	**	61.42 ± 1.32	**
35	65.59 ± 0.11	***	-	-	-	-	-	-
50	56.14 ± 0.65	***	-	-	-	-	-	-
60	54.77 ± 0.30	***	-	-	-	-	-	-
80	45.89 ± 1.58	**	-	-	-	-	-	-

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Farklı saatlerdeki kalan aktivite değerleri ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Farklı saatlerdeki kalan aktivite değerleri ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001) olasılık düzeyinde önemlidir.



Şekil 28. *Bacillus* sp. 4 esterazının farklı pH'lardaki stabilitesi.

3. 6. 5. Enzim aktivitesi üzerine substrat (pNPB) konsantrasyonunun etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi Tablo 34'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine p-nitrofenil butirat'ın etkisini saptamak amacıyla, 10-200 μM arasında pNPB konsantrasyonları kullanılmıştır. Substrat konsantrasyonunun 10 μM 'dan (113.64 ± 1.8 U/mg protein), 80 μM 'a (456.25 ± 24.15 U/mg protein) kadar belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin kademeli olarak hızla arttığı ve bu değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (Şekil 29). 80 ve 100 μM konsantrasyon değerlerinde görülen aktiviteler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmamakla beraber az da olsa bir artış vardır. Aktivitedeki artış, 120-200 μM arasında maksimum seviyeye ulaşmıştır. Bu değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür.

Enzimın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, Lineweaver-Burk $y = a + bx$ doğru grafiğinden yararlanılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği, $1/v$ ye karşı $1/[S]$ olarak çizilmiştir (Şekil 30). Bu grafiğin doğru denklemi ise, $y = 0.0012 + 0.0755x$ olarak bulunmuştur. Tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise 0.99 dur. Denklemden doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{\text{max}} = 0.0012$ değerini verdiğinden, V_{max} değeri 833.33 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Doğrunun yatay eksenini kestiği nokta ise, $-1/K_m = -0.0159$ değerinde olup, K_m değeri 62.89 μM pNPB olarak bulunmuştur.

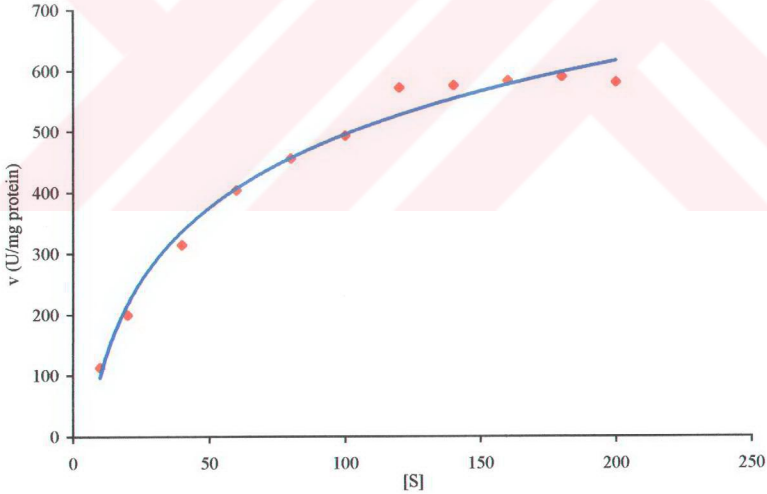
Tablo 34. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine substrat (pNPB) konsantrasyonunun (mM) etkisi

[S]	v (ORT. $\pm$ S.H.)	x	1/v	1/[S]
10	113.64 $\pm$ 1.80	a	0.0088	0.100
20	200.00 $\pm$ 2.41	b	0.0050	0.050
40	314.66 $\pm$ 13.10	c	0.00318	0.025
60	404.29 $\pm$ 16.77	d	0.00247	0.017
80	456.25 $\pm$ 24.15	e	0.00219	0.013
100	493.00 $\pm$ 32.36	e	0.00203	0.010
120	571.58 $\pm$ 2.53	f	0.00175	0.008
140	575.39 $\pm$ 4.57	f	0.00174	0.007
160	582.99 $\pm$ 1.27	f	0.00172	0.006
180	589.32 $\pm$ 5.81	f	0.00170	0.006
200	580.45 $\pm$ 2.53	f	0.00172	0.005
F= 143.63***				

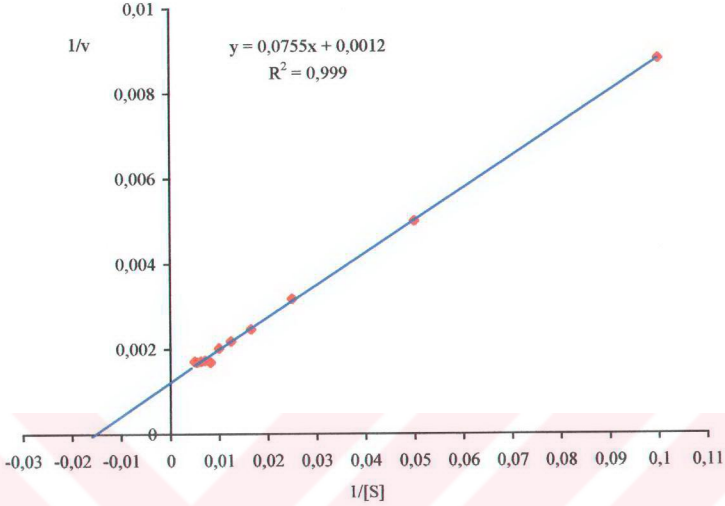
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : $p < 0.001$.

x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

v: U/mg protein.



Şekil 29. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis- Menten Grafiği)



Şekil 30. *Bacillus* sp. 4 esterazının aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği).

3. 6. 6. Polihidrik alkollerin enzim stabilitesi üzerine etkisi

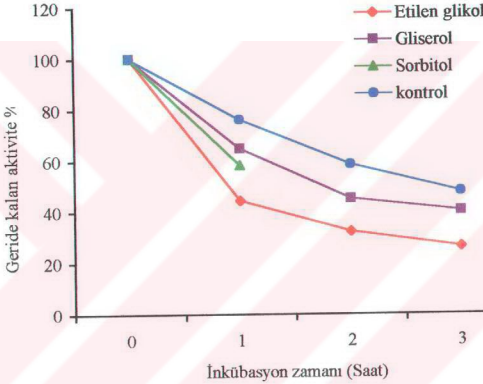
Etilen-glikol, sorbitol ve gliserol gibi polihidrik alkollerin enzim stabilitesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 35 ve Şekil 31'de gösterilmiştir. Enzim stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisini belirlemek amacıyla, enzim 1-3 saat boyunca etilen glikol, sorbitol ve gliserol içeren ortamlarda 65 °C'de inkübe edilerek, 0. saate göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlendi. Herhangi bir kimyasal içermeyen kontrol grubunun da aktivitesi aynı koşullar altında belirlendi.

Kontrol grubunun 1. saat sonunda kalan aktivitesi % 75.93 ± 4.20 , 3. saatte ise % 47.66 ± 2.93 olarak bulunmuş olup 0. saat ile aralarındaki fark önemlidir. Her üç maddenin de aktiviteyi, kontrol grubuna göre daha fazla düşürdüğü görülmüştür. Enzimin etilen glikol, sorbitol ve gliserol ile 1 saat inkübasyonu sonucunda kalan aktiviteleri sırasıyla, % 44.38 ± 2.83 , % 58.22 ± 3.04 ve % 64.81 ± 1.07 olarak bulunmuştur. Bu değerler ile 0. saat arasındaki farkın ise istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür.

Tablo 35. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi

Polihidrik alkoller	Farklı inkübasyon zamanlarında (saat) arta kalan aktivite %					
	0	1 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	2 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	3 (ORT. $\pm$ S.H.)
Kontrol	100	75.93 $\pm$ 4.20	*	58.45 $\pm$ 6.07	*	47.66 $\pm$ 2.93
Etilen glikol	100	44.38 $\pm$ 2.83	**	32.16 $\pm$ 0.87	***	26.24 $\pm$ 0.32
Gliserol	100	64.81 $\pm$ 1.07	**	44.98 $\pm$ 1.37	**	40.15 $\pm$ 0.94
Sorbitol	100	58.22 $\pm$ 3.04	**	-	-	-

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Polihidrik alkoller ile 0.saat arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Polihidrik alkoller ile 0.saat arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.

Şekil 31. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi.

3. 6. 7. Enzim aktivitesi üzerine EDTA ve metal iyonlarının etkisi

Enzim aktivitesi üzerine EDTA ve çeşitli metal iyonlarının etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 36'da gösterilmiştir. Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla metal iyonları (FeCl_3 , HgCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , MnCl_2 , NiCl_2 , CaCl_2 , KCl , NaCl , LiCl ve $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$) 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda, EDTA ise 1 mM konsantrasyonda deney ortamına eklenmiş ve inkübasyon sonunda kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlenmiştir (Şekil 32-35).

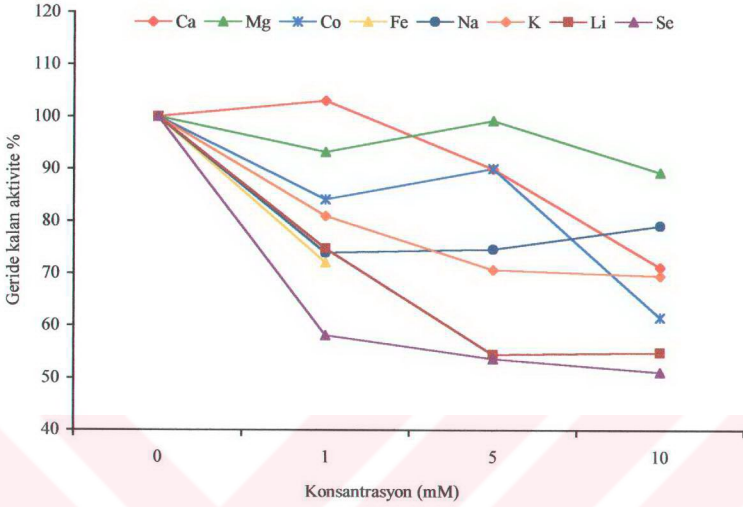
Tablo 36. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi

Metal İyonu	Farklı metal iyon konsantrasyonlarında (mM) arta kalan aktivite %						
	Kontrol	1 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	5 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	10 (ORT. $\pm$ S.H.)	x
CaCl ₂	100	102.99 $\pm$ 0.29	**	89.89 $\pm$ 1.87	*	71.15 $\pm$ 1.72	**
MnCl ₂	100	159.70 $\pm$ 3.31	**	158.55 $\pm$ 0.33	***	189.55 $\pm$ 2.74	**
MgCl ₂	100	93.21 $\pm$ 1.56	*	99.14 $\pm$ 1.01	#	89.25 $\pm$ 2.27	*
NiCl ₂	100	133.38 $\pm$ 1.63	**	103.76 $\pm$ 1.47	#	86.56 $\pm$ 1.67	*
CoCl ₂	100	84.11 $\pm$ 1.33	**	90.03 $\pm$ 2.45	#	61.56 $\pm$ 2.39	**
HgCl ₂	100	3.41 $\pm$ 0.28	***	-		-	
CuCl ₂	100	10.78 $\pm$ 1.46	***	3.31 $\pm$ 0.11	***	-	
FeCl ₃	100	72.07 $\pm$ 1.13	**	-		-	
NaCl	100	73.89 $\pm$ 2.25	**	74.54 $\pm$ 2.71	*	79.09 $\pm$ 2.37	*
KCl	100	80.91 $\pm$ 0.91	**	70.65 $\pm$ 1.45	**	69.48 $\pm$ 1.91	**
Na ₂ O ₃ Se	100	58.16 $\pm$ 0.87	***	53.63 $\pm$ 1.35	**	51.13 $\pm$ 1.97	**
LiCl ₂	100	74.71 $\pm$ 0.27	***	54.49 $\pm$ 0.34	***	54.88 $\pm$ 0.74	***
EDTA	100	51.64 $\pm$ 0.47	***	53.11 $\pm$ 0.96	***	53.47 $\pm$ 0.21	***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Metal iyonları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Metal iyonları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.

