

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***AMANITA VAGINATA* VAR. *VAGINATA* VE *TRICHOLOMA TERREUM*  
MANTARLARINDAKİ ESTEROLİTİK AKTİVİTEDEN SORUMLU  
ENZİMLERİN KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Ümmühan ÇAKMAK**

**ŞUBAT 2008**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***AMANITA VAGINATA* VAR. *VAGINATA* VE *TRICHOLOMA TERREUM*  
MANTARLARINDAKİ ESTEROLİTİK AKTİVİTEDEN SORUMLU  
ENZİMLERİN KARAKTERİZASYONU**

**Kimyager Ümmühan ÇAKMAK**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"Yüksek Lisans (Kimya)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.01.2008  
Tezin Savunma Tarihi : 01.02.2008**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK**

**Enstitü Müdürü V. : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2008**

## ÖNSÖZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak yapılan bu çalışmada *Amanita vaginata* var. *vaginata* ve *Tricholoma terreum* mantar numunelerinden hazırlanan özütlerde esterolitik enzim aktivitesi ve karakterizasyonu incelenmiştir.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenen, çalışmalarım süresince bana yön veren ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Lisans ve yüksek lisansta desteğini hep hissettiğim sayın hocam Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'a, mantarların temin edilmesi ve teşhisinde büyük katkıları olan sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ'ye çok teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında bana büyük yardımları olan başta koçum Arş. Gör. Özlem FAİZ'e ve diğer hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatımın bu dönemine kadar maddi manevi destekleri ile hep yanımda olan aileme sevgilerimi sunar, teşekkür ederim.

Ümmühan ÇAKMAK  
Trabzon 2008

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Esteraz/Lipazların Genel Özellikler.....	1
1.3. Esteraz/Lipazların Sınıflandırılması.....	2
1.3.1. Amino Asit Dizisi Benzerliğine Göre.....	2
1.3.2. Hidrolizledikleri Ester Bağlarına Göre.....	3
1.3.3. Substrat Tercihlerine Göre.....	3
1.4. Esteraz/Lipazların Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi.....	3
1.5. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizması.....	4
1.6. Esteraz/Lipazların Bulunduğu Organizmalar.....	5
1.7. Mantarların Genel Özellikleri.....	6
1.8. <i>Amanita vaginata</i> var. <i>vaginata</i> ve <i>Tricholoma terreum</i> Mantarlarının Makroskopik Özellikleri.....	7
1.9. Esteraz/Lipazların Endüstride Kullanım Alanları.....	9
1.10. Çalışmanın Amacı.....	10
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	12
2.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	12
2.1.1. Cihazlar.....	12
2.1.2. Çözeltiler ve Tamponlar.....	12
2.1.3. Kimyasallar.....	14
2.2. Deneysel Çalışmalar.....	14
2.2.1. Enzim Özütünün Hazırlanması.....	14

2.2.2.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	15
2.2.3.	Substrat Boyaması.....	16
2.2.4.	Protein Tayini.....	16
2.2.5.	Enzim Aktivitesinin Tayini.....	17
2.2.5.1.	Substrat Özgünlüğü.....	17
2.2.5.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın etkisi.....	18
2.2.5.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	18
2.2.5.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi.....	18
2.2.5.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonun Etkisi.....	18
2.2.5.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	19
2.2.5.7.	pH Kararlılığının İncelenmesi.....	19
2.2.5.8.	Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	19
2.2.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör ve Aktivatörlerin Etkisinin İncelenmesi ve $I_{50}$ Değerlerinin Bulunması .....	20
3.	BULGULAR.....	21
3.1.	Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi .....	21
3.2.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE).....	21
3.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	22
3.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	23
3.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi.....	24
3.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	25
3.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonu Etkisi.....	27
3.8.	pH Kararlılığı.....	28
3.9.	Isıl Kararlılık.....	29
3.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi.....	30
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	31
5.	ÖNERİLER.....	35
6.	KAYNAKLAR.....	36

ÖZGEÇMİŞ

## ÖZET

Bu çalışmada, Trabzon'un Maçka ilçesi, Lişer yaylasından toplanan *Amanita vaginata* var. *vaginata* ve *Tricholoma terreum* mantar türlerine ait numunelerde esterolitik aktivite gösteren enzimler karakterize edildi. Özütlelerdeki esterolitik aktiviteden sorumlu enzimlerin varlığını ortaya koymak için doğal protein elektroforezi yapıldı, her bir numune için aktivite boyamasından sonra ikişer bant ortaya çıktı ve  $R_f$  değerleri hesaplandı. Özütlelerin *p*-nitrofenil bütirat (*p*NPB) substratı varlığında en yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi. Her iki mantar numunesi için optimum pH değerinin 8,0, optimum sıcaklığın ise 30–40 °C aralığında olduğu belirlendi. Lineweaver–Burk eğrisinden elde edilen  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri *A. vaginata* var. *vaginata* için sırasıyla 14,20 U/L ve 0,071 mM; *T. terreum* için ise 34,6 U/L ve 9,6 µM olarak bulundu. Her iki mantar numunesinden hazırlanan özütlelerde esterolitik aktivite gösteren enzimlerin pH kararlılıklarının 3,0–10,0 arasında sabit olduğu gözlemlendi. *A. vaginata* var. *vaginata* numunesi için yapılan ısı kararlılık denemesinde en yüksek aktivite değerlerine 30 °C'de ulaşıldı. Aktivite genel anlamda 10–40 °C aralığında oldukça yüksek olup, zaman ilerledikçe fazla bir azalma göstermedi. 60–70 °C aralığında ise aktivitenin kaybolduğu gözlemlendi. *T. terreum* numunesi için ise 10–40 °C aralığında enzim aktivitesinin korunduğu tespit edildi. 80 °C'de ise aktivitenin kaybolduğu gözlemlendi. Esterolitik aktivite üzerinde metal iyonların etkisini incelemek için bazı metal iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. Ayrıca  $NaN_3$ , EDTA, PMSF, DTT gibi kimyasalların her bir mantar numunesindeki enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi ve  $I_{50}$  değerleri belirlendi. Bütün bu veriler, her iki mantar numunesinde de esterolitik aktivitenin varlığını göstermektedir. Ayrıca iki mantar için kısa karbon zincirli bir substrat olan *p*NPB mevcudiyetinde aktivitenin maksimum olması ve uzun karbonlu substratlar varlığında aktivitenin oldukça azalması veya tamamen kaybolması karakterize edilen enzimlerin gerçek esteraz sınıfı enzimler olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Lipaz, Esteraz, *Amanita vaginata* var. *vaginata*, *Tricholoma terreum*, Mantar

## SUMMARY

### **Characterization of the Enzymes Having Esterolytic Activity from *Amanita vaginata* var. *vaginata* and *Tricholoma terreum* Mushrooms**

In this study, characterization of enzymes having esterolytic activity from the mushroom samples of *Amanita vaginata* var. *vaginata* and *Tricholoma terreum* harvested from the Lişer High Plateau in Maçka (Trabzon) were investigated. To prove the existence of enzymes which are responsible for the esterolytic activities in the extracts, the native protein electrophoresis were applied, two protein bands appeared after the activity staining for each samples and  $R_f$  values were calculated. It's confirmed that extracts showed the greatest activity in the presence of *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB) as a substrat. The pH and temperature optimums of them were found to be 8,0 and 30–40 °C, respectively.  $V_{max}$  and  $K_m$  values were calculated from the Lineweaver-Burk curves. For *A. vaginata* var. *vaginata*,  $V_{max}$  and  $K_m$  values were found as 14,20 U/L and 0,071 mM, respectively. For *T. terreum*,  $V_{max}$  and  $K_m$  values were found as 34,6 U/L and 9,6 µM, respectively. The pH stability was seen the stationary line between 3,0 to 10,0 for the enzymes having esterolytic activity from the extracts preparing from both mushroom samples. When the temperature stability graphics were investi gated, the highest activity was reached at 30 °C for *A. vaginata* var. *vaginata* sample. The enzyme activity was generally considerably high between 10 to 40 °C and its activity didn't show the great decrease depending on the increasing time. It was seen that its activity lost at 60–70 °C. The enzyme protected its activity from 10 to 40 °C for *T.terreum* sample. It was seen that the enzyme lost its activity at 80 °C. Chloride salts of some metal ions were used for the investigation of effects of metal ions on the esterolytic activity. Additionally, the effects of various chemicals like EDTA,  $\text{NaN}_3$ , DTT, and PMSF on the enzyme activities of both mushroom samples were tested and  $I_{50}$  values were found. These results showed that the existence of esterolytic activity for both mushroom samples. Additionally, being the activities are maximum in the presence of *p*NPB, a substrate having the short carbon chain and considerably decrease in the activities in the presence of the long carbon chain substrates for these mushrooms can be displayed that the enzymes characterized can be belonged to the class of true esterase.

**Key Words:** Lipase, Esterase, *Amanita vaginata* var. *vaginata*, *Tricholoma terreum*, Mushroom

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Lipaz/esterazların katalizlediği genel reaksiyon .....	2
Şekil 2. Esteraz/lipazın üç-boyutlu yapısının şematik gösterimi .....	4
Şekil 3. Bir lipaz reaksiyonunun basitleştirilmiş katalik mekanizması.....	5
Şekil 4. <i>Amanita vaginata</i> var. <i>vaginata</i> 'nın früktofikasyon organı.....	8
Şekil 5. <i>Tricholoma terreum</i> 'un früktofikasyon organları .....	9
Şekil 6. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> ve <i>T. terreum</i> enzim özütlerinin doğal poliakrilamid jel elektroforezi profilleri .....	22
Şekil 7. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> için enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi .....	22
Şekil 8. <i>T. terreum</i> için enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi .....	23
Şekil 9. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> için enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	23
Şekil 10. <i>T. terreum</i> için enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi .....	24
Şekil 11. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> için enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi .....	24
Şekil 12. <i>T. terreum</i> için enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi .....	25
Şekil 13. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> için esteraz/lipaz aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi .....	26
Şekil 14. <i>T. terreum</i> esteraz/lipaz aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi .....	26
Şekil 15. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> için pH kararlılık eğrisi .....	28
Şekil 16. <i>T. terreum</i> için pH kararlılık eğrisi.....	28
Şekil 17. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> için ısı kararlılık eğrisi.....	29
Şekil 18. <i>T. terreum</i> için ısı kararlılık eğrisi .....	30



## TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan cihazlar .....	12
Tablo 2. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışı .....	13
Tablo 3. Doğal jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri.....	15
Tablo 4. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> için substrat özgünlüğü.....	21
Tablo 5. <i>Tricholoma terreum</i> için substrat özgünlüğü .....	21
Tablo 6. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> esterase/lipaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi .....	27
Tablo 7. <i>T. terreum</i> esterase/lipaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi .....	27
Tablo 8. <i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> ve <i>T. terreum</i> için $I_{50}$ değerleri .....	30