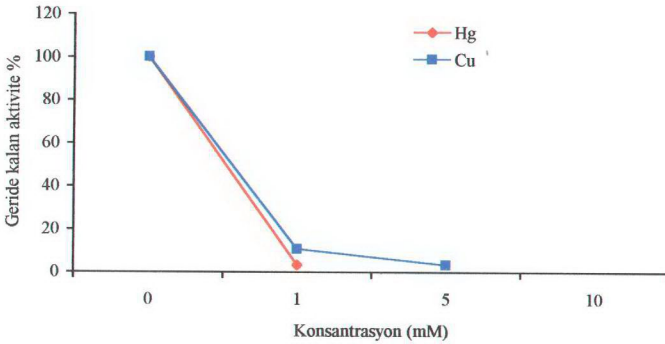
Ca⁺², Mg⁺² ve Co⁺² iyonlarının 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarında aktivitenin büyük bir kısmı korunmuştur. 5 mM'lık konsantrasyonda, Mg⁺² ve Co⁺² için saptanan değerlerin (% 99.14 $\pm$ 1.01 ve % 90.03 $\pm$ 2.45) kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı, Ca⁺² için bulunan değer (% 89.89 $\pm$ 1.87) önemli olduğu saptansa bile aktivitenin yaklaşık % 90'ının korunduğu söylenebilir. Ca⁺² ve Mg⁺² iyonlarının 10 mM'lık konsantrasyonları, aktivitede hafif bir düşüşe neden olurken (% 71.15 $\pm$ 1.72 ve % 89.25 $\pm$ 2.27), Co⁺² ile yapılan denemede bu düşüş daha belirgindir (% 61.56 $\pm$ 2.39) (Şekil 32).

Fe⁺³ iyonunun 1 mM'lık konsantrasyonunda elde edilen değer, kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptansa da aktivitenin % 70'den fazlasının korunması inhibisyonun çok ileri boyutlarda olmadığını göstermektedir. Fe⁺³ iyonunun 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında aşırı bir renk ve çökelek oluşumu gözlemlendiğinden bu konsantrasyonlarda ölçüm alınamamıştır. Na⁺ ve K⁺ iyonlarının her üç konsantrasyonunda da bulunan değerler birbirine yakın olup, kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Ancak, aktivitenin % 70'den fazlasının korunmuş olması dikkate değerdir. Li⁺²'nin 1 mM konsantrasyonunda, aktivitenin % 74.71 $\pm$ 0.27'si korunurken, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda aktivitenin yaklaşık % 55'i korunmuştur. Bu değerler ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Na₂O₃Se her üç konsantrasyonunda da kalan aktivitenin yaklaşık % 60'a yakını korunmuş ve bu değerler ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (Şekil 32).



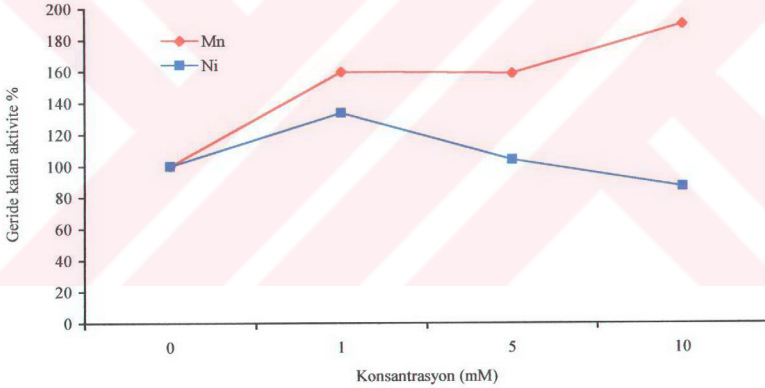
Şekil 32. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi

Hg^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının 1 mM konsantrasyonları enzimi kuvvetli bir şekilde inhibe etmiş ve aktivitenin ancak sırasıyla, $\% 3.41 \pm 0.28$ ve $\% 10.78 \pm 1.46$ 'sı geri kazanılmıştır. Bu değerler ile kontrol arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli çıkmıştır (Şekil 33).



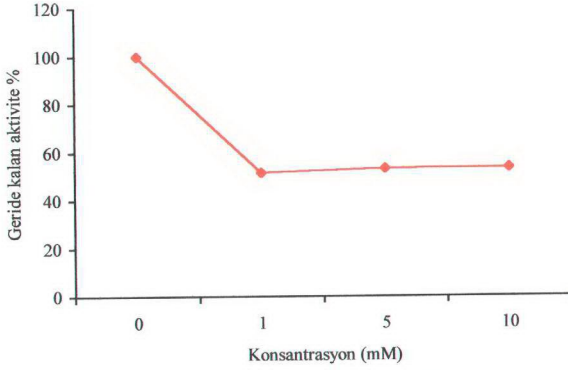
Şekil 33. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine Hg ve Cu iyonlarının etkisi.

Mn^{+2} iyonunun her konsantrasyonu, enzimi kuvvetli bir şekilde aktive etmiş ve enzim aktivitesi 1 mM konsantrasyon denendiğinde $\% 159.7 \pm 3.31$ 'e çıkarken, bu değer 10 mM konsantrasyonda $\% 189.55 \pm 2.74$ 'e kadar yükselmiştir. Bulunan bu değerlerin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Ni^{+2} iyonunun 1 mM konsantrasyonu Mn^{+2} kadar olmasa da enzimi aktive etmiştir ($\% 133.38 \pm 1.63$). Ayrıca, bu değerlerin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Ni^{+2} 'in 5 mM konsantrasyonu enzim aktivitesini çok fazla değiştirmemiştir ($\% 103.76 \pm 1.47$) ve bu değerlerin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Ni^{+2} 'in 10 mM'lık konsantrasyonunun ise, aktivitede hafif bir inhibisyona neden olduğu görülmüştür ($\% 86.56 \pm 1.67$) ve bu değer ile kontrol arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemlidir (Şekil 34).



Şekil 34. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine Mn ve Ni iyonlarının etkisi.

EDTA'nın ise, her üç konsantrasyonunda da bulunan değerler birbirine oldukça yakın çıkmış ve aktivitenin yaklaşık $\% 50$ sini inhibe ettiği saptanmıştır. Bu değerlerin kontrol ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (Şekil 35).



Şekil 35. *Bacillus* sp 4 esteraz aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi.

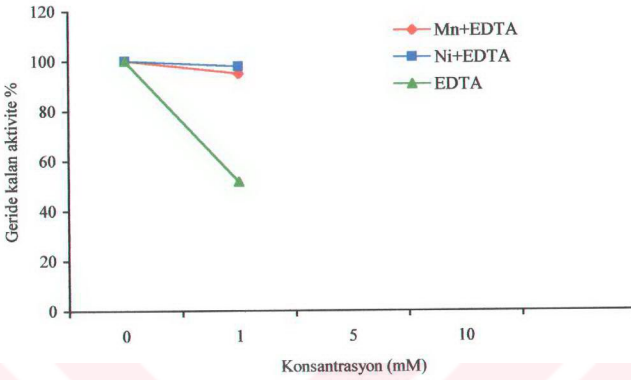
3. 6. 8. Esteraz aktivitesi üzerine aktive edici metal iyonları ve EDTA'nın etkisi

Enzimin aktivasyonuna neden olan Mn^{+2} ve Ni^{+2} 'in, EDTA'nın inhibe edici etkisini tolere edip etmeyeceğini denemek amacıyla metal iyonları ve EDTA, konsantrasyonları 1mM olacak şekilde deney ortamına eklenmiş ve inkübasyon sonunda kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Bu denemeye ilgili sonuçlar Tablo 37 ve Şekil 36'da gösterilmiştir. Her iki metal iyonu da EDTA'nın inhibe edici etkisini tolere ederek (Mn % 94.80 ± 0.76 , Ni % 97.83 ± 1.18) aktivitenin neredeyse tamamı geri kazanılmıştır.

Tablo 37. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine EDTA'lı ve EDTA'sız metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu	Reaksiyon karışımında arta kalan aktivite %		
	Kontrol	1 mM EDTA + Metal iyonu (ORT. $\pm$ S.H.)	x
MnCl ₂	100	94.80 $\pm$ 0.76	*
NiCl ₂	100	97.83 $\pm$ 1.18	#

ORT: Her veri üç tekrarin ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Metal iyonları ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Metal iyonları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.



Şekil 36. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine EDTA-metal iyonları ve EDTA'nın etkisi.

3. 6. 9. Çeşitli deterjanların enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek amacıyla, deterjanlar, 2.5, 5, 10 ve 20 mM konsantrasyonlarda ortama eklenmiş ve inkübasyon sonunda kontrole göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlenmiştir.

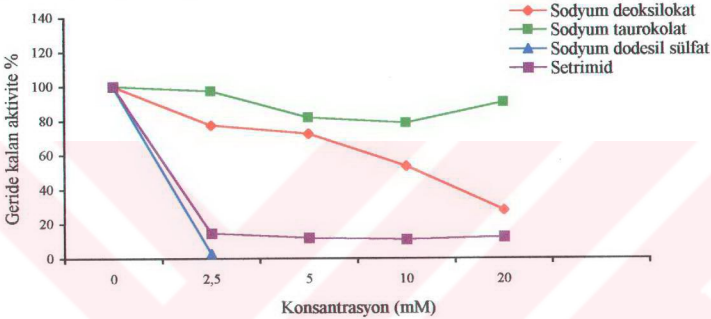
Enzim aktivitesi üzerine iyonik deterjanların etkisi

Enzim aktivitesi üzerine iyonik deterjanların etkisi ile ilgili sonuçlar, Tablo 38 ve Şekil 37'de gösterilmiştir. Sodyum taurokolat'ın 2.5-20 mM arasındaki konsantrasyonlarda elde edilen değerler ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıksa da, aktivitenin yaklaşık % 78-97'sinin korunduğu görülmüştür. Sodyum deoksikolat'ın 2.5 mM'dan 20 mM'a kadar olan konsantrasyonlarında, aktivitenin kademeli olarak düştüğü ve kontrol ile aralarındaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Ancak 10 mM konsantrasyonda bile aktivitenin % 53'lük kısmı korunmuştur. Sodyum dodesil sülfatın ise 2.5 mM'lık konsantrasyonu bile enzim aktivitesini neredeyse tamamen inhibe etmiştir (% 2.63 ± 0.43). Setrimid ise enzimi büyük oranda inhibe etmiştir (enzim aktivitesinin % 15'den azı geri kazanılabilmektedir). Denenen tüm konsantrasyonlarda elde edilen değerlerin kontrol ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür.

Tablo 38. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine iyonik deterjanların etkisi

İyonik Deterjan	Farklı deterjan konsantrasyonlarında (mM) arta kalan aktivite %								
	Kontrol	2.5 (ORT. ± S.H)	x	5 (ORT. ± S.H)	x	10 (ORT. ± S.H)	x	20 (ORT. ± S.H)	x
Sodyum deoksilokat	100	77.41 ± 2.23	*	72.59 ± 1.23	**	53.61 ± 0.67	***	27.94 ± 2.67	**
Sodyum taurokolat	100	97.29 ± 0.52	*	82.03 ± 0.98	**	78.76 ± 1.27	**	90.51 ± 0.52	**
Sodyum dodesil sülfat	100	2.63 ± 0.43	***	-		-		-	
Setrimid	100	14.71 ± 0.48	***	11.90 ± 0.71	***	10.96 ± 0.35	***	12.43 ± 0.46	***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Deterjanlar ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Deterjanlar ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001) olasılık düzeyinde önemlidir.

**Şekil 37. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine iyonik deterjanların etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine non-iyonik deterjanların etkisi

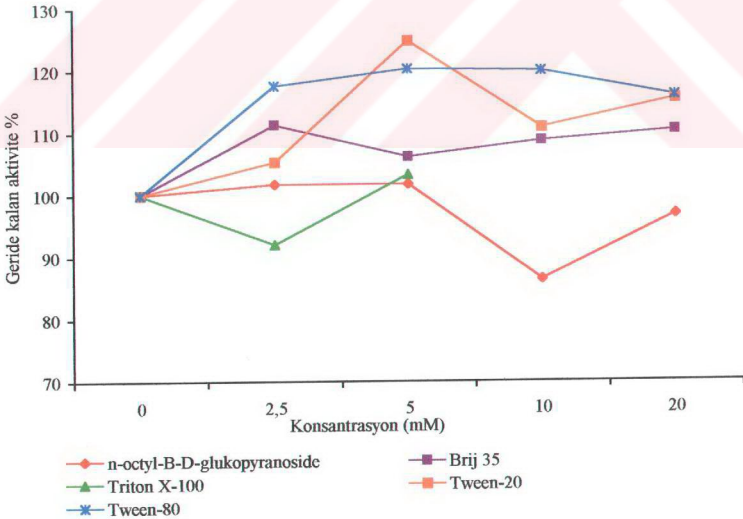
Enzim aktivitesi üzerine non-iyonik deterjanların etkisi ile ilgili sonuçlar, Tablo 39 ve Şekil 38'de gösterilmiştir. n-oktil-β-D-glukopiranozid'in 2.5 ve 5 mM'luk konsantrasyonlarında enzim aktivitesi korunmuş ve elde edilen değerler ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. 10 ve 20 mM'luk konsantrasyonlarda elde edilen değerlerin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptansa da, aktivite büyük ölçüde korunmuştur. Brij 35'in denenen bütün konsantrasyonları, enzim aktivitesini artırmış ve 5 mM'luk konsantrasyon dışında, bulunan değerlerin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Triton X-100, yüksek konsantrasyonlarda ortamda bulanıklık yarattığı için 10 ve 20 mM'luk konsantrasyonları denenememiştir. Konsantrasyon 2.5 mM'dan 5 mM'a çıkarıldığında aktivitede hafif bir artış gözlenmiş ve bulunan değerlerin kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Tween 20'nin 2.5 mM'luk konsantrasyonunda elde edilen değer ile

kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmasa da enzim aktivitesinde hafif bir artış olduğu görülmüştür. Daha yüksek konsantrasyonlarda, bu artışın daha belirgin olduğu saptanmıştır. Enzim aktivitesi en yüksek değerine 5 mM'lık konsantrasyonda ulaşmıştır (124.74 ± 2.03). Tween 80 ile yapılan denemede de Tween 20 ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Enzim aktivitesi denenen her konsantrasyonda aktive edilmiştir. Bulunan değerler birbirine yakın olmakla beraber kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Bu sonuçlara dayanarak, non-iyonik deterjanların genel olarak enzim aktivitesini inhibe etmeyip, aksine aktivasyona neden oldukları görülmüştür.

Tablo 39. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine non-iyonik deterjanların etkisi

Non-iyonik deterjan	Farklı deterjan konsantrasyonlarında (mM) arta kalan aktivite %							
	Kontrol	2.5 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	5 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	10 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	20 (ORT. $\pm$ S.H.)
n-oktil- β -D-glukopiranozid	100	101.74 $\pm$ 0.48	#	101.73 $\pm$ 0.75	#	86.37 $\pm$ 1.41	*	96.79 $\pm$ 0.48
Brij 35	100	111.27 $\pm$ 0.89	**	106.15 $\pm$ 1.73	#	108.64 $\pm$ 0.53	**	110.24 $\pm$ 1.01
Triton X-100	100	92.05 $\pm$ 0.58	**	103.21 $\pm$ 0.13	**	-	-	-
Tween-20	100	105.27 $\pm$ 2.56	#	124.74 $\pm$ 2.03	**	110.83 $\pm$ 1.30	*	115.37 $\pm$ 1.17
Tween-80	100	117.57 $\pm$ 0.29	***	120.20 $\pm$ 1.02	**	119.91 $\pm$ 1.52	**	115.81 $\pm$ 3.21

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Deterjanlar ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Deterjanlar ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.



Şekil 38. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine non-iyonik deterjanların etkisi.

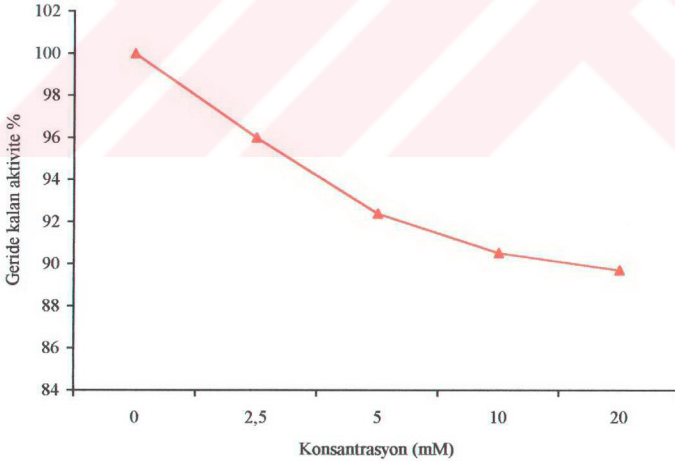
Enzim aktivitesi üzerine zwitteriyonik deterjan etkisi

Enzim aktivitesi üzerine zwitteriyonik (CHAPS) deterjan etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 40 ve Şekil 39'de gösterilmiştir. CHAPS' in 2.5 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarında aktivite büyük oranda korunmuş ve elde edilen sonuçlar ile kontrol arasındaki farkın önemli olmadığı görülmüştür. 10 ve 20 mM'lık konsantrasyonlarda elde edilen sonuçlar ile kontrol arasındaki fark önemli çıkmış olsa da aktivitenin neredeyse % 90'ı korunmuştur.

Tablo 40. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine zwitteriyonik ve katyonik deterjanların etkisi

Deterjan	Farklı deterjan konsantrasyonlarında (mM) arta kalan aktivite %								
	Kontrol	2.5 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	5 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	10 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	20 (ORT. $\pm$ S.H.)	x
CHAPS	100	95.99 $\pm$ 2.68	#	92.38 $\pm$ 2.70	#	90.51 $\pm$ 1.74	*	89.71 $\pm$ 0.27	**

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Deterjanlar ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Deterjanlar ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.



Şekil 39. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine zwitteriyonik deterjanın etkisi.

3. 6. 10. Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi ile ilgili sonuçlar, Tablo 41 ve Şekil 40-41'de gösterilmiştir. Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, kullanılan organik çözücüler (aseton, asetonitril ve 1,4-dioksan % 20 ve 50, dimetilsülfoksit (DMSO), etanol ve metanol % 50 ve 80), çeşitli konsantrasyonlarda ortama eklenmiş ve inkübasyon sonunda kontrole göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlenmiştir.

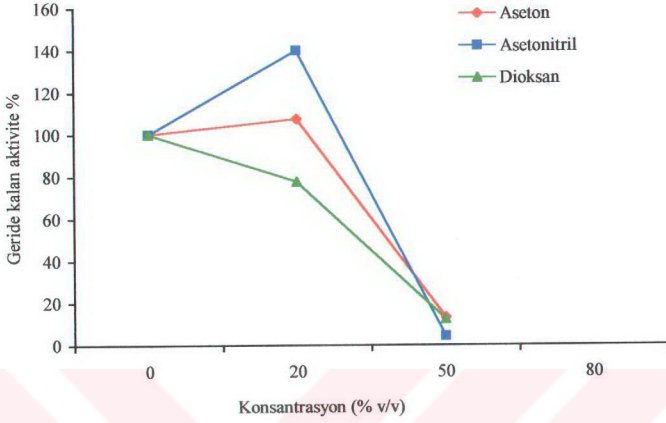
Tablo 41. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

Organik Çözücüler	Farklı çözücü konsantrasyonlarında (% v/v) arta kalan aktivite (%)						
	Kontrol	20 (ORT. ± S.H.)	x	50 (ORT. ± S.H.)	x	80 (ORT. ± S.H.)	x
Aseton	100	107.35 ± 0.63	**	13.22 ± 0.20	***	-	
Asetonitril	100	139.77 ± 1.57	**	4.29 ± 0.45	***	-	
Dioksan	100	77.57 ± 0.91	**	12.27 ± 0.91	***	-	
Etenol	100	-		49.60 ± 1.30	**	11.64 ± 1.24	***
Metanol	100	-		97.74 ± 0.74	#	2.37 ± 1.20	***
Dimetilsülfoksit	100	-		106.99 ± 1.15	*	2.51 ± 0.35	***

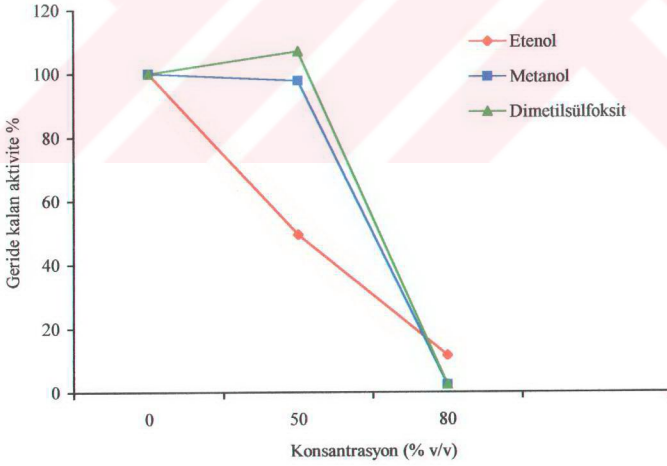
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: Organik çözücüler ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: Organik çözücüler ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.

Aseton ve asetonitrilin % 20'lik konsantrasyonları istatistiksel olarak enzimi önemli oranda aktive etmiş ve kalan enzim aktiviteleri sırasıyla % 107.35 ± 0.63 ve % 139.77 ± 1.57 olarak bulunmuştur. Bu çözücülerin % 50'lik konsantrasyonları ise enzimi kuvvetli bir şekilde inhibe etmiş ve kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Dioksan'ın % 20'lik konsantrasyonu enzim aktivisinde hafif bir inhibisyona neden olurken (% 77.57 ± 0.91), % 50'lik konsantrasyonu enzimi kuvvetli şekilde inhibe etmiştir. Bu değerler ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Şekil 40).

Etenol'ün % 50'lik konsantrasyonu enzimin neredeyse % 50'sini inhibe ederken, % 80'lik konsantrasyonunda ise, daha güçlü bir inhibisyon söz konusudur (% 11.64 ± 1.24). Metanol'ün % 50'lik konsantrasyonunda enzim aktivitesi büyük oranda korunmuş olup elde edilen değer ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. Buna karşın % 80'lik konsantrasyon aktiviteyi neredeyse tamamen inhibe etmiştir. DMSO'nun % 50'lik konsantrasyonu aktivitede hafif bir artışa neden olurken (% 106.99 ± 1.15), % 80'lik konsantrasyonu enzim aktivitesini neredeyse tamamen inhibe etmiştir. Elde edilen sonuçlar ile kontrol arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemlidir (Şekil 41).



Şekil 40. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.



Şekil 41. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.

3. 6. 11. Enzim aktivitesi üzerine inhibe edici ajanların etkisi

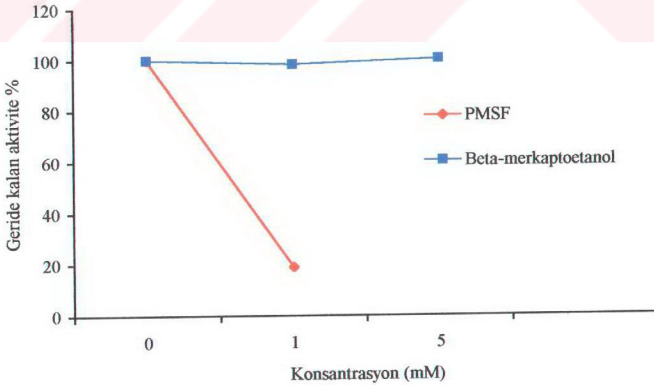
Enzim aktivitesi üzerine inhibe edici ajanların etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 42 ve Şekil 42’de gösterilmiştir. İnhibe edici ajanların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, bir serin inhibitörü olan fenil metil sülfonil florit (PMSF) ile SH-grubu inhibitörü olan β -merkaptetanol kullanılmıştır. İnhibitörler, enzimin bulunduğu ortama eklenmiş ve inkübasyon sonunda kontrole göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlenmiştir.

PMSF’nin 1 mM’lık konsantrasyonu bile enzim aktivitesini kuvvetli şekilde inhibe etmiştir (% 19.03 $\pm$ 3.06). Buna karşın β -merkaptetanol’ün ne 1 mM’lık ne de 5 mM’lık konsantrasyonları enzim aktivitesinde herhangi bir değişiklik meydana getirmemiş ve elde edilen sonuçlar ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür.

Tablo 42. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi

İnhibitör	Farklı inhibitör konsantrasyonlarında (mM) arta kalan aktivite %				
	Kontrol	1 (ORT. $\pm$ S.H.)	x	5 (ORT. $\pm$ S.H.)	x
PMSF	100	19.03 $\pm$ 3.06	**	-	
β -merkaptetanol	100	98.24 $\pm$ 1.06	#	100.29 $\pm$ 1.30	#

ORT: Her veri üç tekrarin ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. #: İnhibitörler ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. x: İnhibitörler ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.



Şekil 42. *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine inhibitörlerin etkisi.

3. 6. 12. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi

Enzimin substrat spesifitesi ile ilgili sonuçlar Tablo 43 ve Şekil 43'de gösterilmiştir. Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla, p-nitrofenil asetat (pNPA), p-nitrofenil butirat (pNPB), p-nitrofenil laurat (p-NPL) ve p-nitrofenil palmitat (p-NPP) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların hepsi istatistiksel olarak birbirinden farklı çıkmıştır. Enzim, en yüksek aktiviteyi pNPB'a karşı göstermiştir (210.46 ± 1.85 U/ml). Enzimin pNPA'a karşı olan aktivitesi ise 146.59 ± 2.13 U/ml olarak bulunmuştur. Enzimin pNPL'a karşı olan aktivitesi sadece 23.41 ± 0.61 U/ml'dir. Enzim, pNPP'a karşı ise hiç aktivite göstermemiştir.