## SEMBOLLER DİZİNİ

APS	:	Amonyum persülfat
Asp	:	Asparagin
BSA	:	Sığır serum albümini
dak.	.	Dakika
dd H <sub>2</sub> O	:	Çift destile su
DTT	:	Ditiyotreitol
EDTA-Na	:	Etilendiamin tetraasetik asit sodyum tuzu
Glu	:	Glutamat
His	:	Histidin
$K_m$	:	Michealis-Menten sabiti
kDa	:	Kilodalton
mM	:	Milimolar
NaAc	:	Sodyum asetat
NaN <sub>3</sub>	:	Sodyum azit
nm	:	Nanometre
Phe	:	Fenilalanin
PMSF	:	Fenilmetilsülfonil florür
<i>p</i> NPA	:	<i>p</i> -nitrofenilasetat
<i>p</i> NPB	:	<i>p</i> -nitrofenilbutirat
<i>p</i> NPL	:	<i>p</i> -nitrofenillaurat
<i>p</i> NPP	:	<i>p</i> -nitrofenilpalmitat
PAGE	:	Poliakrilamid jel elektroforezi
Ser	:	Serin
[S]	:	Substrat konsantrasyonu
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
Tris	:	Tris(hidroksimetil)aminometan
TEMED	:	N, N, N', N'-Tetrametiletilediamin
U/L	:	Ünite/Litre
$V_{maks}$	:	Maksimum hız
$\mu$ M	:	Mikromolar

## **1. GENEL BİLGİLER**

### **1.1. Giriş**

Biyoteknolojide son yıllarda sağlanan önemli gelişmeler biyolojik sistemler hakkında aydınlatılmayı bekleyen konulara ışık tutmakta, ayrıca elde edilen bilimsel veri ve sonuçların değerlendirilerek, sağlıktan gıdaya kadar birçok alanda pratikte kullanımı sağlanmaktadır. Kaydedilen bu gelişme ve ilerlemelere paralel olarak canlı sistemlerde bulunan biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar vs.) insanlığın yararına farklı alanlarda kullanımı günden güne artmaktadır (Sağlam Ertunga, 2006).

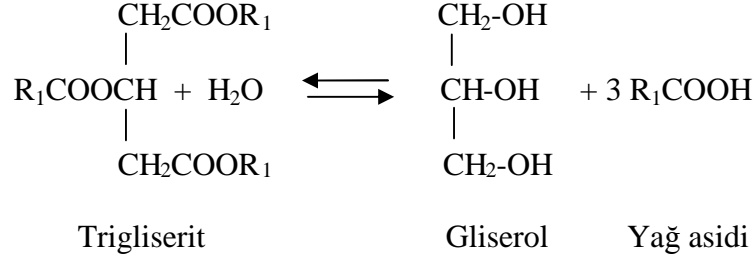
Enzimler, hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler, çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Wiseman, 1987). Günümüzde, gıda, temizlik, deri, kozmetik, tekstil, ilaç sektörleri gibi birçok endüstriyel alanda ticari olarak enzimler kullanılmaktadır. Endüstriyel alanda enzim kullanımının bazı avantajları vardır. Bunlar; reaksiyon özgünlükleri, ılımlı reaksiyon şartlarında çalışabilmeleri ve yan ürün oluşturmamaları için daha az kirliliğe neden olmaları şeklinde ifade edilebilir (Benjamin ve Ashok, 2000).

Lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksil esterazlar) hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Bu enzimler, açıl gliserollerin karboksil esterlerinin ve bazı suda çözünebilir esterlerin hidrolizini ya da oluşumunu katalizlerler. Şimdiye kadar lipaz ve esterazlar hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmaları kapsayan farklı kaynaklarda çalışılmış ve saflaştırılmıştır (Hemila vd., 1994).

### **1.2. Esteraz/Lipazların Genel Özellikleri**

Esterazlar, organik çözücü ortamında ester bağlarının oluşumunu ve sulu ortamda ise bu bağların hidrolizini katalizlerler. Lipazlar ise organik çözücü-su ara yüzeyinde, suda çözünmeyen uzun karbonlu yağ asitlerini içeren triaçilgliserollerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 1). Bu özellik lipazları esterazlardan ayırır. Lipazlardaki bu organik çözücü-su ara yüzeyindeki aktivite ara yüzey aktivasyonu olarak

bilinmektedir. Bazı durumlarda ise lipazlar suda çözünen esterlere karşı da aktivite gösterebilir (Desnuelle, 1972; Schmid, 1998).



Şekil 1. Esteraz/lipazların katalizlediği genel reaksiyon

Lipazlar, organik çözücü-su ara yüzey aktivitesine sahip ve maksimum aktiviteye ulaşmak için minimum substrat konsantrasyonuna ihtiyaç duyarken, esterazlar klasik Michaelis-Menten kinetiğine uyarlar. Yapısal çalışmalar, lipazların aktif bölgelerinin hidrofobik bazı amino asitler tarafından çevrildiğini ve bu yüzden de aktif bölgenin yalnızca minimum substrat konsantrasyonu ile etkileşebileceğini ortaya koymuştur (Fojan vd., 2000).

### 1.3. Esteraz/Lipazların Sınıflandırılması

Esteraz ve lipazlar amino asit sıralarına, katalizledikleri ester bağlarının türüne ve substrat tercihlerine göre farklı sınıflara ayrılırlar.

#### 1.3.1. Amino Asit Dizisi Benzerliğine Göre

Amino asit dizisi benzerliğine göre karboksil ester hidrolazlar 3 gruba ayrılmıştır (Hemila vd., 1994). Bunlar; grup C, L ve H'dir. Grup C kolinesteraz ve mantar kökenli lipazları içerir. Grup L ise lipoprotein lipazlar ve bakteriyel lipazları içerir. Son grup ise Vaughan ve arkadaşları tarafından keşfedilen daha sonradan hormona duyarlı lipazlar olarak (HSL) adlandırılan Grup H'dir ve HSL ile benzer amino asit sırasına sahip proteinleri içerir (Vaughan vd., 1964; Manco vd., 1997).

### 1.3.2. Hidrolizledikleri Ester Bağlarına Göre

Hidrolizledikleri ester bağlarına bağlı olarak esterazlar birçok alt sınıfa ayrılırlar. Karboksil ester hidrolazlar (EC 3.1.1.x), tiyoesterazlar (EC 3.1.2.x), fosforik monoester hidrolazlar (EC 3.1.3.x), fosfodiester hidrolazlar (EC 3.1.6.x), difosforik monoesterazlar (EC 3.1.7.x) ve fosforik triester hidrolazlar (EC 3.1.8.x) esterazların alt sınıflarını oluştururlar. Bu enzimler hayvan, insan ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Schmid ve Verger, 1998). Karboksil ester hidrolazların (EC 3.1.1.x) iki önemli sınıfı vardır. Bunlar; lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve gerçek esterazlardır (EC 3.1.1.1, karboksil esterazlar) (Eggert vd., 2002).

### 1.3.3. Substrat Tercihlerine Göre

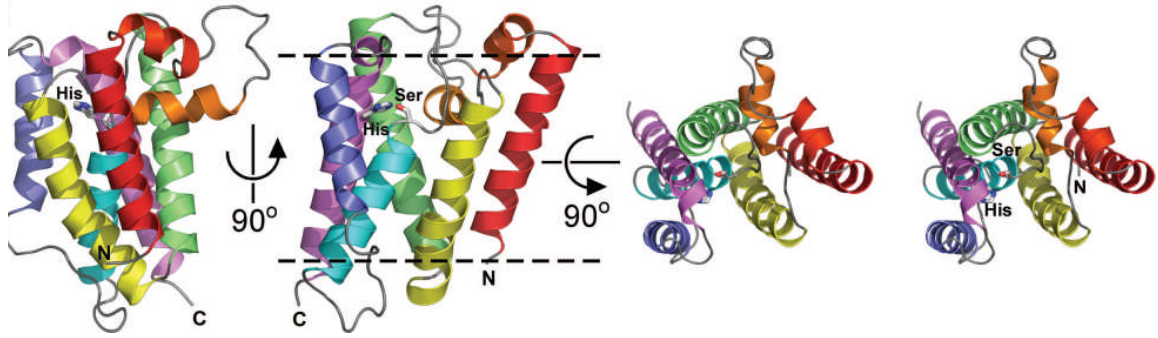
Esteraz enzimlerinin asetil esterazlar, aril esterazlar, karboksil esterazlar ve kolin esterazlar olmak üzere dört sınıfı vardır. Bunlardan asetil esteraz enzimleri hiçbir inhibitörle etkileşmezler ve genellikle alifatik substratları tercih ederler. Aril esterazlar yalnızca sülfidril ayraçlarınca inhibe edilir ve genellikle aromatik substratları tercih ederler. Karboksil esterazlar yalnız organofosfatlarca inhibe edilirler. Genellikle asetik asitten daha uzun alifatik esterleri tercih ederler. Kolin esterazlar, organofosfatlarca ve serin sülfatlarca inhibe edilirler ve diğer alifatik ve aromatik esterler dışında kolin esterleri tercih ederler (Çakır ve Yamanel, 2005).

### 1.4. Esteraz/Lipazların Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

Esteraz ve lipazların molekül ağırlıkları 19-60 kDa arasında değişiklik gösterebilir (Bano vd., 2003). 3 boyutlu yapıları  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -katlanmış yapılardan oluşmuş olup, bu enzimler karakteristik  $\alpha/\beta$  hidrolaz ailesinin birer üyesidirler (Ollis vd., 1992). Bu grupta yer alan tüm enzimler 8 farklı  $\beta$ -zinciri içeren merkezi  $\beta$ -zincir yapısıyla bu yapılarla bağlantılı 5-8  $\alpha$ -sarmal yapı bulunduran  $\alpha/\beta/\alpha$  sandviç modeli oluştururlar.  $\alpha/\beta$ -hidrolaz enzim ailesi ilk defa Ollis (1992) tarafından ortaya konulmuştur.

Katalitik mekanizma bütün enzimlerde korunmuş olan Ser-His-Asp(Glu) katalitik üçlüsü tarafından gerçekleştirilir. Aktif bölgedeki serin amino asidi tüm enzimlerde

korunmuş olan Gly-X-Ser-X-Gly yapısında yer almaktadır (Ollis vd., 1992). Şekil 2 bir esteraz/lipazın üç boyutlu yapısını göstermektedir.



Şekil 2. Esteraz/lipazın üç-boyutlu yapısının şematik gösterimi. Resim farklı açılardan verilmiştir (Ben-Shem vd., 2007).