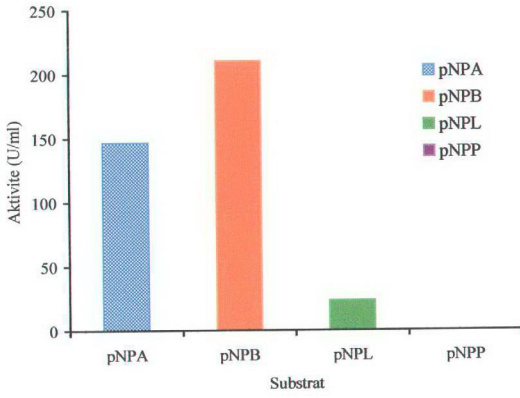
Enzimin pNPB'a karşı gösterdiği aktivite değeri kontrol olarak kabul edilip, diğer substratların bu değere göre kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Buna göre pNPA için kalan aktivite % 69.78 ± 1.01 olarak bulunmuştur. Bu değer kontrol grubuyla arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. pNPL ve pNPP'nin kalan aktiviteleri ise sırasıyla % 11.14 ± 0.29 ve % 0 olarak saptanmış ve bu değerlerin kontrol ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür.

Tablo 43. *Bacillus* sp. 4 esteraz'ının substrat spesifitesi

Substrat	Aktivite (U/ml) (ORT. $\pm$ S.H.)	x	Nispi aktivite % (ORT. $\pm$ S.H.) x	y
pNPA	146.59 ± 2.13	a	69.78 ± 1.01	**
pNPB	210.46 ± 1.85	b	100	-
pNPL	23.41 ± 0.61	c	11.14 ± 0.29	***
pNPP	0.00 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	***

F= 4830.27***

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. *** : $p < 0.001$. x : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. y: Farklı substratlar ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel fark * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) olasılık düzeyinde önemlidir.



Şekil 43. *Bacillus* sp. 4 esterazının substrat spesifitesi.

4. TARTIŞMA

Aydın ili Germencik ilçesi Bozköy-Alangüllü termal sularından elde edilen *Bacillus* genusuna ait 5 izolatın (Başbülül, 2002), esteraz üretilip üretilmediği kalitatif olarak Tween 80 agar yöntemi ile belirlenmiş (Haba et al., 2000) ve en belirgin zon oluşumu 4 numaralı izolatta gözlemlendiği için, bu izolatın diğer dört izolata göre, en iyi şekilde esteraz ürettiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, termofilik *Bacillus* sp. 4 izolatı kültür ortamında üretilerek esterazı kısmi olarak saflaştırılmış, enzimin optimum pH ve sıcaklığı, pH ve sıcaklık stabilitesi, substrat spesifitesi belirlenmiş ve esteraz aktivitesi üzerine metal iyonlarının, EDTA'nın, polihidrik alkollerin, inhibitörlerin, çeşitli deterjanların, organik çözücülerin ve substrat konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır.

Mikroorganizmanın en iyi enzim ürettiği optimum sıcaklık ve pH ile enzim üretiminin derecesini belirlemek amacıyla, *Bacillus* sp. 4 izolatı çeşitli sıcaklıklarda ve pH'larda geliştirildi. Organizma, 50 °C'de 6. saatten , 55 °C'de 5. saatten ve 70 °C'de 4. saatten itibaren üremeye başlamış, buna karşın 60 ve 65 °C'de 2. saatten itibaren gelişim gözlenmiştir. Organizma 60 °C'de 7. saatte, 65 °C'de ise 6. saatte durgunluk dönemine girmiştir. Organizmanın, 60 ve 65 °C'deki gelişim durumları birbirine oldukça benzerdir. Ancak, 65 °C'de, maksimum enzim aktivitesi gözlenmiştir. Organizmanın 65 °C'de, üreme dönemine ve durgunluk fazına erken ulaşmış olması ve ortamdaki enzim aktivitesinin diğer sıcaklıklara göre daha yüksek olması nedeniyle, bu sıcaklığın esteraz üretimi için optimum olduğu düşünülmüştür. Bununla beraber, organizma denenen tüm sıcaklıklarda (50, 55, 60 ve 70 °C) 65 °C'de gözlemlenen maksimum aktivitenin en azından % 50'sini göstermiştir. Bu da, organizmanın geniş bir sıcaklık aralığında hem gelişim gösterdiğini hem de enzim ürettiğini kanıtlamaktadır. Ancak ortam pH'sı için durum biraz farklıdır. Organizma pH 5.50-9.00 arasındaki üretim ortamlarında gelişim göstermiştir. pH 6.00'da maksimum esteraz aktivitesi saptanmıştır. pH 5.50'de ise, maksimum aktivitenin yaklaşık olarak %84'ü görülmüştür. Fakat pH 6.00'nın üstünde aktivite belirgin bir şekilde düşmüştür. Bu sonuç, alkali koşulların *Bacillus* sp. 4 esteraz üretimini ve aktivitesini düşürdüğünü göstermektedir. *Bacillus* sp. 4 izolatının daha önceden saptanmış olan optimum gelişim koşullarıyla (65 °C ve pH 6.00) bire bir uygunluk göstermesi (Başbülül, 2002), organizmanın yaşam koşullarıyla enzim üretimi arasında bir paralellik olduğu genel görüşünü desteklemektedir.

Bacillus sp. 4 izolatının büyüme eğrisine bağlı olarak ortam pH'sı ve enzim aktivitesindeki değişim incelendiğinde, esteraz aktivitesi durgunluk fazının ortaları olan 9. saatte maksimum seviye ulaşmıştır. Bu sonuç, maksimum enzim aktivitelerini log fazının ortalarında veya sonlarında gösteren *Arthrobacter nicotianae* 9458 (Smacchi et al., 2000), *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 (Kakariari et al., 2000) ve *Lactobacillus casei* (Choi and Lee, 2001) esterazlarından farklı olmakla birlikte, durgunluk fazında maksimum aktivite gösteren *Bacillus licheniformis* esterazıyla (Alvarez-Nacarie et al., 1999) benzerdir. Ancak, *Bacillus* sp. 4 esteraz aktivitesi 9. saatten sonra ani bir düşüş göstermiştir. *Bacillus thermoleovorans* ID-1 ve *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 ile yapılan çalışmalarda da benzer bir durum görülmüştür (Lee et al., 1999; Kakariari et al., 2000). Bu düşüşün, esteraz enziminin bu sıcaklıkta stabil olmaması ve ortamdaki proteaz enzimlerinin etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu yüzden, bu gibi çalışmalarda kültür ortamına bir proteaz inhibitörünün (β -merkaptöetanol gibi) önceden katılmasıyla, bu ani düşüşün engelleneceği ve bu şekilde enzim aktivitesinin daha uzun süre korunabileceği düşünülmektedir. Kültür ortamının pH'sı gelişim başladığı saatten itibaren yavaş ama devamlı bir şekilde artarak, durgunluk fazının ortalarından itibaren alkali pH'ya doğru bir kayma göstermiştir. Bu da organizmanın metabolizması ile ilgili olarak, kültür ortamındaki bileşenlerin zamanla kullanılarak ortamda alkali ürünler oluştuğunu göstermektedir. Ortam pH'sının zamanla değişiminin kültür ortamının bileşimine, çeşitli çevre şartlarına ve tür içi ve türler arasındaki çeşitliliğe bağlı olduğu bilinmektedir.

Bacillus sp. 4 esterazının intraselüler veya ekstraselüler olup olmadığını belirlemek amacıyla, kültür ortamı santrifüjlenerek S_1 ve P_1 elde edilmiş ve bu fraksiyonlarda aktivite tayin edilmiştir. P_1 'in esteraz aktivitesi S_1 'e göre yaklaşık olarak % 71 daha fazladır. Aynı zamanda, spesifik aktiviteleri karşılaştırıldığında P_1 'in S_1 'e göre yaklaşık 13 kat daha yüksek olduğu görülmektedir. Yani enzim aktivitesi büyük oranda hücre fraksiyonunda saptanmıştır. Hücreler sonike edilerek parçalandıktan sonra elde edilen S_2 'nin spesifik aktivitesi tayin edildiğinde P_1 'e göre yaklaşık % 30'luk bir artış gözlenmiştir. Bu nedenle, esterazın kinetik parametreleriyle ilgili denemelere S_2 ile devam edilmiştir. Ancak, P_1 'deki aktivitenin de oldukça yüksek olması nedeniyle, esteraz aktivitesinin parçalanmamış hücreler kullanılarak da kolayca belirlenebileceği görülmektedir. Kademi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da benzer olarak hücreler parçalandıktan sonra aktivitede % 26'lık bir artış gözlenmiştir (Kademi et al., 1999). Hücreler parçalanmadan yapılan aktivite deneyi sonucunda, esteraz aktivitesinin oldukça yüksek çıkması, substratın hidrolizlenmeden önce hücre duvarının içinden geçtiğini

göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Kademi et al., 1999; Kakariari et al., 2000). Bu sonuçlara dayanarak, *Bacillus* sp. 4 esterazının sitoplazmik veya hücre membranına bağlı bir enzim olduğunu düşünmekteyiz.

Bacillus sp. 4 esterazının kısmi olarak saflaştırılması amacıyla, amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve diyalizatta 4.15 katlık bir saflaştırma elde edilmiştir. Ancak daha ileri saflaştırma teknikleri olan kolon kromatografi teknikleri uygulanamamıştır. Bu yüzden, esteraz enziminin molekül ağırlığı tayin edilememiştir. Ancak, esterazların molekül ağırlığının genellikle 20-160 kDa arasında olduğu bilinmektedir (Simoes et al., 1997).

Bacillus sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi araştırıldığında, aktivite 30 °C'den 65 °C'ye kadar lineer bir şekilde artarak maksimum seviyeye ulaştığı, 70 °C'de ise aktivitenin önemli bir kısmının (% 70) korunduğu görülmüştür. Esteraz aktivitesi, 70 °C'den sonra ani bir düşüş göstererek, 85 °C'de maksimum aktivitenin % 14'ünü göstermiştir. 40, 45, 50, 55, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda maksimum aktivitenin sırasıyla % 50, 63, 75, 86, 95 ve 70'i görülmüştür. Esteraz aktivitesinin büyük bir kısmının oldukça geniş bir sıcaklık aralığında korunmuş olması, bu enzimin 40 °C'den 70 °C'ye kadar olan herhangi bir sıcaklıkta kolaylıkla kullanılabileceğini göstermektedir. *Bacillus* sp. 4 esterazının geniş bir sıcaklık aralığında aktif olması, çeşitli endüstriyel uygulamalar açısından büyük avantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, *Bacillus* sp. 4 esteraz enziminin maksimum aktivitesini, izolatin optimum sıcaklığı olan 65 °C'de göstermiş olması, organizmanın yaşam koşuluyla enzim aktivitesi arasında bir uygunluk olduğunu göstermektedir. Optimum sıcaklığı, *Bacillus* sp. 4 esterazı ile aynı olan (65 °C) *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazı, 70 °C'de maksimum aktivitenin ancak % 50'sini göstermiştir (Kakariari et al., 2000). *Bacillus circulans* esteraz aktivitesi 25 °C'den 60 °C'ye kadar lineer bir şekilde artış gösterdiği, ancak daha sonra hızla düştüğü, 75 °C'de ise maksimum aktivitenin % 30'unu gösterdiği bildirilmiştir (Kademi et al., 2000). Hipertermofilik bir bakteri olan *Pyrobaculum calidifontis* VA1 esterazı ise maksimum aktivitesini 90 °C'de göstermiş ve 30 °C'de maksimum aktivitenin % 16'sı görülmüştür (Hotta et al., 2002). *Bacillus licheniformis* esterazı ise maksimum aktivitesini 45 °C'de göstermiş ve aktivite 40-55 °C arasında maksimum seviyede kalmış, 60 °C'de ise aktivitenin % 67'si görülmüştür (Alvarez-Macarie et al., 1999). *Lactobacillus casei* CL96 esterazı, optimum aktivitesini 37 °C'de göstermiş, 40 °C'ye kadar aktivitesini korumuş ve 50 °C'de aktivitesinin % 50'sini göstermiştir (Choi and Lee, 2001). Optimum sıcaklığı 30 °C olan *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazı, 10 ve 15 °C'de

maksimum aktivitenin sırasıyla % 37 ve 55'ini göstermiş ve 40 °C'in üstündeki sıcaklıklarda aktivite hızla düşmüştür (Smacchi et al., 2000).