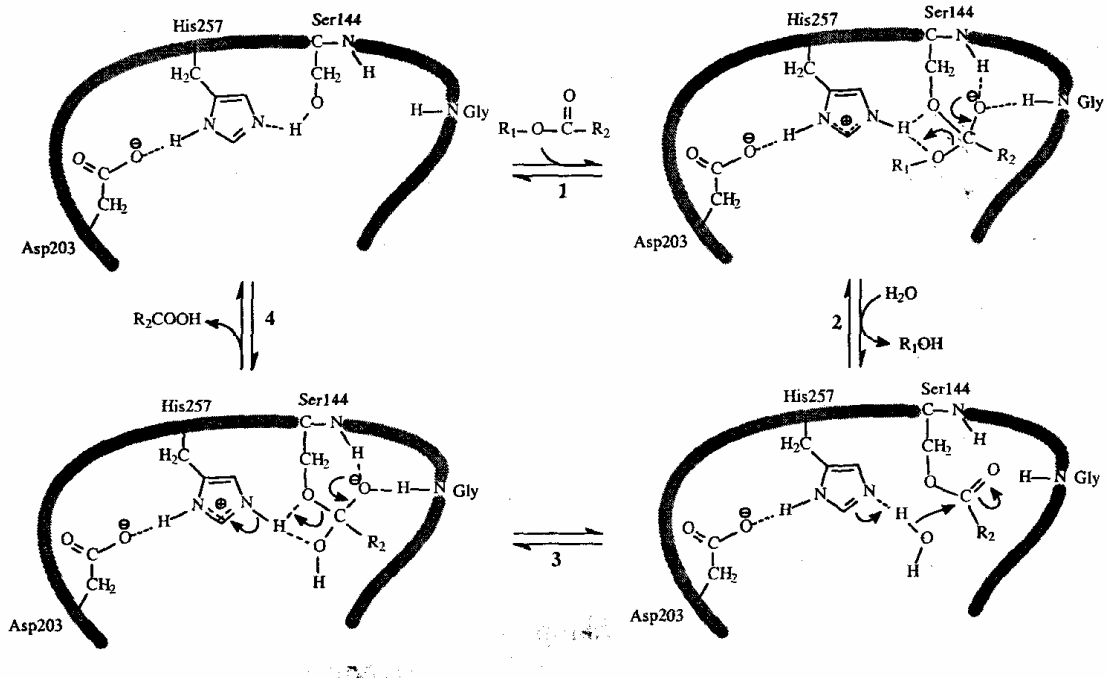
### 1.5. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizması

Lipazlar oldukça kompleks katalitik mekanizmalara sahiptirler ve sulu homojen çözeltilerde iki konformasyonel durum arasında dengededirler (Van Tilbeurgh vd., 1992; Van Tilbeurgh vd., 1993; Derewenda vd., 1992; Derewenda vd., 1994); birincisi, aktif bölgedeki katalitik üçlünün hidrofobik bir kapak tarafından kapatıldığı kapalı (aktif olmayan) form, ikincisi ise kapağın açıldığı açık (aktif olan) form. Belirli konsantrasyonlardaki substrat ve organik çözücü varlığında, organik çözücü-su ara yüzeyindeki organik çözücü ile enzimin hidrofobik kapak kısmının etkileşmesi sonucu enzim yapısındaki konformasyonel değişikliklerle birlikte kapak açılır ve substrat aktif bölge ile etkileşebilir (Bornscheuer, 2002).

Hidrolaz sınıfına ait olan gerçek esterazlar (karboksil esterazlar, EC 3.1.1.1.) suda çözünen substratların ester bağlarının oluşumunu ya da hidrolizini katalizlerler. Çoğu esterazın hidrolitik mekanizmaları, lipazların hidrolitik mekanizmalarına benzerdir. Her iki enzim de serin hidrolaz olarak değerlendirilebilir (Ollis vd., 1992).

Lipazlar biyolojik sistemler için önemli bir enzim sınıfıdır. Son zamanlarda hem esterazlar hem de lipazlar düşük su içerikli ortamlarda başarı ile kullanılmaktadırlar. Böylece bu enzimler, esterifikasyon ve trans-esterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlerler (Balcao vd., 1996; Villeneuve vd., 2000).

Lipazlar da serin proteazlar gibi aktif bölgelerindeki katalitik üçlü grup ile tanımlanır. Bir histidin ve aspartat birimince aktifleştirilen bir serin birimi içerir. Enzim ile etkileşen ester katalitik serin biriminin hidroksil yan zinciri ile bir tetrahedral açıl enzim kompleksi oluşturur. Bu açılme durumunda bir alkol ayrılması gerçekleşir. Bir sonraki basamak açıl grubunun uzaklaştırılmasını içerir ve bu basamakta genellikle su molekülü olan ikinci substratın açılmiş enzime nükleofilik saldırısı sonucu bir karboksilik aside ve serbest enzime ulaşır (Şekil 3) (Güner, 2007).



Şekil 3. Bir lipaz reaksiyonunun basitleştirilmiş katalik mekanizması

## 1.6. Esteraz/Lipazların Bulunduğu Organizmalar

Bu enzimler insan ve hayvanlarda sindirim sisteminde ve dokularda, bitkilerde tohum ve meyvelerde, ayrıca bakteri, maya ve mantar gibi mikroorganizmalarda bulunurlar (Balcao vd., 1996; Villeneuve vd., 2000).

Son zamanlarda mikrobiyal lipolitik enzimler oldukça önemli hale gelmişlerdir ve pahalı memeli enzimleri için iyi birer alternatif olmuşlardır (Long vd., 1988; Winkler vd., 1990). Birçok mezofilik organizmadan esterazlar ve lipazlar saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Bunlardan bazıları; *Pseudomonas cepacia* (Shum ve Markovetz, 1974; Sugihara vd., 1992), *Pseudomonas fluorescens* (Nakagawa vd., 1984; Suguira vd., 1997),

*Pseudomonas aeruginosa* (Stuer vd., 1986), *Arthrobacter globiformis* (Nishizawa vd., 1993), *Candida cylindracea* (Rua vd., 1993), *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hespell ve O'Bryan-Shah, 1988), *Brevibacterium linens* (Lambrechts ve Galzy, 1995), *Acinetobacter calcoaceticus* (Sherwani ve Fixter, 1989), *Bacillus subtilis* (Meghji vd., 1990; Lesuisse vd., 1993) ve *Aspergillus niger*'dir (Fukumoto vd., 1963; Okumura vd., 1983).

Ticari olarak kullanılan birçok esteraz ve lipaz aslında mikrobiyal orijinlidir. Bu enzimleri üreten mikroorganizmalar endüstriyel atıklar, süt ürünleri, petrol veya yağ ile kirlenmiş topraklarda ve sıcak su kaplıcaları gibi farklı ortamlarda bulunabilmektedirler (Sharma vd., 2001). Son zamanlarda, esterlerin geniş orandaki sentezleri ve esterifikasyondaki çok yönlü biyokataliz gibi özellikleri nedeniyle bir mantar türü olan *Candida rugosa*'dan lipaz üretimi büyük önem kazanmıştır (Jaeger ve Reetz, 1998).

### 1.7. Mantarların Genel Özellikleri

Eski zamanlardan beri mantarlar günlük beslenmenin yanı sıra, güzel aromaları ve tatları sebebiyle de insanlar tarafından tüketilmektedir. Mantarların tedavi edici amaçla kullanımı günden güne artmaktadır. Doğal ürünler arasında yer alan mantarlar klinik çalışmalarda da sıkça kullanılmaktadır. Çünkü mantarlar bolca bulunabilirler ve pahalı değildirler (Bourquelot ve Bertrand, 1895).

İlk taksonomik gruplandırma eşeyssel sporlarına göre yapılmıştır. Bu güne kadar mantarlar gamet, gametangina, sporokarp ve sporların özelliklerine, hayat döngülerindeki sitolojik ve morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır (URL-1, 2007).

Mantarlar, çok hücreli ve tek hücreli olabilen ökaryotik bir canlı alemdir. Mantar ismi şapkalı mantarların tümüne halk arasında verilen genel bir isimdir. Halk arasında küf, pas, rastık, maya, şapkalı mantar gibi çeşitli isimlerle anılan bütün mantarlar, mantarlar alemi içerisinde incelenirler. Dünyanın her yerinde bulunurlar. Fazla nemli yerlerde daha çok görülmektedirler. Yeryüzünde 1,5 milyon kadar mantar türü olduğu düşünülmektedir. Günümüzde sadece 69.000 kadar türü bilinmektedir (URL-1, 2007).

Makro mantarlar klorofil içermeyen, üreme organları ve esas bünyeleri iplik gibi, "hif" denilen küçük borucuklardan ibaret canlılardır. Yaşama modelleri ve belirgin şekilleri ile bağımsız bir canlı alemidirler. Bu canlılar hem eşeyli hem de eşeysiz olarak, sporlar oluşturarak ürerler. Klorofil içermediklerinden bağımsız olarak şeker, yağ ve nişasta gibi



organik maddeler oluşturmazlar ve bu nedenle diğer canlılara ihtiyaç duyarlar (URL-2, 2007).

Makromantarlar; çayırlarda, yol kenarlarında, ormanlarda, ağaç altlarında yetişirler. Çok değişik renk ve şekillere sahiptirler. Yenilebilir mantarlar, büyük ölçüde su içermekte ve aroması nedeniyle bazı insanlar tarafından ilgi görmektedir. Protein ve mineral tuzlar açısından oldukça zengin yapıdadırlar. Kalsiyum, potasyum, fosfor ve demir içerirler. Mantarlar C vitamini açısından çok fakirdirler. Buna karşılık, B grubu vitaminleri, K ve D2 vitaminleri açısından zengin mantar türleri vardır (URL-2, 2007).

Mantar proteinlerinin sindirilme yüzdeleri % 72-83 arasındadır. Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında, iyi bir lizin, arginin, histidin ve treonin kaynağıdır. İnsan beslenmesi için gerekli tüm aminoasitleri içermektedirler, buna rağmen triptofan seviyeleri kısmen düşüktür. Ayrıca mantarlar sodyum, klor, bakır, demir, potasyum, brom, mangan, çinko, fosfor, kalsiyum, riboflavin, nikotinik asit ve folik asit gibi mineral ve vitaminler açısından da zengindirler (Boztok, 1990; Kolcuoğlu, 2005).

Mantarlar mükemmel bir folik asit kaynağıdır. Folik asit yetersizliğinden ileri gelen aneminin tedavisinde mantar içeren diyet etkili olmaktadır. Mantarlarda yapılan araştırmalar sonucunda mantarların kandaki şeker seviyesini ve kolesterolü düşürdüğü görülmektedir (Boztok, 1990).

### **1.8. *Amanita vaginata* var. *vaginata* ve *Tricholoma terreum* Mantarlarının Makroskopik Özellikleri**

*Amanita vaginata* (Bull.) Lam. Var. *vaginata*, her türlü toprakta, yaprağını döken ağaç ormanlarında ve çok nadiren de iğne yapraklı ağaç ormanlarda yaşayan bir makromantar türüdür (Şekil 4). Yazdan sonbahar sonuna kadar yetişen ve yaygın olmayan bir türdür. Gençken silindirsidir, daha sonra konveksten düzlemsel hale dönüşür. Yüzeyi düz, donuk ve yer yer çizgilidir. Rengi kurşunimsi gri tonlarındadır, çok nadiren de donuk kahverengi tonlarındadır. Kenarları yayvan ve çizgilidir. Mantarın merkezinden uca doğru incelen etli kısmı beyaz, kokusuz, tadı hafif ve lezzetlidir. Lamel beyaz ve geniştir. Sap kısmı 90-120 x 6-10 mm ebadında, tabana doğru genişleyen silindirik bir yapıdadır. Sapı, gençken dolu ve sert, yaşlı iken içi boş ve kırılmandır. Taban kısmı ise beyazımsı kahverengi tonlarındadır (Breitenbach ve Kränzlin, 1984-2000). Yenilebilir bir mantar türüdür (Phillips, 1981).