Bacillus sp. 4 esterazının sıcaklık stabilitesi araştırıldığında ise, 25 °C'de 30 saat ve 40 °C'de 100 saat inkübasyon sonunda aktivitesini büyük oranda koruduğu görülmüştür. 65 °C'de, 1 saat sonunda aktivitenin yaklaşık % 70'i ve 10 saat sonunda ise % 50'den fazlası geri kazanılmıştır. 75 °C'de ise, 1 saat inkübasyon sonunda aktivitenin ancak % 18'i korunabilmiştir. *Bacillus* sp. 4 esteraz enziminin, 25 °C'den 65 °C'ye kadar geniş bir sıcaklık ve zaman aralığında oldukça stabil olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak *Bacillus* sp. 4 esterazının yüksek bir termostabiliteye sahip olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca, enzimin 40 °C'de 4 günden fazla stabil kalması, endüstriyel işlemler için oldukça uygun ve laboratuvar çalışmaları için ise, çalışılması kolay bir enzim olduğunun göstergesidir. *Bacillus licheniformis* esterazı, 64 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra aktivitenin % 50'si geri kazanılırken (Alvarez-Macarie et al., 1999), *Bacillus* sp. 4 esterazı 65 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra aktivitesinin % 70'ini korumuştur. *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazının, 45 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra maksimum aktivitenin % 60'ını geri kazandığı ve 65 °C'de 1 dakika inkübe edildiğinde ise aktivitesinin tamamen kaybolduğu saptanmıştır (Smacchi et al., 2000). *Arthrobacter viscosus* esterazı ise 37 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra aktivitesinin % 90'ını geri kazanmıştır (Cui et al., 1999). *Lactobacillus casei* CL96 esterazının, 40 °C'ye kadar stabil kaldığı ve 50 °C'de aktivitesinin % 50'sini koruduğu belirtilmiştir (Choi and Lee, 2001). *Bacillus circulans* esterazı 70 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesini % 100 korunmuştur, 85 °C'de ise aktivitenin % 50'si kalmıştır. Termofilik bakteri strainleri ile yapılan bir çalışmada ise, esterazın 70 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra aktivitesinin neredeyse tamamını (%97.5) geri kazandığı saptanmıştır (Kademi et al., 1999). Bununla beraber, *Bacillus stearothermophilus* esterazının, 70 °C'de 96 saat ve 90 °C'de 2 saat boyunca inkübe edildiğinde, orijinal aktivitesinin % 90'dan fazlasını geri kazandığı belirlenmiştir (Simoes et al., 1997). *Sulfolobus acidocaldarius* esterazı, 80 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra, aktivitesini tamamen korumaktadır, 90 °C'de ise aktivitenin % 92'si geri kazanılmıştır. 100 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra ise aktivitenin % 50'si geri kazanılmıştır (Sobek and Görisch 1988). Bir *Bacillus* esterazı ile yapılan çalışmada, enzimin 105 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra orijinal aktivitesinin % 90'ını koruduğu saptanmıştır (Owusu and Cowan, 1991). Hipertermofilik *Pyrobaculum calidifontis* VA1

esterazı ise, 100 °C'de 2 saat inkübasyondan sonra aktivitesini tamamen korumuştur (Hotta et al., 2002).

pNPB'nin belirli bir dalga boyunda ve farklı pH'lardaki molar absorbans katsayılarının farklı olması nedeniyle, pH ile ilgili denemelere geçmeden önce pNPB'nin farklı pH'lardaki molar absorbans katsayıları belirlenmiştir. *Bacillus* sp. 4 esterazı maksimum aktivitesini pH 6.00'da göstermiştir, ancak pH 5.50'de maksimum aktivitenin % 98'i görülmüştür. *Bacillus* sp. 4 esterazı, pH 4.00'de maksimum aktivitenin yaklaşık % 10'unu ve pH 7.50'de ise % 16'sını göstermiştir. pH 4.50 ve pH 7.00'de aktivitenin yaklaşık % 40'ı görülmüştür. Enzim, pH 5.00 ve 6.50'de ise maksimum aktivitenin sırasıyla % 83 ve 69'unu göstermiştir. Esterazların lipazlardan farklı olarak genellikle nötrale yakın pH değerlerinde (genellikle pH 6.00 civarında) maksimum aktivite gösterdikleri bilinmektedir (Fojan et al., 2000). *Bacillus* sp. 4 izolatından elde edilen enzimin maksimum aktivitesini pH 6.00'da göstermiş olması, bu enzimin bir esteraz olduğu görüşünü desteklemektedir. Bu sonuçlar enzimin geniş bir pH aralığında (pH 4.50-7.00) iş gördüğünü göstermektedir. Bununla birlikte enzimin düşük pH değerlerinde daha aktif olduğu görülmektedir. Elde edilen bu esterazın, geniş bir pH aralığında farklı endüstriyel uygulamalarda rahatlıkla kullanılabileceği söylenebilir. Çeşitli mikroorganizmaların esterazlarıyla yapılan çalışmalarda da optimum esteraz aktivitesinin nötral pH değerlerinde saptandığı görülmektedir. *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazının optimum pH'ı 6.00 olarak bulunmuş, pH 4.00'de maksimum aktivitesinin % 14'ünü, pH 8'de % 72'sini ve pH 9'da % 66'sını göstermiştir (Kakariari et al., 2000). *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazı optimum aktivitesini pH 7.00'de göstermiş ve pH 5.50, 6.00 ve 6.50'de maksimum aktivitesinin sırasıyla % 50, 75 ve 90'ını göstermiştir (Smacchi et al., 2000). *Arthrobacter viscosus* esterazı optimum aktivitesini pH 7.4'de göstermekle birlikte pH 8.0'in üzerinde aktivitesinin oldukça düştüğü belirtilmiştir (Cui et al., 1999). *Lactobacillus casei* CL96 ve *Pyrobaculum calidifontis* VA1 esterazları maksimum aktivitelerini pH 7.00'de göstermişler (Choi and Lee, 2001; Hotta et al., 2002), *Pseudomonas fluorescens* esterazı ise optimum aktivitesini pH 7.50'de göstermiştir (Khalemyzer et al., 1999). Bununla birlikte, daha önceden yapılan bazı çalışmalarda alkali pH'larda (pH 7.50-9.50) aktivite gösteren esterazlar da bulunmuştur (Sobek ve Görisch, 1988; Meghji et al., 1990; Owusu and Cowan, 1991; Kademi et al., 1999; Alvarez-Macarie et al., 1999). Ancak bu esterazların lipazlarla bazı benzer özellikleri paylaştıkları saptanmıştır.

Bacillus sp. 4 esterazının oldukça geniş bir pH aralığında stabil olduğu görülmüş, pH 4.00'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin neredeyse tamamını, 10 saat sonunda % 82'sini ve 24 saat sonunda ise yaklaşık % 70'ini geri kazanmıştır. pH 6.00'da ise 10 saat sonunda aktivitenin hemen hemen tamamı geri kazanılırken 24 saat sonunda % 70'e yakını korunmuştur. pH 8.00'de 4 saat inkübasyon sonunda aktivitenin yaklaşık % 92'si, 10 saat sonunda % 84'ü ve 24 saat sonunda ise % 63'ü geri kazanılırken, pH 10.00'da 4 saat sonra yaklaşık % 74'ü ve 10 saat sonra ise yaklaşık % 45'i geri kazanılmıştır. Enzim, asidik pH'dan alkalın pH'lara kadar geniş bir pH ve zaman aralığında oldukça stabil kalmıştır. Enzimin uzun süren reaksiyon koşulları altında ve çeşitli pH'larda stabil olması çeşitli endüstriyel uygulamalar açısından oldukça önemlidir. *Bacillus circulans* esterazıyla yapılan çalışmada, enzimin aktivitesinin pH 6.00-8.00 arasında 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesini koruduğu, pH 8.00'in üzerinde ise hafif bir düşüşün olduğu saptanmıştır (Kademi et al., 2000). *Lactobacillus casei* CL96 esterazının pH 6.00-8.00 arasında aktivitesinin % 60'dan fazlasını koruduğu belirtilmiştir (Choi and Lee, 2001). *Bacillus subtilis* esterazı pH 11.00-12.00 arasında 48 saat inkübe edildikten sonra, orijinal aktivitesinin % 80-95'ini koruduğu ancak daha düşük pH değerlerinde kalan aktivitenin % 20'ye kadar düştüğü belirtilmiştir (Eggert et al., 2000).

Bacillus sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde, substrat konsantrasyonunun belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin de buna bağlı olarak hızla arttığı görülmüştür. Bu durumda enzimatik reaksiyon birinci dereceden (first-order) bir kinetik göstermiştir. Ancak, belli bir substrat konsantrasyonundan sonra aktivitenin artık daha fazla artmadığı ve sabit kaldığı görülmüştür. Çünkü, artık enzim substratına karşı doygun hale gelmiştir ve maksimum hızla çalışmaktadır. Bu durumda enzimatik reaksiyon sıfırıncı dereceden (zero-order) bir kinetik göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak *Bacillus* sp. 4 esterazının Michaelis-Menten kinetiği gösterdiğini söyleyebiliriz. Ancak, Michaelis-Menten grafiğinden enzimin K_m ve V_{max} değerlerini saptamak oldukça zordur. Bu nedenle, K_m ve V_{max} değerlerini saptamak amacıyla Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır. Bu grafiğe göre, *Bacillus* sp. 4 esterazının K_m değeri 62.89 μM ve V_{max} değeri 833.33 U/mg protein olarak bulunmuştur. Buna karşın, *Bacillus subtilis* NRRL 365'den elde edilen esteraz I ve esteraz II'nin substrat olarak p-nitrofenil asetat kullanıldığında K_m değerleri sırasıyla 0.91mM ve 0.67mM (Meghji et al., 1990), *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazının α -naftil-asetat kullanıldığında 1.2 mM (Kakariari et al., 2000), *Bacillus circulans* esterazının p-nitrofenil kaprilat kullanıldığında

0.24 mM (Kademi et al., 2000), *Bacillus* sp. J33 esterazının pNP-laurat kullanıldığında 2.5mM (Nawani and Kaur, 2000) ve *Bacillus* sp.GK 8'in lipazının p-nitrophenil laurat kullanıldığında ise, 3.63 mM (Dosanj and Kaur, 2001) olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler, *Bacillus* sp. 4 esterazının Km değerinden çok daha yüksektir. Bu da *Bacillus* sp. 4 esterazının substratına olan ilgisinin bu enzimlere göre daha yüksek olduğunu ve çok düşük konsantrasyonlarda bile substratına bağlanıp ES kompleksi oluşturduğunu göstermektedir. Buna karşın *Bacillus stearothermophilus* esterazının fluorescien dibutirat kullanıldığında Km değeri (0.91 μ M) çok daha düşük çıkmıştır (Simoes et al., 1997).

Enzimlerin termostabilitesi suyun varlığında büyük oranda etkilenmektedir, çünkü denatürasyon enzimin sıvı karışımlardaki konformasyonel akışkanlığıyla bağlantılıdır. Denatürasyon işlemi organik ortamdaki dehidrasyonla engellenebilir. Enzim çözeltilerine katılan kimyasal maddeler, enzimlerle ya doğrudan yada dolaylı olarak (yapı ve özellikleri üzerine) etkileşime girerek veya her iki mekanizmayı da kullanarak makromoleküler yapıyı etkileyebilirler. Bu yüzden, *Bacillus* sp. 4 esterazının termostabilitesini arttırması amacıyla, polihidrik alkollerin etkisi araştırılmıştır. *Bacillus* sp. 4 esterazı etilen glikol, sorbitol ve gliserol ile 1 saat inkübe edildikten sonra aktivitenin 0. saate göre sırasıyla yaklaşık olarak % 44, 58 ve 65'i geri kazanıldığı görülmüştür. Bu değerler, zamana bağlı olarak hafif bir düşüş göstermiştir. Kontrol grubu da aynı koşullar altında inkübasyona bırakıldığında 1 saat sonunda aktivitenin 0. saate göre yaklaşık % 76'sı geri kazanılmıştır. Deney grupları ile kontrol grubunun 1 saat sonunda kalan aktivite değerleri karşılaştırıldığında, aktivitedeki geri kazanım etilen glikol, sorbitol ve gliserol için sırasıyla % 58, 77 ve 82 olduğu hesaplanabilir. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi, denenen polihidrik alkollerin *Bacillus* sp. 4 esterazının stabilitesini koruması beklenirken, stabilize etmediği ancak enzimin makromoleküler yapısını çok fazla etkilemediği görülmektedir. Bu durumun, esterazın yapısal özelliğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Dielektrik katsayısı suyunkinden düşük olan çözeltilerin yüksek sıcaklıklarda proteinlerin tersiyer yapılarının korunmasında çok önemli olan hidrofobik etkileşimleri kuvvetlendirdikleri ve böylece daha yüksek sıcaklıklarda enzimin yarı ömrünü artırdıkları, çünkü çözeltilerin dielektrik katsayılarının düştüğü oranda (su 78, gliserol 42, etilen glikol 37 ve sorbitol 33.5) lipazın termostabilitesini artırdığı bildirilmiştir (Nawani and Kaur, 2000). Polihidrik alkollerin esteraz ve lipaz stabilitesi üzerine etkisi konusunda yapılan çalışmalar oldukça azdır. *Bacillus* sp. J33 lipazı ile yapılan bir çalışmada, etilen glikol ve gliserol 70 °C'de 150 dakika boyunca lipaz aktivitesini % 100' e yakın korurken, sorbitol enzimi stabilize etmesinin yanında, aktive etmiştir.