Şekil 4. *Amanita vaginata* var. *vaginata*'nın fruktifikasyon organı

*Tricholoma terreum*, *Picea* sp. ve *Pinus* sp. altındaki iğne yapraklı ağaç ormanlarında, kireçli topraklarda, ender olarak da yaprak döken ağaç ormanlarında yetişmektedir (Şekil 5). Ayrıca orman kenarı boyunca ve ormanın içindeki çayırlarda da yetişebilmektedir. Yaz sonundan sonbahara kadar yetişen, yaygın fakat sadece yerel olarak bol bulunan bir makromantar türüdür. Mantarın şemsiye şeklinde şapkası vardır. Gençken çan biçiminde olan şapka daha sonra genişleyerek dalgalı ve dışbükey bir yapı kazanır. Merkezi tümsek şeklindedir. Yüzeyi donuk renkte ve lifli bir yapıya sahiptir. Rengi, koyu gri ile kahverengimsi gri tonları arasındadır ve bazen de siyahtır. Şapkanın kenarı hareketli ve daima içe kavislidir, gençken ise biraz tırtıllıdır. Et kısmı beyaz, sert, zayıf, hemen hemen kokusuz ve tadı hafiftir. Lamel kısmı geniş, tırtıllı ve gri-beyaz renklidir. Sap kısmı 40-70x 10-17 mm'dir, oldukça kalın silindirik, beyazdan gri-beyaza, düzgün, ince lifli, kolay kırılan bir yapıya sahiptir (Breitenbach ve Kränzlin, 1984-2000). Yenilebilir bir mantar türüdür (Phillips, 1981).



Şekil 5. *Tricholoma terreum* 'un früktofikasyon organları

### 1.9. Esteraz/Lipazların Endüstride Kullanım Alanları

Günümüzde bilinen 4000 enzimden yaklaşık yarısı ticari olarak kullanılmaktadır. 1960'a kadar yıllık enzim satışı yalnızca birkaç milyon dolarla sınırlı iken, günümüzde enzim pazarı hızla büyümüş ve pazar hacmi yüzlerce milyon dolara ulaşmıştır (Godfrey ve West, 1996; Wilke, 1999). Dünyadaki toplam endüstriyel enzimlerin yaklaşık % 60'ı Avrupa tarafından üretilmektedir. Bütün bu endüstriyel enzimlerin % 75'i (lipidleri de hidrolizleyen) hidrolitik enzimlerdir. Proteaz enzimi en fazla üretilen endüstriyel enzim olup, satışların yaklaşık % 40'ına karşılık gelmektedir. (Sharma vd., 2001).

Lipaz ve esterazın her ikisi de substrat spesifitesi, bölge spesifitesi ve kiral seçicilik gibi karakteristik benzerlikler içermektedir (Jaeger vd., 1994; Schmid ve Verger, 1998). Lipolitik enzim aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Yüksek lipoliz, çeşitli peynirlerin üretiminde zorunlu olmaktadır. Peynir yapımında kullanılan renninin kütesinde, proteolitik enzimler gibi lipazlarda mevcuttur. Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, çikolata endüstrisinde, kremalarda ve karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margarınler, fırın ürünleri ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde, lipazlarla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır (Hiol vd., 2000).

Lipazlar bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Lipazlar biyo-medikal uygulamalarda, gıda endüstrisinde, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayisinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayisinde uygulama alanları bulunmaktadır. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreten mikroorganizmalar; *Pseudomonas* sp., *Candida* sp., *Rhizopus* sp.'dir. Kıyafetlerimizi kirleten maddelerin başında proteinler, yağlar ve nişasta gelir. Bu lekeleri yüksek sıcaklıkta kimyasal deterjanlar yoluyla gidermek mümkünse de, enzimlerin kullanılmasıyla düşük sıcaklıkta ve daha az mekanik enerji ile de lekeler giderilebilir. Ayrıca enzimler çimen, kan, süt ve ter lekelerini çıkartmakta biyolojik olmayan deterjanlara göre çok daha etkilidirler. Deterjanlarda kullanılan enzimlerden proteazlar yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri parçalar, lipazlar yağ lekelerini, amilazlar ise nişasta bazlı lekeleri çıkarmakta etkilidir (Hiol vd., 2000). Lipaz enzimi dericilikte kullanılan enzimlerden biridir. Bu enzim, yalnızca derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için daha uygun hale getirir.

### 1.10. Çalışmanın Amacı

Enzim teknolojisinin günümüzde giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır.

Endüstriyel enzimler çok çeşitli proseslerde uygulanabilmelerinden dolayı özellikle mikrobiyal kökenli olanlar için gelen talep sürekli artmaktadır. Enzim katalizli reaksiyonlar, alternatifleri olan yorucu ve pahalı kimyasal reaksiyonlardan daha caziptir. Enzimler, gıda, süt ürünleri, ilaç sanayisi, deterjan, tekstil ve kozmetik endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Lipaz üretimine olan ilginin birçok sebebi vardır. Birincisi, sadece hidroliz olayında değil, aynı zamanda esterifikasyon (Schmitt-Rozieres vd., 1999) ve transesterifikasyon (Osorio vd., 2001) olaylarını da katalizleyebilmeleri; ikincisi, aktivitelerini ve yapılarını organik çözücülerde muhafaza edebilmeleri (Khmelnitsky, 1999); üçüncüsü, kimyasal katalizlerle kıyaslandığında daha fazla substrat spesifikliğine, regio- ve enantio-

seçiciliğine sahip olmaları ve ayrıca çok daha düşük sıcaklık ve basınç değerlerinde çalışabilmeleri olarak sıralanabilir.

Mantarlara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Geleneksel ilaç olarak, yan etkilerinin az olması nedeniyle çeşitli hastalıkları önlemek ve iyileştirmek için gerekli bileşiklerin kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Doğal ürünler arasında mantar, kolayca ve bol miktarda elde edilmesi ve ayrıca ucuz olmaları sebebiyle klinik çalışmalarda en potansiyel aday olarak görülmektedir. Mantar orijinli antibiyotikler günümüzde bakteriyel enfeksiyonları önlemek için kullanılmaktadırlar. Araştırmalar fungal karbohidratlar yoluyla mantarın antikanser doğası, özellikle akciğer kanserine etkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Mantarları çeşitli kabilelerin çok eskiden beri tedavi edici olarak kullanmaları, tıbbi potansiyellerinin önemini ortaya koymuş ve araştırmacıların görüşlerini modern tıbbi potansiyelleri üzerinde yoğunlaşmalarına sebep olmuştur (Blackwell, 1988; Sesli, 1994).

Bu çalışmanın amacı, Trabzon'un Maçka ilçesi, Lişer yaylasından toplanan *A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* mantar türlerine ait numunelerde, esterolitik aktivite gösteren enzimlerin karakterizasyonudur. Enzimlerin karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda, optimum pH, optimum sıcaklık, substrat özgünlüğü, ısıl ve pH kararlılığı, metal iyonların ve çeşitli kimyasal maddelerin etkisi,  $I_{50}$  değerleri, substrat ve protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi incelenerek bazı kinetik sonuçlara ulaşılmıştır. Böylece *A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* mantar numunelerinin esterolitik aktivite gösteren enzim kaynağı olarak endüstriyel ya da diğer uygulamalar için kullanılıp kullanılmayacağı tespit edilebilecektir.

Gerçekleştirilen bu çalışma, yöremizde yetişen bu mantarların biyolojik potansiyellerinin incelenmesine de olanak sağladığından önem arz etmektedir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1.Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

#### 2.1.1. Cihazlar

Kullanılan cihazlar, modelleri ve firma isimleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Model	Firma
Otomatik Pipet (1–10µL /100–1000µL /1000–5000µL)	Acura 825	Socorex
Isıtıcı /Magnetik Karıştırıcı	HS31	Chiltren
Vorteks Karıştırıcı	RX	Velp
pH Metre	720	WTW Inolab
Spektrofotometre	UV/2	Unicam
Santrifüj	Rotina 35 R	Hettich
Protein Elektroforezi	P8DS	Owl Speration Systems
Çalkalayıcı Su Banyosu	SV–1422	Memmert

#### 2.1.2. Çözeltiler ve Tamponlar

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri / hazırlanışı

<b>Tamponlar</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Glisin-HCl Tamponu (50mM, pH 3,0)	3,75 g glisin suda çözülerek 1M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı
Sodyum Asetat Tamponu (50mM, pH 4,0-5,0)	4,1 g sodyum asetat suda çözülerek 1M asetik asit çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı
Fosfat Tamponu (50mM, pH 6,0-7,0)	8,7 g $K_2HPO_4$ 'ün 1L suda çözülmesi ile hazırlanan çözelti 6,8 g $KH_2PO_4$ 'ün 1L suda çözülmesi ile hazırlanan çözelti ile titre edilerek pH'ı istenilen değere ayarlanarak hazırlandı
Tris-HCl Tamponu (50mM, pH 8,0-9,0)	6,05 g tris bazı suda çözülerek 1M HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı
Glisin-NaOH (50mM, pH 10,0)	3,75 g glisin suda çözülerek 1M NaOH çözeltisi ile pH'sı ayarlanıp 1L'ye tamamlandı
<b>Substratlar</b>	<b>Hazırlanışı</b>
<i>p</i> -nitrofenil asetat	1,8 mg tartılarak DMSO ile 1 mL'ye tamamlandı ( $M_A= 181,15$ g/mol )
<i>p</i> -nitrofenil bütirat	1,78 $\mu$ L'si asetonitrille 1000 $\mu$ L 'ye tamamlandı
<i>p</i> -nitrofenil laurat	3,2 mg tartılarak DMSO ile 1 mL'ye tamamlandı ( $M_A= 322,15$ g/mol )
<i>p</i> -nitrofenil palmitat	3,7 mg tartılarak DMSO ile 1 mL'ye tamamlandı ( $M_A= 377$ g/mol )
<b>Lowry Protein Tayini</b>	
Lowry A	0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) $Na_2CO_3$ çözeltisi
Lowry B	% 1 bakır sülfat çözeltisi
Lowry C	% 2 sodyum – potasyum tartarat çözeltisi
Lowry D	1 kısım Lowry B + 1 kısım Lowry C
Lowry E	0,25 mL Lowry D + 12,5 mL Lowry A
Lowry F	1 hacim Folin belirteci + 1 hacim dd $H_2O$
<b>Doğal Jel Elektroforezi</b>	
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl)	36,3 g Tris bazı 150 mL suda çözüldü, pH 8,8'e ayarlandı ve son hacim su ile 200 mL yapıldı
Yığıma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl)	24,2 g Tris bazı 150 mL suda çözüldü, pH 6,8'e ayarlandı ve son hacim su ile 200 mL yapıldı
% 10 Amonyum Persülfat (APS)	% 10 (w/v) APS çözeltisi su ile hazırlandı ve -20 °C'de saklandı
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED)	Orijinal şişesinden kullanıldı
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	% 29,2 (w/v) akrilamid ve % 0,8 (w/v) N, N'-metilen bisakrilamidin suda çözülmesiyle hazırlandı
Doğal Jel Yükleme Tamponu	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) % 0,1 Bromofenol mavisi % 20 gliserol (100 $\mu$ L'lik hacimlerde tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı)
Doğal Jel Yürütme Tamponu	25 mM Tris bazı ve 250 mM glisin içeren çözeltinin pH'ı 8,3'e ayarlanarak hazırlandı
Substrat Boyama Çözeltisi [ $\alpha$ - naftil asetat : Fast Red (1:1 oranında)]	8 mg $\alpha$ - naftil asetat 2 mL asetonunda çözülerek hacmi 0,1 mM pH 7,5 Tris tamponu ile 20 mL'ye tamamlandı 20 mg Fast Red TR tuzu 0,1 mM pH 7,5 Tris tamponunda çözüldü ve yine aynı tampon ile hacmi 20 mL'ye tamamlandı

### 2.1.3. Kimyasallar

Merck A.G. (Darmstadt, Germany)'den magnezyum klorür, sodyum klorür, potasyum klorür, amonyum klorür, lityum klorür, sodyum asetat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum hidroksit, bakır (II) sülfat pentahidrat, merkaptotanol, hidrojen klorür, etilendiamin tetraasetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), etanol, Tris, glisin, divalent  $Ni^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve trivalent  $Al^{+3}$  iyonlarının klorür tuzları temin edildi.

Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)'dan kalsiyum klorür dihidrat, *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP), fenilmetilsülfonil florür (PMSF), ditiyotreitöl (DTT), sodyum azit ( $NaN_3$ ), sodyum potasyum tartarat ve bovin serum albümin (BSA) temin edildi.

## 2.2. Deneysel Çalışmalar

### 2.2.1. Enzim Özütünün Hazırlanması

- *T. terreum* ve *A. vaginata* var. *vaginata* mantar numunelerinden, ayrı ayrı 10'ar g alınarak sıvı azot içerisinde hücre membranlarının parçalanması için 15 dak. bekletildi.
- Bu örneklere 2 mM EDTA, 1mM  $MgCl_2$  ve 1mM PMSF içeren 50 mM sodyum asetat (NaAc) (pH 5,0), 50 mM fosfat (pH 7,0) ve 50 mM Tris-HCl (pH 9,0) tamponlarından ayrı ayrı 20'şer mL ilave edilerek havanda dövüldü.
- Daha sonra bu karışım süzüldü ve elde edilen süzüntüler 4 °C'de, 15 dak. 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Elde edilen süpernatant 3 kısma ayrıldı.
- Birinci kısma çöktürme yapılmadı.
- İkinci kısma 1:1 oranında soğuk etanol ilave edilerek 4 °C'de bir gece buzdolabında bekletildi.
- Üçüncü kısma 1:1 oranında soğuk aseton ilave edilerek 4 °C'de bir gece bekletildi.
- İkinci ve üçüncü kısımlar 4 °C'de, 10 dak. ve 8000 rpm'de santrifüj edildi.



- Süpernatant kısımları atıldı. Çökelek açık havada kurutularak aseton ve etanolün uçması sağlandı.
- Kuruyan çökelekler uygun tamponlarda çözüldü.
- Çözeltiler 4 °C’de, 10 dak. ve 8000 rpm’de santrifüj edildi.
- Elde edilen çözeltiler ham enzim özütü olarak kullanıldı.
- Bu özütler üzerinde yapılan aktivite tayinleri sonucunda *T. terreum*’un pH 5,0 NaAc tamponunda etanolle çöktürülmesine; *A. vaginata* var. *vaginata*’nın ise pH 7,0 fosfat tamponunda asetonla çöktürülmesine karar verildi.
- Sonraki çalışmalar için bu mantarlardan uygun miktarlar alınarak yukarıda anlatılan yöntemle özütler hazırlandı.

### 2.2.2. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Özütlerdeki esterolitik aktivitenin varlığı doğal poliakrilamid jel elektrofrez ve substrat boyaması ile ortaya konuldu. Doğal elektrofrez, sodyum dodesil sülfat (SDS)’sız ortamda ve 10x10 cm ebadındaki elektrofrez tankında gerçekleştirildi (Temizkan ve Arda, 2004). % 5’lik yığıma ve % 10’luk ayırma jeli kullanıldı. Elektrofrezde kullanılan çözeltiler ve hacimleri Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Doğal poliakrilamid jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (% 5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (% 10, pH 8,8)
Yığıma Jel Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,63 mL	---
Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	---	2,5 mL
% 30 Akrlamid/Bisakrlamid	0,83 mL	3,3 mL
dd H <sub>2</sub> O	3,4 mL	4,0 mL
% 10 Amonyum persülfat (APS)	0,05 mL	0,1 mL
N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED)	0,005 mL	0,004 mL

Hazırlanan jel donduktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal elektrofrez yürütme tamponu (Tablo 2) ile dolduruldu. Doğal elektrofrez yükleme boyası ile 1:1 oranında

kariştırılan örnekler Hamilton şıringası ile kuyucuklara yüklendi. Tank buz dolu bir kap içine yerleştirildi. Boya, yığma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 10 dakika 20 mA'lık ve ayırma jelinden çıkana kadar da yaklaşık olarak 50–60 dakika 25 mA'lık akım uygulandı. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartılarak boyama işlemine geçildi.

### 2.2.3. Substrat Boyaması

Doğal poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) için Owl scientific marka P8DS model (Inc. Wobum, MA USA) elektroforez cihazı kullanıldı. Enzim özütü % 10'luk doğal PAGE'de yürütüldü. Substrat boyama çözeltisi, çıkartılan jelin üzerine döküldü. 30 dak. bekletildikten sonra bantların varlığı gözlemlendi. Jel 1:3 oranında metanol ve su içeren karişımda 30 dak. bekletilerek yıkama yapıldı ve bantların varlığı daha da belirginleştirildi.

### 2.2.4. Protein Tayini

Özütteki protein miktarı Lowry metoduyla belirlendi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiği için bir seri serum albumin çözeltisi hazırlandı. Tayinin gerçekleştirilmesi için aşağıdaki işlemler yapıldı.

- BSA'dan 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu\text{L}$  alınarak üzerlerine % 0,1 SDS içeren 0,1 N NaOH çözeltisinden sırasıyla 490, 480, 470, 460 ve 450  $\mu\text{L}$  ilave edildi.
- Özütten 4  $\mu\text{L}$  alındı ve hacmi % 0,1 SDS içeren 0,1 N NaOH ile 500 $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandı.
- Hem BSA standartlarına hem de örneğe sırasıyla 1'er mL Lowry E karişımı ilave edildi ve hemen vortekslendi.
- Tüpler 10 dak. oda sıcaklığında bekletildi.
- Standartlara ve örneğe 100  $\mu\text{L}$  Lowry F ilave edildi ve hemen vortekslendi.
- Tüpler 30 dak. karanlıkta bekletildi.
- 650 nm'de absorbanları okundu.

- Kalibrasyon grafiği hazırlanarak örnek için elde edilen konsantrasyon değeri bu işlemdeki seyrelme faktörü ile çarpılarak orijinal özütteki protein içeriği mg/mL olarak belirlendi.

### 2.2.5. Enzim Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi tayini spektrofotometrik olarak yapıldı (Lee vd., 1999). Tayinin gerçekteşmesi için aşağıdaki işlem sırası takip edildi.

- Asetonitrilde 10 mM *p*-nitrofenillaurat (*p*NPL) çözeltilisi hazırlandı.
- Asetonitril (10 mM *p*NPL içeren):etanol:fosfat tamponu (50mM, pH 7,5) sırası ile 1:4:95 (v/v/v) hacim oranlarında karıştırılarak substrat çözeltilisi hazırlandı.
- Özütten 0,6 mL ve substrat çözeltilisinden 1,8 mL alınarak karıştırıldı.
- 405 nm'de absorbansı okundu.
- Bu karışım 30 °C'de çalkalayıcı su banyosunda 20 dak. bekletildi.
- Tekrar 405 nm'de absorbansı okundu.
- Kontrol olarak ise 0,6 mL özüt yerine 0,6 mL tampon kullanıldı ve yukarıdaki işlemler tekrarlandı.

Bir ünite, çalışılan sıcaklık ve pH'da 1 dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak hesaplandı. Bu değer reaksiyon karışımının hacmine bölünerek ünite/litre (U/L) cinsinden aktivite hesaplandı.

#### 2.2.5.1. Substrat Özgünlüğü

Enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak, hangi substrat varlığında en yüksek enzim aktivitesinin gözleendiği incelendi. Bu denemelerde, ayrı ayrı *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) substratlarının 10 mM'lık stok çözeltilerinden nihai konsantrasyonu 0,075 mM olacak şekilde reaksiyon karışimleri hazırlandı ve aktivite tayini gerçekteştirilerek *p*-nitrofenil esterlerinin fenolat iyonuna dönüşüm hızları incelendi.

### **2.2.5.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi**

Özütlerdeki esterolitik aktivite üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla substrat çözeltisindeki tampon yerine ayrı ayrı 50 mM'lık glisin (pH 3,0), asetat (pH 4,0 ve pH 5,0), fosfat (pH 6,0 ve pH 7,0), Tris-HCl (pH 8,0 ve pH 9,0) ve glisin-NaOH (pH 10,0) tamponları kullanıldı ve aktivite tayinleri yapıldı.

### **2.2.5.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

Özütlerdeki esterolitik aktivite üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla enzim aktivitesi tayin yöntemine göre uygun tampon ve substratlar kullanılarak reaksiyon karışımları hazırlandı, 10–90 °C sıcaklık aralığında 10 °C'lik artışlarla sabit sıcaklıktaki çalkalayıcı su banyosu kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi ve absorbanslar okundu. Yapılan hesaplamalar sonucu, her bir mantar özütündeki esterolitik aktivite için optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

### **2.2.5.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi**

Bu denemede substrat konsantrasyonu sabit tutularak protein içeriği bilinen özütten değişik hacimlerde alındı ve reaksiyon karışımları hazırlandı. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinde protein miktarına bağlı olarak enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlarla % bağıl aktiviteye karşı protein miktarı grafiği çizildi.

### **2.2.5.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Bu denemede ise protein miktarı sabit tutularak farklı substrat konsantrasyonları içerecek şekilde substrat çözeltileri hazırlandı ve enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri bulundu ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri belirlendi.

### 2.2.5.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini incelenmek amacıyla;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  ve  $\text{Al}^{+3}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde her bir metal iyonu özüt ile su banyosunda 30 °C'de, 20 dak. inkübe edildikten sonra aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar metal iyonu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak bu metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

### 2.2.5.7. pH Kararlılığının İncelenmesi

Her bir özütteki esterolitik enzimin pH kararlılığının incelenmesi amacıyla;

- 50 mM glisin (pH 3,0 ), 50 mM asetat (pH 4,0 ve pH 5,0) , 50 mM fosfat (pH 6,0 ve pH 7,0), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0 ve pH 9,0) ve 50 mM glisin-NaOH (pH 10,0) tamponları kullanıldı.
- Uygun hacimlerde tampon çözeltiler uygun hacimdeki özütlerle karıştırıldı.
- Bu karışımların her birinden 0,6 mL alınarak her bir tampon için hazırlanan 1,8 mL substrat çözeltisi ile karıştırıldı ve 405 nm'de absorbansları okundu.
- 30 °C'de, 20 dak. su banyosunda inkübe edikten sonra tekrar absorbansları okundu.
- Her bir tamponla karıştırılan özütlerin geri kalan kısmı 4 °C'de, 24 saat inkübe edildi ve yukarıda anlatılan işlemler bu karışımlar için tekrar yapıldı.
- % Kalan aktivite 24 saat sonunda elde edilen aktivitelerin sıfırıncı (başlangıç) saatteki aktiviteleriyle karşılaştırılmasıyla belirlendi.

### 2.2.5.8. Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Her bir özütteki esterolitik enzimin ısı kararlılığını belirlemek için;

- Özütler 20 dak., 40 dak., 1 saat ve 4 saatlik zaman aralıklarında 10–90 °C (10 °C'lik artışlarla) sıcaklıklarda su banyosunda ayrı ayrı inkübe edildi.
- Bu özütler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra enzim aktivite tayini gerçekleştirilerek absorbanslar okundu.

- % Kalan aktiviter, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzim özütünün optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

#### **2.2.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör ve Aktivatörlerin Etkisinin İncelenmesi ve $I_{50}$ Değerlerinin Bulunması**

$\text{NaN}_3$ , EDTA-Na, PMSF ve DTT kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

- $\text{NaN}_3$ , EDTA, PMSF, DTT kimyasalların 100mM'lık stok çözeltileri hazırlandı.
- Stok çözeltilerden uygun hacimler alınarak belli hacimlerde özütlerle karıştırdı.
- Bu karışımlar 30 °C'de, 20 dak. su banyosunda inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi belirlendi.
- Elde edilen sonuçlarla % kalan aktiviteye karşı konsantrasyon grafiği çizildi. Aktivitenin % 50 değerinde azaldığı konsantrasyon  $I_{50}$  değeri olarak belirlendi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

*Amanita vaginata* var. *vaginata* ve *Tricholoma terreum* mantarlarına ait numunelerden elde edilen özütlerde substrat özgünlüğünü belirlemek için *p*-nitrofenil asetat( *p*NPA), *p*-nitrofenil bütirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) substratları kullanıldı. Elde edilen sonuçlara bakıldığında hem *A. vaginata* var. *vaginata* hem de *T. terreum* mantarları için en yüksek hidrolitik aktivitenin *p*NPB substratı varlığında olduğu belirlendi (Tablo 4 ve Tablo 5).

Tablo 4. *A. vaginata* var. *vaginata* için substrat özgünlüğü

Substrat	% Bağlı Aktivite
<i>p</i> -nitrofenil asetat (C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> )	10,03
<i>p</i> -nitrofenil bütirat (C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> )	100,00
<i>p</i> -nitrofenil laurat (C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> )	0
<i>p</i> -nitrofenil palmitat (C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>4</sub> )	0

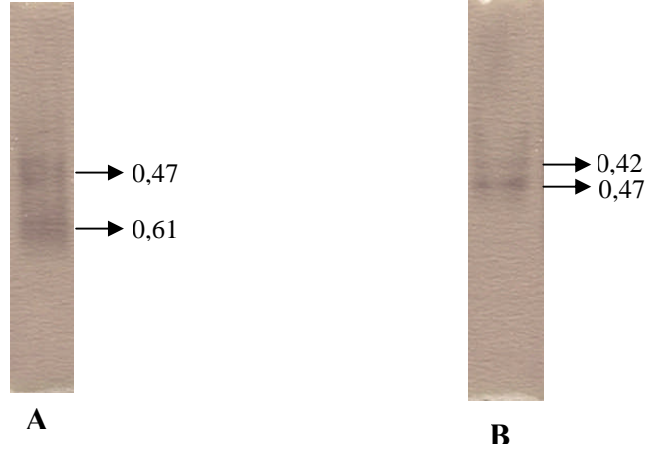
Tablo 5. *T. terreum* için substrat özgünlüğü

Substrat	% Bağlı Aktivite
<i>p</i> -nitrofenil asetat (C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> )	2,53
<i>p</i> -nitrofenil bütirat (C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> )	100
<i>p</i> -nitrofenil laurat (C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> )	62,00
<i>p</i> -nitrofenil palmitat (C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>4</sub> )	0,19

#### 3.2. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

*A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* mantar numunelerinden hazırlanan özütlerde hidrolitik aktiviteden sorumlu esterolitik enzimlerin varlığını ortaya koyabilmek için, doğal poliakrilamid jel elektrofrez yapıldı. Önceden belirtilen şekilde jeller boyanarak gözlenen bantların R<sub>f</sub> değerleri her bir mantar numunesi için ayrı ayrı hesaplandı. R<sub>f</sub> değerleri *A. vaginata* var. *vaginata* için 0,47 ve 0,62; *T. terreum* için ise 0,42 ve 0,47 olarak bulundu

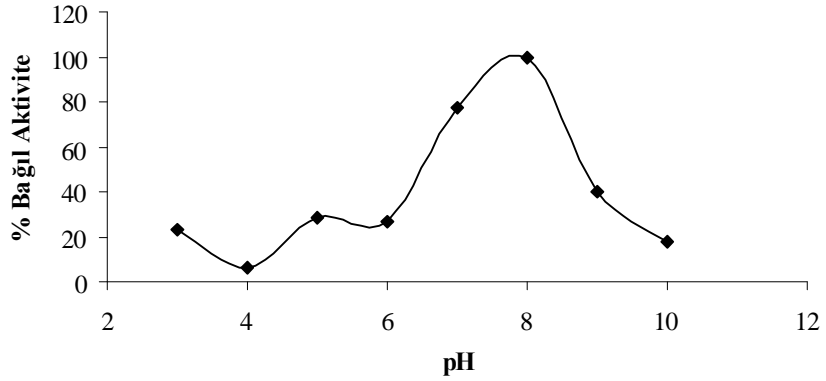
(Şekil 6). Bu bantların varlığı, özütlerde *p*-nitrofenil esterlerinin hidrolizinden sorumlu bir enzimin izomerleri halinde bulunduğunu veya benzer aktiviteye sahip enzimlerin varlığını göstermektedir.



Şekil 6. *A. vaginata* var. *vaginata* (A) ve *T. terreum* (B) enzim özütlerinin doğal poliakrilamid jel elektroforezi profilleri

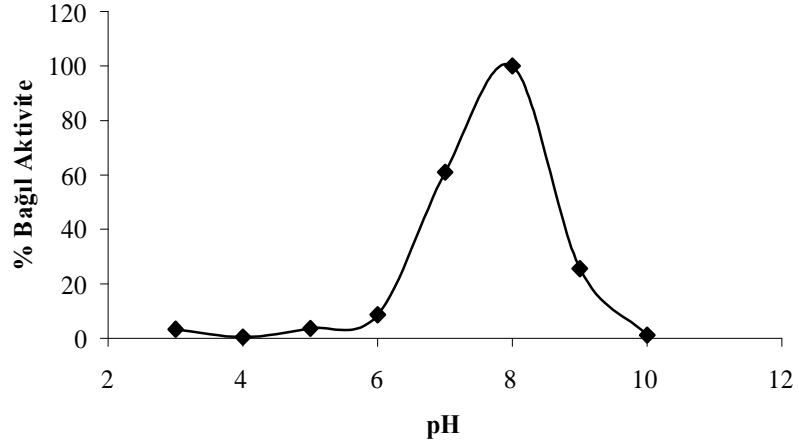
### 3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Özütlerdeki enzim aktivitesinin optimum pH değerlerini belirlemek için farklı pH değerlerinde (3,0–10,0) tamponların kullanılmasıyla aktivite tayinleri yapıldı ve % bağıl aktivite- pH grafikleri çizildi. Her iki mantar numunesi için optimum pH değeri 8,0 olarak tespit edildi (Şekil 7 ve Şekil 8).



Şekil 7. *A. vaginata* var. *vaginata* için enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

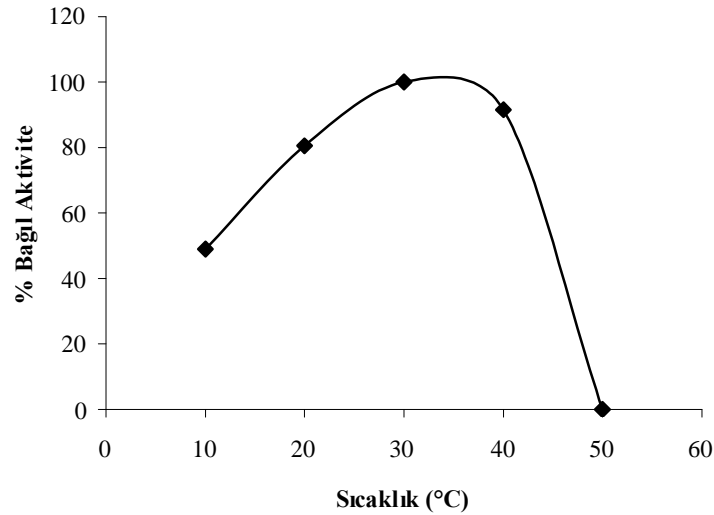




Şekil 8. *T. terreum* için enzim aktivitesi üzerine pH'nin etkisi

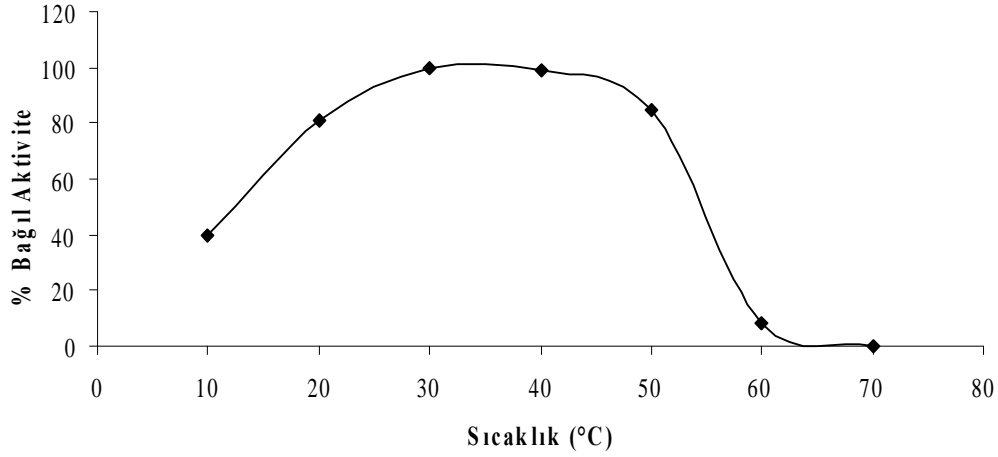
### 3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Her bir mantar özütünün optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla, 10–90 °C aralığındaki sıcaklıklarda enzim aktiviteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre % bağlı aktiviteye karşı sıcaklık grafikleri çizildi. *A. vaginata* var. *vaginata* için optimum sıcaklığın 30–40 °C aralığında olduğu, 50 °C'de ise bağlı aktivitenin sıfıra düştüğü gözlemlendi (Şekil 9).