Bacillus sp. 4 esterazının aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi incelendiğinde, toprak alkali metalleri olan Ca^{+2} ve Mg^{+2} aktivite üzerine herhangi bir inhıbe edici etkide bulunmamıştır. Alkali metaller olan Na^{+} ve K^{+} aktiviteyi yaklaşık % 30 inhıbe ederken Li^{+2} 'un yüksek konsantrasyonları % 50'ye yakın inhıbisyonu neden olmuştur. Geçiş elementleri olan Co^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} ve Cu^{+2} enzim aktivitesi üzerine farklı etkiler göstermişlerdir. Co^{+2} , 5 mM'a kadar enzimi büyük oranda inhıbe etmezken, 10 mM'lık konsantrasyonu yaklaşık % 40 inhıbisyonu neden olmuştur, Fe^{+3} ise yaklaşık % 30'luk bir inhıbisyonu neden olmuştur. Bunun dışında Mn^{+2} esteraz aktivitesini artan konsantrasyonlarda aktive etmiş ve % 90'a kadar bir artış gözlenmiştir. Ni^{+2} ise düşük konsantrasyonlarda (% 33) enzimi aktive ederken, 10 mM'lık konsantrasyonda hafif bir inhıbisyonu neden olmuştur. Bunun aksine, enzimin Hg^{+2} ve Cu^{+2} tarafından kuvvetle inhıbe edildiği görülmüştür. $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ ise denenen tüm konsantrasyonlarda enzimi yaklaşık % 50 inhıbe etmiştir. Divalent iyonların pek çok enzimi inhıbe ettiği bilinmektedir. Esteraz aktivitesinin özellikle Hg^{+2} tarafından inhıbe edildiği daha önce yapılan çalışmalarda da bulunmuştur (Kakariari et. al., 2000; Smacchi et. al., 2000; Cui et. al., 1999; Meghji et. al., 1990). Sonuç olarak Hg^{+2} ve Cu^{+2} dışındaki iyonların enzim aktivitesini büyük oranda inhıbe etmediği hatta Mn^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının aktivasyona neden olduğu görülmektedir. Mn^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının esteraza bağlanarak enzimin konformasyonunu stabilize veya destabilize ederek enzim aktivitesini değiştirdiğini veya substrata bağlanarak reaksiyon için substratın doğru yönelimini sağladığını düşünmekteyiz. Ayrıca Mn^{+2} ve Ni^{+2} iyonları ile esteraz aktivitesinin artması, reaksiyon esnasında serbestlenen butirik asit ile bu iyonların tuz oluşturarak (sabun) ortamdaki yağ asitlerini uzaklaştırdığı, böylece enzimin ürün tarafından inhıbisyonunun engellendiği ileri sürülebilir. Metal iyonları ve tuzlar termofilik mikroorganizmaların termostabil enzimleri için önemlidirler. Çünkü, ortamdaki metal iyonlarına bağlanmış olan su, metal iyonu proteine bağlandığında, serbest kalarak metal iyon kompleksi oluşturur. Mikrobiyal esterazların aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisiyle ilgili pek çok çalışma yapılmış ve metal iyonlarının aktivite üzerine farklı etkiler gösterdiği saptanmıştır (Meghji et al., 1990; Owusu and Cowan, 1991; Cui et al., 1999; Alvarez-Macarie et al., 1999; Kakariari et al., 2000; Smacchi et al., 2000).

Bacillus sp. 4 esterazı, metal tutucu bir ajan olan EDTA tarafından ise yaklaşık % 50 oranında inhıbe edilmiştir. Bunun sonucunda ilk olarak enzimin bir metalloenzim olduğu kanısına varılmıştır. Ancak son yıllarda yapılan bir çalışmada esterazların bir kofaktöre ihtiyaç duymadıkları bildirilmiştir (Bornscheuer, 2002). Bu bilgiden yola çıkarak, bu metal

iyonlarının katalitik bir mekanizmada rol almaktan çok yapısal bir role sahip olduklarını düşünmekteyiz. Enzimin EDTA tarafından % 100 inhibe olmaması da bu görüşle uygunluk göstermektedir. Ayrıca, EDTA, *Bacillus licheniformis* (Alvarez-Macarie et. al., 1999), *Arthrobacter viscosus* NRRL B-1973 (Cui et. al., 1999) ve *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 (Kakariari et. al., 2000)'den elde edilen esterazlara karşı herhangi bir inhibe edici etkide bulunmamıştır. Bunun aksine *Arthrobacter nicotianae* 9458 (Smacchi et. al., 2000) ve *Bacillus* sp. J 33 (Nawani et al., 1998) esterazları EDTA tarafından inhibe edilmişlerdir.

Bacillus sp. 4 esterazının metale bağlı bir enzim olup olmadığına karar verebilmek için, EDTA ve aktive edici metal iyonları aynı konsantrasyonda deney ortamına eklenerek esteraz aktivitesi ölçülmüştür. EDTA'nın enzim üzerindeki % 50'lik inhibe edici etkisi Mn ve Ni eklendiğinde ortadan kalkmıştır. Bu da enzimin bu metaller eklendiğinde yapısal olarak konformasyonunu koruyarak etkisini devam ettirebileceğini göstermektedir.

Bacillus sp. 4 esterazı üzerine çeşitli deterjanların etkisi incelendiğinde, anyonik deterjanlardan sodyum deoksikolatın düşük konsantrasyonlarının hafif bir inhibisyona neden olduğu buna karşın denenen en yüksek konsantrasyon olan 20 mM'lık konsantrasyonda aktivitenin ancak % 28'inin geri kazanıldığı görülmüştür. Esterazın, sodyum taurokolat karşısında ise aktivitesini büyük oranda koruduğu buna karşın SDS'nin düşük konsantrasyonda bile enzimi kuvvetle inhibe ettiği saptanmıştır. Katyonik bir deterjan olan setrimid'in tüm konsantrasyonları enzimi büyük oranda inhibe etmiştir. Non-iyonik deterjanların esteraz aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında, denenen tüm non-iyonik deterjanların (n-oktil- β -D-glukopiranozid, Brij 35, Triton-X-100, Tween 20 ve 80) esterazı inhibe etmedikleri gibi farklı oranlarda aktive ettikleri görülmüştür. Zwitteriyonik bir deterjan olan CHAPS'ın tüm konsantrasyonları esterazı çok az inhibe etmiştir. İnhibisyona neden olan iyonik deterjanlar (SDS ve setrimid) enzimin aktif merkezini bloke ederek substratın aktif merkeze bağlanmasını engelleyerek inhibisyona neden olmuş olabilirler. Sonuç olarak SDS ve setrimidin, *Bacillus* sp. 4 esterazı için güçlü birer inhibitör, buna karşın non-iyonik deterjanların ve özellikle Tween 20 ve 80'in iyi birer stimülatör olduğu sonucuna varılmıştır. *Bacillus* sp. 4 esterazının özellikle non-iyonik deterjanlara karşı dirençli ve hatta aktif olması, deterjan endüstrisinde kullanılan enzimler için aranan bir özelliktir.

Mikrobiyal esterazlar üzerine deterjanların etkisi konusunda çalışmalara rastlanmamıştır. Buna karşın lipazlarla bu konuda daha çok çalışma yapılmıştır. *Pseudomonas*

pseudoalcaligenes F-111 lipazı ile yapılan bir çalışmada, % 1'lik SDS enzim aktivitesini etkilememiş, buna karşın, non-iyonik deterjanlar ise aktive edici etkide bulunmuştur ve enzim aktivitesi, Triton X-100 ile % 149 ve Tween 80 ile % 111 oranında geri kazanılmıştır (Lin et al., 1996). *Bacillus thermoleovorans* ID-1 lipazı, 1 mM konsantrasyondaki SDS ile muamele edildikten sonra aktivitesinin % 30'unu geri kazanabilmiştir (Lee et al., 1999). *Bacillus* sp. THL027 lipazı % 1 oranında SDS ile 2 saat inkübasyondan sonra % 90 ve 24 saat inkübasyondan sonra % 87 oranında aktif kalmıştır (Dharmsthiti and Luchai, 1999). *Aspergillus terreus*'un lipaz aktivitesi üzerine iyonik ve non-iyonik deterjanların etkisi 2.5-20 mM'lık konsantrasyonlarda denenmiş ve bütün iyonik deterjanların (sodyum deoksikolat, saponin, sonyum taurokolat, SDS) enzim aktivitesini inhibe ettiği, non-iyonik deterjanların (Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, n-octyl- β -D-glukopiranozid) ise aktive ettiği belirlenmiştir. (Yadav et al., 1998). *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazının non-iyonik deterjanlara karşı oldukça stabil olduğu belirlenmiş ve Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 ile orijinal aktivitenin sırasıyla % 100, 92 ve 82'si geri kazanılmıştır. Buna karşın enzim anyonik deterjanlara karşı daha az stabil olduğu görülmüş ve deoksikolat ile aktivitenin % 54'ü geri kazanılabilmektedir (Sharma et al., 2001). *Bacillus thermocatemulatus* lipazı SDS, Tween 20 ve Tween 80 tarafından inhibe edilmiş, bununla beraber, Triton X-100 aktiviteyi % 80, CHAPS ise % 40 oranında artırmıştır (Rua et al., 1997). Diğer bir lipazla yapılan çalışmada ise Triton X-100'ün enzim aktivitesini kuvvetle inhibe ettiği belirlenmiştir (Margesin et al., 2002). *Rhizopus oryzae* lipazı 1-7 mM'lık sodyum taurokolat tarafından aktive edilirken, aynı konsantrasyondaki SDS tarafından inhibe edilmiştir (Hiol et al., 2000). *Bacillus* sp. GK8 lipazıyla yapılan çalışmada enzim, % 0.1'lik Brij 35, setrimid ve Triton X-100 ile aktivitesini tamamen kaybetmiş, % 1'lik SDS ise aktiviteyi artırmıştır. Tween 80, Tween 60 ve sodyum taurokolat ise aktivite üzerine bir etkide bulunmamıştır (Dosanj and Kaur, 2001). *Bacillus* sp. J 33 lipazıyla yapılan çalışmada enzim aktivitesi, % 0.1'lik Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 varlığında sırasıyla % 40, 20 ve 60 oranında stimule edilmiştir. SDS ise aktiviteyi tamamen inhibe etmiştir (Nawani et al., 1998).

Bacillus sp. 4 esteraz aktivitesi üzerine çeşitli organik çözücülerin etkisi incelendiğinde, % 20'lik aseton ve asetonitril enzim aktivitesini artırmış, dioksan ise hafif bir inhibisyona neden olmuştur. % 50'lik metanol ve DMSO enzim aktivitesini inhibe etmemiş hatta DMSO hafif bir artışa neden olmuştur. Etanol ise % 50'lik bir inhibisyona neden olmuştur. % 50'lik aseton, asetonitril ve dioksanın ile % 80'lik metanol, etanol ve DMSO'nun enzimi kuvvetli bir şekilde inhibe etmiştir. Sonuç olarak, esterazın genellikle organik

çözücülerin yüksek konsantrasyonlarında stabilitesini çok fazla koruyamadığı buna karşın en yüksek stabiliteyi DMSO karşısında gösterdiği saptanmıştır. Esteraz enziminin % 20-50'lik konsantrasyonlarda aktivitesini büyük oranda korumuş olması potansiyel endüstriyel alanlarda kolaylıkla kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Arthrobacter viscosus esterazı, % 50'lik (v/v) asetonitril ve DMSO ile aktivitesinin % 60'ını geri kazandığı, % 30'luk dioksan ile orijinal aktivitenin % 50'den fazlasının kaybolduğu saptanmıştır (Cui et al., 1999). Hipertermofilik *Pyrobaculum calidifontis* VA1 esterazının % 50 ve % 80'lik metanol, etanol, 2-propanol, asetonitril, dimetilsulfoksit (DMSO) ve dimetilformamid'e karşı oldukça yüksek bir stabilite gösterdiği belirlenmiştir (Hotta et al., 2002).

Bacillus sp. 4 esterazı üzerine bir serin inhibitörü olan PMSF'nin etkisi incelendiğinde aktivitenin 1 mM'lık konsantrasyonda bile kuvvetli şekilde inhibe olduğu görülmüştür. Bu da enzimimizin aktif merkezinde katalitik rol oynayan serin amino asidini içerdiğini kanıtlamaktadır.

Esterazlar ve lipazların çoğu merkez aktif bölgelerinde bir serin residüesi içermektedirler (Fojan et. al., 2000). *Sulfolobus acidocaldarius*, *Bacillus* sp., *Arthrobacter nicotianae* 9458, *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 ve *Pyrobaculum calidifontis* VA1'den elde edilen esterazlar (Sobek and Görisch, 1988; Owusu and Cowan, 1991; Smacchi et. al., 2000; Kakariari et. al., 2000; Hotta et. al., 2002), *Aeromonas sobria* LP004, *Acinetobacter radioresistens* CMC-1, *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus stearothermophilus* P1 (Lotrakul and Dharmsthiti, 1997; Hong and Chang, 1998; Lee et. al., 1999; Nthangeni et. al., 2001; Sinchaikul et. al., 2001) lipazları bir serin grubu inhibitörü olan PMSF (phenyl methyl sulphonyl floride) tarafından inhibe edilmişlerdir. Buna karşın, *Bacillus licheniformis* ve *Arthrobacter viscosus* NRRL B-1973 (Alvarez-Macarie et. al., 1999; Cui et. al., 1999) esterazları ile *Ophiostoma piceae* ve *Rhizopus oryzae* (Gao and Breuil, 1998; Hiol et. al., 2000) lipazları PMSF tarafından ya çok az inhibe edilmiş yada inhibe edilmemişlerdir. Ayrıca, *Bacillus thermoleovorans* ID-1 termostabil lipazlarından BTID-A, PMSF tarafından kuvvetle inhibe edilirken, BTID-B tam tersine aktive olmuştur. Bunun sonucunda araştırmacılar BTID-A' nın bir serin esteraz olabileceğini söylemişlerdir (Lee et. al., 2001).

Bacillus sp. 4 esterazı, bir SH- grubu (tiol) inhibitörü olan β -merkaptoetanol ile herhangi bir şekilde inhibe olmaması nedeniyle, katalitik merkezinde sülfidril gruplarının bulunmadığını veya sülfidril gruplarının kataliz işleminde önemli bir rol oynamadığını söyleyebiliriz. Benzer sonuçlar bazı lipaz ve esterazlarla yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir (Gao and Breuil, 1998; Nthangeni et. al., 2001; Sinchaikul et. al., 2001; Lotrakul and Dharmstithi, 1997; Lee et. al., 1999; Hong and Chang, 1998; Kakariari et. al., 2000; Yadav et. al., 1998). Bunun aksine β -merkaptoetanol, *Bacillus* sp. RSJ-1 (Sharma et. al., 2001)'den elde edilen lipazı inhibe etmiş ve *Rhizopus oryzae* (Hiol et. al., 2000)'nin lipazını ise aktive etmiştir. Ayrıca, *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee et. al., 2001)'dan elde edilen BTID-A lipazı, β -merkaptoetanol tarafından hafif bir inhibisyona uğrarken, BTID-B lipazı aktive edilmiştir.

Bacillus sp. 4 esterazının substrat spesifitesini belirlemek için, pNPA, pNPB, pNPL ve pNPP kullanılmıştır. Esteraz, bu substratlar içinde en yüksek aktiviteyi p-nitrofenil bütirat'a (C4) karşı gösterdiği saptanmıştır. Esterazın p-nitrofenil asetat'a (C2) olan aktivitesi, p-nitrofenil bütirat'a göre yaklaşık olarak % 70'tir. Esterazın, p-nitrofenil laurat'a (C12) karşı oldukça az aktivite gösterdiği ve p-nitrofenil palmitat'a (C16) karşı ise hiç aktivite göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, *Bacillus* sp. 4 esterazının geniş bir substrat spesifitesine (C2-C12) sahip olduğunu söyleyebiliriz. Lipazlar genellikle, suda çözünmeyen (emülsifiye) uzun zincirli yağ asidi esterlerini hidrolizlerler. Esterazlar lipazlardan farklı olarak, sulu çözeltilerdeki esterleri hidrolizlerler ve özellikle mono- ve digliseritler olmak üzere trigliseritleri de içeren kısa zincirli yağ asitlerini hidrolizlerler ve genellikle 6 karbon atomundan yüksek olan yağ asidi esterlerine karşı aktiviteleri düşüktür. *Bacillus* sp. 4 izolatından elde ettiğimiz enzim, pNPL'a karşı az ve pNPP'a karşı ise hiç aktivite göstermemiştir. Buna karşın pNPB ve pNPA gibi kısa zincirli substratlara karşı yüksek aktivite göstermiştir. Bu bulgular, esterazların kısa zincirli yağ asitlerine spesifik olduğunu söyleyen genel görüşle uygunluk göstermektedir. Bu nedenle çalışmada kullandığımız enzimin bir esteraz olduğunu söylemekteyiz. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde esterazların 10 karbondan yüksek substratlara karşı hiç aktivite göstermediği saptanmıştır. *Bacillus* sp. 4 esterazının ise pNPL'a karşı az da olsa aktivite göstermiş olması oldukça dikkate değerdir. Esterazların substrat spesifiteleri ile yapılan önceki çalışmalarda da esterazın maksimum aktivitesini düşük karbonlu substratlara karşı gösterdiği saptanmıştır. *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14 esterazı sadece α -naftil-asetat (C2), α -naftil-propionat (C3) ve α -naftil-butirat (C4)'ı hidrolizleyebildiği görülmüştür

(Kakariari et al., 2000). *Arthrobacter nicotianae* 9458 esterazının maksimum aktivitesini β -naftil butirat (C4)'a karşı gösterdiği, β -naftil asetat (C2), β -naftil kaproat (C6), β -naftil kaprilat (C8) ve β -naftil kaprat (C10) kullanıldığında maksimum aktivitenin sırasıyla % 69, 74, 53 ve 36 'sı gözlenmiştir. C12-C18:1 'lu yağ asitlerinin β -naftil esterlerine karşı hiçbir aktivite gözlenmemiştir (Smacchi et al., 2000). *Bacillus licheniformis* esterazının, kısa zincirli yağ asitlerine karşı aktivite gösterdiği, bununla birlikte maksimum aktivitesini p-nitrofenil kaproat (pNPC6)'a karşı gösterdiği, daha uzun zincirli substratlara (pNPC10-pNPC18) karşı ise, aktivitenin çok düşük olduğu saptanmıştır (Alvarez-Macarie et al., 1999). *Arthrobacter viscosus* esterazı en yüksek aktiviteyi asetik esterlere karşı göstermiş, p-nitrofenil asetatla (C2) karşılaştırıldığında, p-nitrofenil propionata (C3) karşı % 36 ve p-nitrofenil butirata (C4) karşı ise, sadece % 3 aktivite gösterdiği saptanmıştır. Enzim p-nitrofenil kaproat (C6), p-nitrofenil kaprilat (C8) ve p-nitrofenil laurat (C12)'a karşı ise hiçbir aktivite göstermemiştir (Cui et al., 1999). *Bacillus circulans* esterazı, maksimum aktivitesini pNPC2'ye karşı göstermiş, daha uzun zincirli yağ asitleri kullanıldığında (pNPC4-pNPC8) aktivite hızlı bir şekilde düşmüş ve karbon zincir uzunluğu 8'den büyük olan substratlara karşı ise aktivitenin oldukça azaldığı görülmüştür. *Bacillus licheniformis* esterazı, p-nitrofenil kaprilat (pNPC8) kullanıldığında 1.6 U mg^{-1} aktivite gösterirken, p-nitrofenil palmitat (pNPC16) ile aktivitenin normalden 600 kat daha düşük olduğu (0.0026 U mg^{-1}) görülmüştür (Alvarez-Macarie et al., 1999). Termofilik bakteri strainlerinin esteraz aktivitesi belirlenirken pNPC8 kullanılmıştır. Substrat spesifitesine bakıldığında ise, pNPC2'deki aktivitenin pNPC8'dekinden 7.5 kat fazla olduğu görülürken, pNPC16'daki aktivitenin ise yaklaşık 190 kat daha az olduğu görülmüştür (Kademi et al., 1999).

Esterazların sınıflandırılması substrat spesifitelerine ve çeşitli inhibitörlere olan duyarlılıklarına dayanmaktadır. Arilesterazlar veya A-esterazlar paraoxon gibi organofosfatlar ve PMSF tarafından inhibe edilmezler ve aromatik esterleri hidrolizlerler. Karboksilesterazlar veya B-esterazlar (serin esterazlar) organofosfatlar tarafından inhibe edilirler ve geniş bir substrat spesifitesi gösterirler yani hem alifatik hem de aromatik esterleri hidrolizlerler. C-esterazlar ise organofosfatlar ve eserin tarafından inhibe edilirler ve kolin esterleri hidrolizlerler (Sobek and Görisch 1988; Alvarez-Macarie et al., 1999). Bu çalışmada kullandığımız esteraz PMSF tarafından kuvvetle inhibe edilmektedir. Esteraz, EDTA tarafından kısmen inhibe olmuş ve tiol grubu ajanı olan β -merkaptotanol tarafından ise inhibe olmamıştır. Bu inhibisyon sonuçlarına ve geniş substrat spesifitesi göstermesine

dayanarak kullandığımız enzimin büyük ihtimalle bir serin esteraz olduğunu ancak, eserin ve kolin esterlerle ilgili deneme yapılamadığı için C-esteraz da olabileceğini söyleyebiliriz.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Aydın ili Germencik ilçesi Bozköy-Alangüllü termal sularından elde edilen *Bacillus* sp. 4 izolatının esterazının kısmi saflaştırma ve kinetik parametreleri üzerine yaptığımız çalışma sonucunda, mikroorganizma 65 °C ve pH 6.00'da maksimum enzim üretimi sağlamıştır. Maksimum enzim üretimi durgunluk fazının ortaları olan 9. saatte gerçekleşmiştir. Çalışmada kullanılan esterazın intraselüler veya membrana bağlı bir enzim olduğu sonucuna varılmıştır. Kısmen saflaştırılan esterazın optimum sıcaklığı 65 °C ve pH'sı 6.00'dır. Esteraz geniş bir sıcaklık ve pH aralığında stabildir. Esterazın Km değeri 62.89 µM ve V_{max} değeri ise 833.33 U/mg protein olarak saptanmıştır. Polihidrik alkollerin esterazın stabilitesini artırmadığı görülmüştür. Çeşitli metal iyonlarından Mn⁺² ve Ni⁺² enzim aktivitesini artırırken, Hg⁺² ve Cu⁺² inhibe etmiş, diğer metal iyonları ise aktiviteyi çok fazla etkilememiştir. EDTA enzimi kısmen inhibe etmiştir. Aktive edici metal iyonları Mn⁺² ve Ni⁺² EDTA'nın kısmi inhibisyonunu engellemiştir. Çeşitli deterjanlar arasında iyonik deterjanlardan bazısı (SDS ve setrimid) enzimi inhibe ederken, non-iyonik deterjanlar aktive etmiştir. CHAPS ise aktiviteyi etkilememiştir. Organik çözücülerin düşük konsantrasyonları enzimi inhibe etmezken, yüksek konsantrasyonları inhibisyona neden olmuştur. Serin inhibitörü olan PMSF enzimi kuvvetle inhibe ederken -SH grubu inhibitörü olan β-merkaptetanol aktiviteyi etkilememiştir. Enzim maksimum aktivitesini pNPB'a karşı göstermiş, pNPP'a karşı ise aktivite göstermemiştir.

Enzimlerin endüstriyel kullanımını sınırlayan en önemli unsur, endüstriyel koşullar altında başta yüksek sıcaklıklar karşısında stabil olmamalarıdır. Bu yüzden, yeni termostabil enzimlerin araştırılması, yeni uygulamaların geliştirilmesi için önemlidir. Ayrıca, enzimin organik çözücülerde denatürasyona karşı dirençli olmasının sudaki termostabiliteleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, termostabil enzimler, yalnızca sulu ortamlarda değil, organik ortamlarda kullanılırken de caziptir. Yeni ekstremofilik mikroorganizmaların keşfedilmesiyle bu mikroorganizmaların enzimleri biyokatalizlerde önemli bir yer almıştır. Termofilik bir bakteri olan *Bacillus* sp. 4 esterazının optimum aktivitesini 65 °C'de göstermesi ve yüksek bir termostabiliteye sahip olması endüstriyel uygulamalar açısından, mesofilik olan temsilcilerine göre büyük bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, esterazın geniş bir pH aralığında stabil olması, substratına olan ilgisinin yüksek olması, organik çözücüler ile büyük oranda denatüre olmaması, pek çok metal iyonu tarafından inhibe edilmemesi, deterjanların büyük bir kısmı tarafından inhibe edilmemesi ve hatta non-iyonik deterjanlar

tarafından aktive edilmesi ve geniş bir substrat spesifitesi göstermesi gibi avantajları vardır. Bu yüzden *Bacillus sp.* 4 esterazının, gelecekteki yeni potansiyel endüstriyel ve laboratuvar işlemlerinin gelişimine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, araştırılması gereken bazı konular eksik kalmıştır. Bunlar, bakteri üretim ortamının çeşitli indükleyicilerle desteklenerek enzim üretiminin artırılması, enzimin ileri derecede saflaştırılması, molekül ağırlığının saptanması, enzimin immobilizasyonu, izoelektrik pH'nın saptanması, enzimin üç boyutlu yapısının ve amino asit diziliminin saptanması gibi konulardır. Yukarıda bahsettiğimiz konular, daha ileriki zamanlarda yapılması gereken çalışmaların başında gelmektedir.