Şekil 9. *A. vaginata* var. *vaginata* için enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

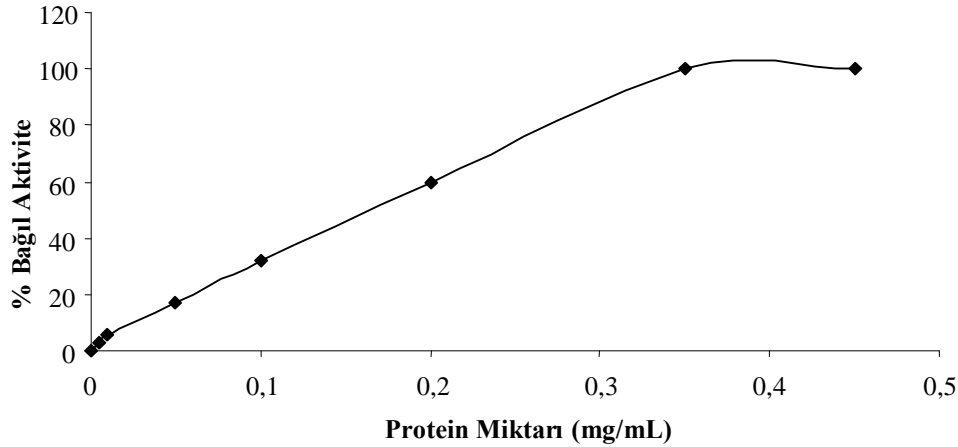
*T. terreum* için ise bağlı aktivitenin 30–40 °C aralığında bir optimuma ulaştığı ve 70 °C'de sıfıra düştüğü gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. *T. terreum* için enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

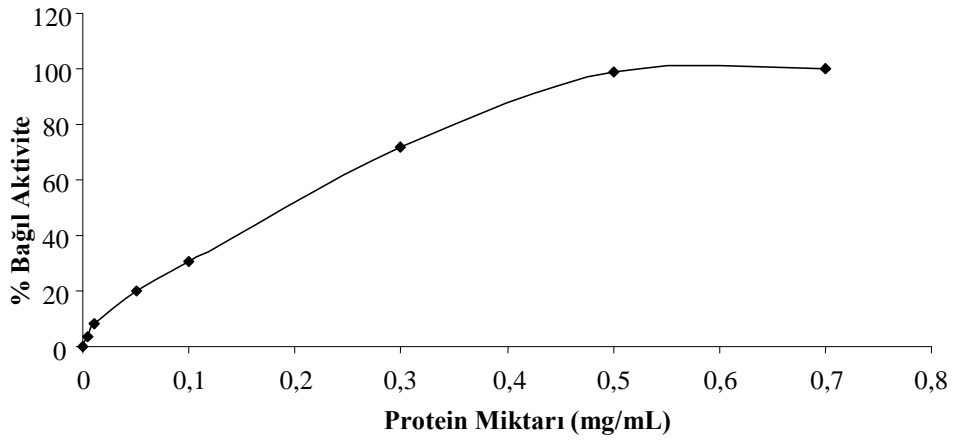
### 3.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

*A. vaginata* var. *vaginata* numunesinden hazırlanan enzim özütünde yapılan protein tayini sonucu ham özütün toplam protein içeriği 1,8 mg/mL olarak bulundu. Enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisinin incelenmesi için, farklı konsantrasyonlara seyreltilen özütler kullanılarak enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlara göre, *A. vaginata* var. *vaginata* mantar numunesinden hazırlanan enzim özütünde % bağıl aktivite değerinin 0,35 mg/mL protein miktarında optimuma ulaştığı ve bu değerden sonra sabit kaldığı gözlemlendi (Şekil 11). Bundan sonraki çalışmalarda reaksiyon karışımındaki özüt miktarı 0,35 mg/mL olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi.



Şekil 11. *A. vaginata* var. *vaginata* için enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi

*T. terreum* numunesinden hazırlanan enzim özütünde yapılan protein tayini sonucu ham özütün toplam protein içeriği 4,2 mg/mL olarak bulundu. Enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisinin incelenmesi için, farklı konsantrasyonlara seyreltilen özütler kullanılarak enzim aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlara göre, *T. terreum* mantar numunesinden hazırlanan enzim özütünde % bağıl aktivite değerinin 0,5 mg/mL protein miktarında optimuma ulaştığı ve bu değerden sonra sabit kaldığı gözlemlendi (Şekil 12). Bundan sonraki çalışmalarda reaksiyon karışımındaki özüt miktarı 0,5 mg/mL olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi.

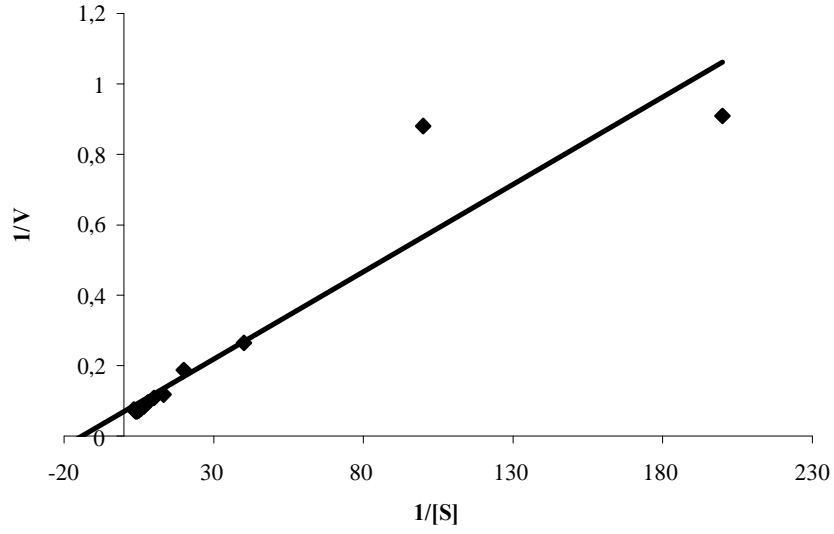


Şekil 12. *T. terreum* için enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi

### 3.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

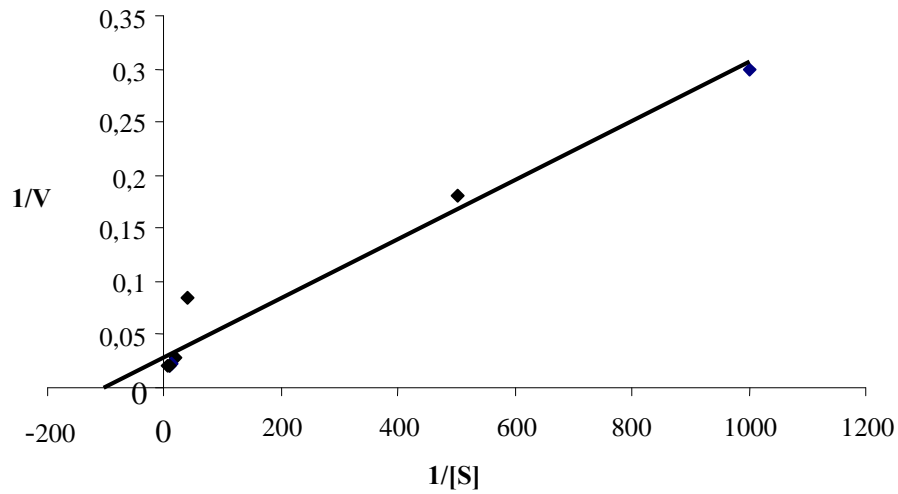
Daha önceden belirlenen optimum protein miktarında, *p*NPB substratının nihai konsantrasyonları *T. terreum* için 0,005–0,150 mM aralığında *A. vaginata* var. *vaginata* için ise 0,025–0,300 mM aralığında olacak şekilde değişen konsantrasyonlarda aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her bir mantar numunesindeki esterolitik enzimler için optimum substrat konsantrasyonları belirlendi.  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin belirlenmesi için de Lineweaver –Burk grafikleri çizildi.

*A. vaginata* var. *vaginata* için elde edilen sonuçlar incelendiğinde 0,225 mM substrat konsantrasyonuna kadar aktivitede artış olduğu daha sonraki konsantrasyonlarda ise aktivitenin sabit kaldığı gözlemlendi. Bundan sonraki çalışmalarda optimum substrat konsantrasyonu 0,225 mM olacak şekilde kullanıldı. Elde edilen değerlerden çizilen Lineweaver –Burk eğrisinden  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırası ile 14,20 U/L ve 0,071 mM olarak bulundu (Şekil 13).



Şekil 13. *A. vaginata* var. *vaginata* için esteraz/lipaz aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi

*T. terreum* için ise elde edilen sonuçlar incelendiğinde 0,100 mM substrat konsantrasyonuna kadar aktivitede artış olduğu daha sonraki konsantrasyonlarda ise aktivitenin sabit kaldığı gözlemlendi. Bundan sonraki çalışmalarda optimum substrat konsantrasyonu 0,100 mM olacak şekilde kullanıldı. Elde edilen değerler kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırası ile 34,6 U/L ve 9,6  $\mu$ M olarak bulundu (Şekil 14).



Şekil 14. *T. terreum* esteraz/lipaz aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi

### 3.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonu Etkisi

Esterolitik aktivite üzerinde metal iyonların etkisini incelemek için  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  ve  $\text{Al}^{+3}$  iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. Optimum şartlarda nihai konsantrasyonları 10 mM olan metal iyonlarının esterolitik aktivite üzerine etkileri incelendi (Tablo 6 ve Tablo 7). Kontrol olarak metal iyonu içermeyen reaksiyon karışımları kullanıldı ve bu karışım için gözlenen aktivite değeri % 100 kabul edildi.

*A. vaginata* var. *vaginata* için  $\text{K}^+$  ve  $\text{Al}^{+3}$ ; *T. terreum* için ise  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  varlığında enzim aktiviteleri hemen hemen hiç değişmezken diğer metallerin varlığında ise her iki mantar için enzim aktivitelerinde belirli oranlarda azalma gözlenmiştir.