ÖZET

Aydın ili, Bozköy-Alangüllü termal sularından elde edilen *Bacillus* sp. 4 izolatının esterazı kısmi olarak saflaştırıldı ve kinetik parametreleri belirlendi. *Bacillus* sp. 4 izolatı 65 °C ve pH 6.00'da maksimum oranda enzim üretti. Esterazın intraselüler veya membrana bağlı bir enzim olduğu sonucuna varıldı. Esterazın optimum sıcaklığı 65 °C ve optimum pH'ı 6.00 olarak bulundu. Esteraz geniş bir sıcaklık ve pH aralığında stabildi. Esterazın Km değeri 62.89 µM ve V_{max} değeri ise 833.33 U/mg protein olarak saptandı. Polihidrik alkollerin esterazın stabilitesini artırmadığı görüldü. Çeşitli metal iyonlarından Mn⁺² ve Ni⁺² enzim aktivitesini artırırken, Hg⁺² ve Cu⁺² inhibe etti, diğer metal iyonları ise aktiviteyi çok fazla etkilemedi. EDTA enzimi kısmen inhibe etti. Aktive edici metal iyonları Mn⁺² ve Ni⁺², EDTA'nın kısmi inhibisyonunu engelledi. Çeşitli deterjanlar arasında iyonik deterjanlardan bazısı (SDS ve setrimid) enzimi inhibe ederken, non-iyonik deterjanlar aktive etti. CHAPS ise aktiviteyi etkilemedi. Organik çözücülerin düşük konsantrasyonları enzimi inhibe etmezken, yüksek konsantrasyonları inhibisyona neden oldu. Serin inhibitörü olan PMSF enzimi kuvvetle inhibe ederken -SH grubu inhibitörü olan β-merkaptetanol aktiviteyi etkilemedi. Enzim maksimum aktivitesini pNPB'a karşı gösterdi, pNPP'a karşı ise aktivite göstermedi. Bulunan tüm sonuçlar, uygun literatür bilgileriyle karşılaştırıldı ve *Bacillus* sp. 4 esterazının endüstriyel uygulamalar açısından pek çok uygun özelliğe sahip olduğu sonucuna varıldı.

SUMMARY

The esterase of *Bacillus* sp. 4 isolated from Aydin Province, Bozköy-Alangüllü thermal spring water was partially purified and kinetic parameters were determined. *Bacillus* sp. 4 produced maximum amount of enzyme at 65 °C with pH 6.00. The esterase was either intracellular or membrane associated. The esterase was stable in the broad range of temperature and pH. The K_m and V_{max} of esterase was 62.89 μM and 833.33 U/mg protein respectively. The polihydric alcohols were not enhanced the stability of esterase. Among the various metal ions, Mn^{+2} and Ni^{+2} enhanced, Hg^{+2} and Cu^{+2} inhibited the esterase activity, the other metal ions did not effect the esterase activity. EDTA was partially inhibited the esterase. The activater metals, Mn^{+2} and Ni^{+2} prevented the partially inhibition of EDTA. In the various detergent, some of the ionic detergents (SDS and cetrinide) inhibited the esterase, in contrary non-ionic detergents activated the esterase. CHAPS did not effect the activity. The low concentrations of organic solvents did not inhibite the esterase activity but high concentrations inhibited the esterase activity. PMSF, a serin inhibitor, strongly inhibited the activity and β -merkaptotanol, -SH group inhibitor did not effect the activity. The esrese showed its maximum activity on pNPB and no activity was observed on pNPP. All results compared to the appropriate references and we concluded that the esterase of *Bacillus* sp. 4 has many appropriate properties for industrial applications.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında, sahip olduğu bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, araştırmalarım sırasında beni yönlendiren saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay Metin'e teşekkürü bir borç bilirim. Tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. H. Halil Bıyık'a teşekkürlerimi sunarım. Tezin yazım aşamasındaki yardımlarımdan dolayı çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Gamze Başbülbul, Arş. Gör. Nazan Taşkın Üzüm ve Arş. Gör. Aziz Avcı'ya, bilgisayarla ilgili sorunların giderilmesinde bana yardımcı olan çalışma arkadaşım Arş. Gör. Ö. Emre Öncü'ye ve tezimin tüm aşamalarında benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Suat Ateşlier'e sonsuz teşekkürler.



KAYNAKLAR

ABRAMIC M., LESCIC I., KORICA T., VITALE L., SAENGER W., PIGAC J. (1999). Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 522-529.

ALVAREZ-MACARIE E., AUGIER-MAGRO V., BARATTI J. (1999). Characterisation of a thermostable esterase activity from moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 63: 1865-1870.

ALVAREZ-MACARIE E., AUGIER-MAGRO V., GUZZO J., BARATTI J. (1999). Molecular characterization of the gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnology Letters*. 21: 313-319.

BAŞBÜLBÜL G. (2002). Aydın yöresi jeotermal sularındaki termofilik bakterilerin incelenmesi. ADÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi.

BELL P.J.L., NEVALAINEN H., MORGAN H.W., BERGQUIST P.L. (1999). Rapid cloning of thermoalkalophilic lipases from *Bacillus* spp. using PCR. *Biotechnology Letters*. 21: 1003-1006.

BORNSCHEUER U.T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 73-81.

CHOI Y.J., LEE B.H. (2001). Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 24: 59-63.

CUI W., WINTER W.T., TANENBAUM S.W. and NAKAS J. P. (1999). Purification and characterization of an intracellular carboxylesterase from *Arthrobacter viscosus* NRRL B-1973. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 200-208.

DEMIRJIAN D.C., MORIS-VARAS F., CASSIDY C.S. (2001). Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*. 5: 144-151.

DHARMSTHITI S., LUCHAI S. (1999). Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiology Letters*. 179: 241-246.

DONG H., GAO S., HAN S., CAO S. (1999). Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. Lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 30: 251-256.

DOSANJ N.S., KAUR J. (2001). Biochemical analysis of a native and proteolytic fragment of a high-molecular-weight thermostable lipase from a mesophilic *Bacillus* sp. *Protein Expression and Purification*. 1-5.

EGGERT T., PENCREAC'H G., DOUCHET I., VERGER R., JAEGER K.E. (2000). A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *European Journal of Biochemistry*. 267: 6459-6469.

FADİLOĞLU S., ERKMEN O. (2002). EFFECTS OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON LIPASE PRODUCTION BY *Candida rugosa*. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Science*. 26: 249-254.

FOJAN P., JONSON P.H., PETERSEN M.T.N., PETERSEN S.B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimic*. 82: 1033-1041.

GAO Y., BREUIL C. (1998). Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 421-429.

GHANEM E.H., AL-SAYED H.A., SALEH K.M. (2000). An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 459-464.

HABA E., BRESO O., FERRER C., MARQUES A., BUSQUETS M., MANRESA A. (2000). Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 40-44.

HIOL A., JONZO M.D., RUGANI N., DRUET D., SARDA L., COMEAU L.C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 421-430.

HONG M.C., CHANG M.C. (1998). Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1. *Biotechnology Letters*. 20: 1027-1029.

HOTTA Y., EZAKI S., ATOMI H. and IMANAKA T. (2002). Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archeon. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3925-3931.

KADEMI A., AIT-ABDELKADER N., FAKHREDDINE L., BARATTI J.C. (1999). A thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strains. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 332-338.

KADEMI A., AIT-ABDELKADER N., FAKHREDDINE L. and BARATTI J.C. (2000). Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10: 395-401.

KAKARIARI E., GEORGALAKI M.D., KALANTZOPOULOS G. and TSAKALIDOU E. (2000). Purification and characterization of an intracellular esterase from *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14. *Lait*. 80: 491-501.

KAMINI N.R., FUJII T., KUROSU T., IEFUJI H. (2000). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*. 36: 317-324.

KHALAMEYZER V., FISCHER I., BORNSCHEUER U.T. and ALTENBUCHNER J. (1999). Screening, nucleotide sequence and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 477-482.

KIM M.H., KIM H.K., LEE J.K., PARK S.Y., OH T.K. (2000). Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high-level production, purification and calcium-dependent thermostability. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 64: 280-286.

KIRK O., BORCHERT T.V., FUGLSANG C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 1-7.

KORDEL M., HOFMANN B., SCHOMBURG D., SCHMID R.D. (1991). Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization and preliminary x-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*. 173: 4836-4841.

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 Microbiology Letters*. 179: 393-400.

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 and Microbial technology*. 29: 363-371.

LEE Y.P., CHUNG G.H., RHEE J.S. (1993). Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1169: 156-164.

LESCIC I., VUKELIC B., MAJERIC-ELENKOV M., SAENGER W., ABRAMIC M. (2001). Substrate specificity and effects of water-miscible solvents on the activity and stability of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 548-553.

LIN S.F., CHIOU C.M., YEH C.M., TSAI Y.C. (1996). Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1093-1095.

LOTRAKUL P., DHARMSTHITI S. (1997). Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *Journal of Biotechnology*. 54: 113-120.

LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A. L., RANDAL J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275.

MALISZEWSKA I., MASTALERZ P. (1992). Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. *Enzyme and Microbial Biotechnology*. 14: 190-193.

MARGESIN R., FELLER G., HAMMERLE M., STEGNER U., SCHINNER F. (2002). A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnology Letters*. 24: 27-33.

MEGHJI K., WARD O.P., ARAUJO A. (1990). Production, purification and properties of extracellular carboxylesterase from *Bacillus subtilis* NRRL 365. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 3735-3740.

NAWANI N., DOSANJ N.S., KAUR J. (1998). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*. 20: 997-1000.

NAWANI N., KAUR J. (2000). Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 206: 91-96.

NTHANGENI M.B., PATTERTON H.G., TONDER A.V., VERGEER W.P., LITTHAUER D. (2001). Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial technology*. 28: 705-712.

OWUSU R.K., COWAN D.A. (1991). Isolation and partial characterization of a novel thermostable carboxylesterase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 13: 158-163.

PERNAS M.A., LOPEZ C., PASTRANA L., RUA M.L. (2000). Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology*. 84: 163-174.

RUA M.L., SCHMIDT-DANNERT C., WAHL S., SPRAUER A., SCHMID R.D. (1997). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*. 56: 89-102.

SAKIYAMA T., YOSHIMI T., MIYAKE A., UMEOKA M., TANAKA A., OZAKI S., NAKANISHI K. (2001). Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91: 27-32.

SCHMIDT-DANNERT C., RUA M.L., SCHMID R.D. (1997). Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: screening, purification, cloning, overexpression and properties. *Methods in Enzymology*. 284: 194-220.

SCHMIDT-DANNERT C., RUA M.L., WAHL S., SCHMID R.D. (1997). *Bacillus thermocatenulatus* lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. *Biochemical Society Transactions*. 25: 178-182.

SHARMA R., CHISTI Y., BANERJEE U. C. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.

SHARMA R., SONI S.K., VOHRA R.M., GUPTA L.K., GUPTA J.K. (2001). Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*. 000: 1-10.

SIMÕES D. de C.M., McNEILL D., KRISTIANSEN B., MATTEY M. (1997). Purification and partial characterization of a 1.57 kDa thermostable esterase from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiology Letters*. 147: 151-156.

SINCHAIKUL S., SOOKHEO B., PHUTRAKUL S., WU Y.T., PAN F.M., CHEN S.T. (2001). Structural modeling and characterization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 283: 868-875.

SMACCHI E., GOBETTI M., ROSSI J. And FOX P.F. (2000). Purification and characterization of an extracellular esterase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *Lait*. 80: 255-265.

SOBEK H., GÖRISCH H. (1988). Purification and characterization of heat-stable esterase from the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemical Journal*. 250: 453-458.

SPSS Inc. (1999). SPSS 9.0 Guide to Data Analysis. Published by prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River. New Jersey 07458. USA.

SUGIHARA A., TANI T., TOMINAGA Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. Journal of Biochemistry. 109: 211-216.

SZTAJER H., LUNSDORF H., ERDMANN H., MENGE U., SCHMID R. (1992). Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. Biochimica et Biophysica Acta. 1124: 253-261.

TIMMERMANS M.Y.J., REEKMANS G., TEUCHY H.J.H., KUPERS L.P.M. (1996). Inhibition studies on calf pregastric esterase: the enzyme has no functional thiol group. Biochemical Journal. 314: 931-936.

WINKLER U.K., STUCKMANN M. (1979). Glycogen, Hyaluronate and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology. 138 (3): 663-670

YADAV R.P., SAXENA R.K., GUPTA R., DAVIDSON W.S. (1998). Purification and characterization of regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. Biotechnology and Applied Biochemistry. 28: 243-249.

YILMAZ E. (2002). Improving the application of microbial lipase by bio-imprinting at substrate-interfaces. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 37-40.

ÖZGEÇMİŞ

15.01.1979 tarihinde Konya’da doğdu. İlköğretimini 1989 yılında, Bolu Sakarya İlkokulunda tamamladıktan sonra, aynı yıl Bolu İzzet Baysal Anadolu Lisesi’nde ortaöğrenimine başladı. Lise öğrenimini 1996 yılında Aydın Lisesi’nde tamamladıktan sonra aynı yıl Trakya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Yükseköğrenimine başladı ve 2000 yılında mezun oldu. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Biyoloji Bölümü’nde Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2001 yılında, Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak işe başladı. Halen Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak eğitimine devam etmektedir.