Tablo 6. *A. vaginata* var. *vaginata* esteraz/lipaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

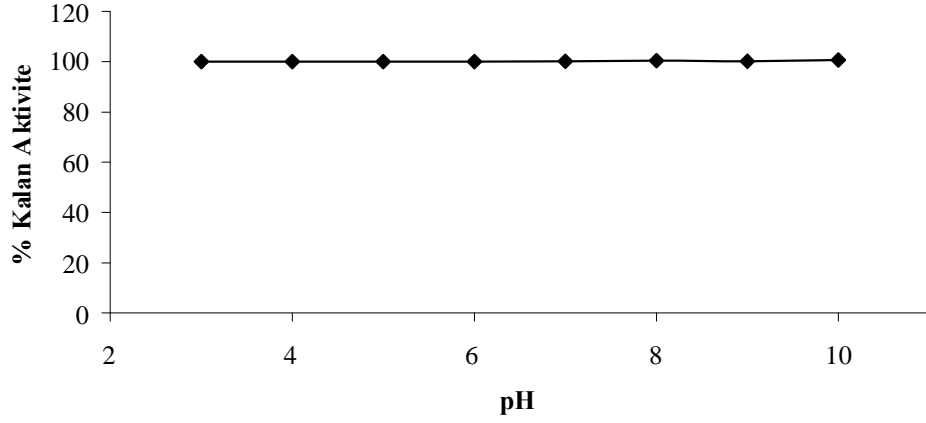
Metal İyonu (10mM)	% Kalan Aktivite	Metal İyonu (10mM)	% Kalan Aktivite
Standart	100	$\text{Hg}^{+2}$	24,39
$\text{K}^+$	100,44	$\text{Cu}^{+2}$	81,59
$\text{Na}^+$	88,47	$\text{Cd}^{+2}$	77,38
$\text{Li}^+$	79,82	$\text{Co}^{+2}$	84,47
$\text{Ni}^{+2}$	66,74	$\text{Ca}^{+2}$	74,50
$\text{Mn}^{+2}$	88,69	$\text{Al}^{+3}$	99,77

Tablo 7. *T. terreum* esteraz/lipaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

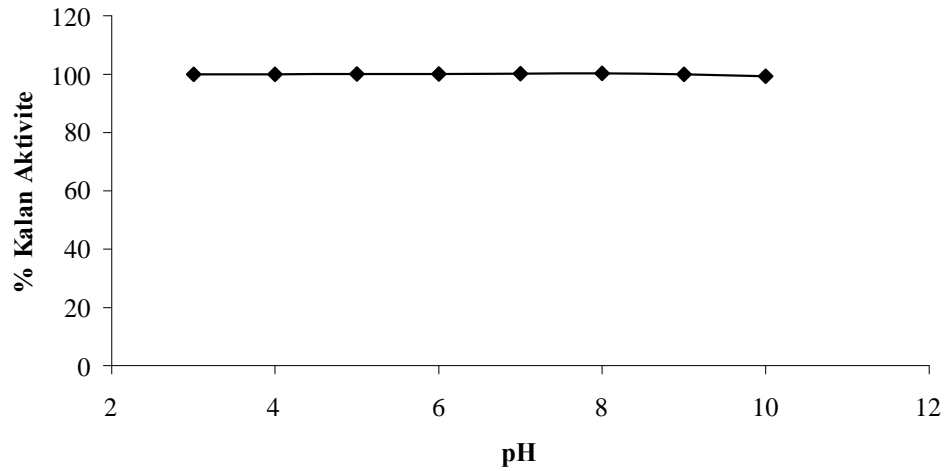
Metal İyonu (10mM)	% Kalan Aktivite	Metal İyonu (10mM)	% Kalan Aktivite
Standart	100	$\text{Hg}^{+2}$	75,46
$\text{K}^+$	99,56	$\text{Cu}^{+2}$	80,88
$\text{Na}^+$	99,26	$\text{Cd}^{+2}$	36,50
$\text{Li}^+$	102,70	$\text{Co}^{+2}$	27,12
$\text{Ni}^{+2}$	85,71	$\text{Ca}^{+2}$	85,25
$\text{Mn}^{+2}$	63,20	$\text{Al}^{+3}$	67,89

### 3.8. pH Kararlılığı

Özütler farklı pH'lardaki tamponlarla belirli oranlarda karıştırıldı. Elde edilen özüt-tampon karışımlarından uygun miktarlarda alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı ve aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Ayrıca özüt-tampon karışımları 4 °C'de, 24 saat inkübe edildikten sonra bu karışımlardan da uygun miktarlarda alınarak aktivite tayinleri yapıldı. Her iki karışımdan elde edilen değerler karşılaştırılarak % kalan aktivite-pH eğrisi çizildi. Elde edilen grafiklerden, her iki mantar numunesinde esterolitik aktivite gösteren enzimlerin 3,0–10,0 arasındaki pH değerlerinde oldukça kararlı oldukları gözlenmiştir (Şekil 15 ve Şekil 16).



Şekil 15. *A. vaginata* var. *vaginata* için pH kararlılık eğrisi

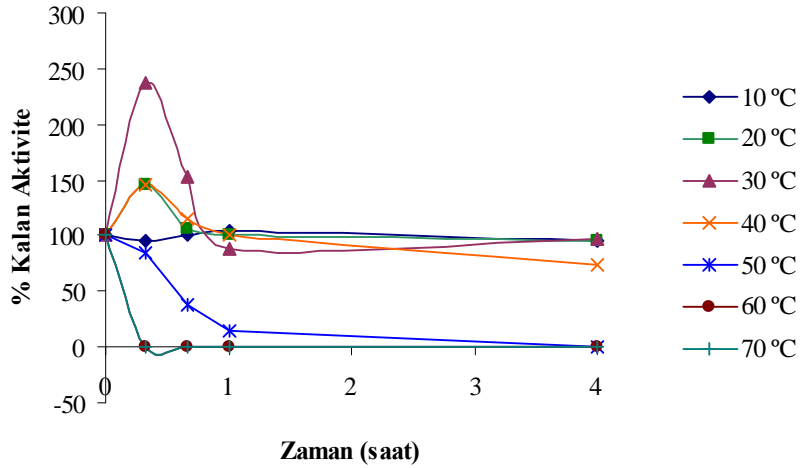


Şekil 16. *T. terreum* için pH kararlılık eğrisi

### 3.9. Isıl Kararlılık

*A. vaginata* var. *vaginata* ve *T.terreum* numunelerindeki esterolitik aktiviteden sorumlu enzimlerin ısıl kararlılığını belirlemek için; özütlerden alınan örnekler su banyosunda, 10–90 °C sıcaklık aralığında 10 °C'lik artışlarla ve her bir sıcaklıkta ayrı ayrı 20 dak, 40 dak, 1 saat ve 4 saat olmak üzere bekletildi. Bekletilen bu örneklerden uygun hacimlerde alınarak reaksiyon karışımları hazırlandı ve aktivite tayinleri yapıldı. Kontrol olarak ise, herhangi bir sıcaklıkta hiç bekletilmeyen özütten hazırlanan reaksiyon karışımında aktivite tayini gerçekleştirildi. Daha sonra kontrol reaksiyon karışımının aktivite değeri ile elde edilen değerler karşılaştırılarak % kalan aktivite-zaman grafiği çizildi.

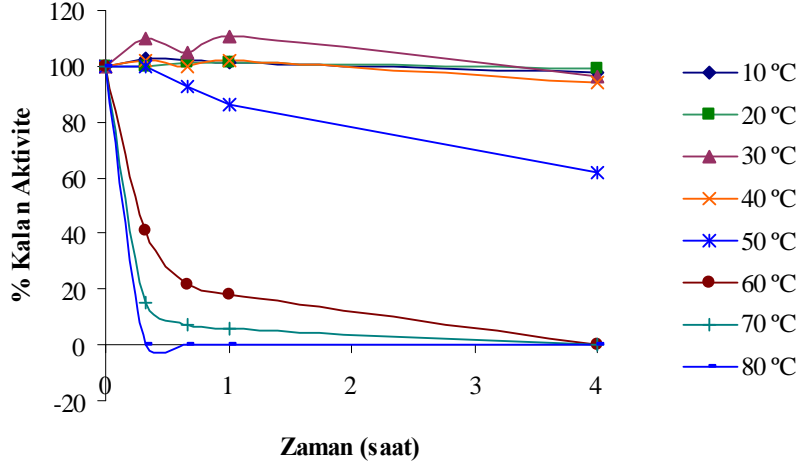
*A. vaginata* var. *vaginata*'dan hazırlanan özütte en yüksek aktivite değerine 30 °C'de ulaşılmıştır. İlk 20 dakika sonunda aktivite % 238 oranında artarken, 40 ve 60 dakikalık bekleme sürelerinde azalmaya başlamış fakat kontrol deneyine nazaran önemli bir azalış söz konusu olmamıştır. Aktivite genel anlamda 10–40 °C aralığında oldukça yüksek olup zaman ilerledikçe fazla bir azalma görülmemiştir. 50 °C'de ise aktivite zamanla azalmakta ve 60 dakikadan sonra sıfıra düşmektedir. 60–70 °C aralığında ise aktivitenin kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. *A. vaginata* var. *vaginata* için ısıl kararlılık eğrisi

*T. terreum*'dan hazırlanan özütte 10–40 °C sıcaklık aralığında kontrol deneyine nazaran önemli bir azalış olmamıştır. 50 °C'de ise aktivite zamanla azalmakta ve 4 saatlik bekleme süresi sonucunda ise % 62'ye düşmektedir. 60–70 °C'de ise aktivite zamanla

azalmakta ve 4 saatlik bekleme süresi sonucunda aktivite sıfıra düşmektedir. 80 °C’de ise aktivitenin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. *T. terreum* için ısıl kararlılık eğrisi

### 3.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

$\text{NaN}_3$ , EDTA, PMSF ve DTT kimyasallarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Bunun için, bu kimyasalların her birinden farklı miktarlarda içeren bir seri reaksiyon karışımı hazırlanarak aktivite tayinleri yapıldı. Kontrol için, bu kimyasalları içermeyen reaksiyon karışımları kullanılarak gözlenen aktivite değeri % 100 olarak kabul edildi. Elde edilen veriler varlığında % kalan aktivite-konsantrasyon grafiği çizilerek, aktivitenin % 50'sinin kaybedildiği nokta  $I_{50}$  değeri olarak belirlendi. Tablo 8'de *A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* için bu kimyasalların  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.

Tablo 8. *A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* için  $I_{50}$  değerleri

Kimyasallar	<i>A. vaginata</i> var. <i>vaginata</i> $I_{50}$ (mM)	<i>T. terreum</i> $I_{50}$ (mM)
EDTA	47,7	44,5
$\text{NaN}_3$	6,6	27,6
DTT	0,7	0,7
PMSF	2,8	0,9



#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Amanita vaginata* var. *vaginata* ve *Tricholoma terreum* mantar numunelerinden hazırlanan özütlerde esterolitik aktiviteye sahip enzimlerin karakterizasyonu gerçekleştirildi.

*A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* mantar numunelerinden hazırlanan enzim özütlerinde esterolitik aktiviteden sorumlu enzimlerin varlığını ortaya koyabilmek için doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve gözlenen bantların  $R_f$  değerleri hesaplandı (Şekil 6). *A. vaginata* var. *vaginata* için  $R_f$  değerleri 0,47 ve 0,61 olarak, *T. terreum* için ise 0,42 ve 0,47 olarak bulundu. Her iki mantar numunesinde de iki bandın gözlenmesi, enzim özütlerinin esterolitik aktiviteden sorumlu izoenzimlerin veya substratın hidrolizini sağlayacak farklı enzim aktivitelerinin olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır. Benzer sonuçlara *Lycoperdon perlatum* mantar numunesinde yapılan esterolitik aktivite karakterizasyonu çalışmasında da ulaşılmıştır. Bu mantar numunesi ile gerçekleştirilen doğal PAGE sonucu  $R_f$  değerleri 0,34 (baskın), 0,39 (soluk), 0,52 (baskın) ve 0,39 (soluk) olarak hesaplanan dört bandın varlığı gözlenmiş ve izoenzimlerin varlığından söz edilmiştir (Camadan, 2006).

Özütlerin sahip olduğu esterolitik aktivitenin substrat özgünlüğünü ortaya koymak için *p*NP esterleri (*p*NPA, *p*NPB, *p*NPP ve *p*NPL) substrat olarak kullanıldı. Yapılan denemeler sonucunda her iki mantar numunesi için de *p*-nitrofenilbutirat (*p*NPB) varlığında en yüksek hidrolitik aktivite gözlendi (Tablo 4 ve Tablo 5). Bu sonuç özütteki enzimin kısa zincirli esterlerin hidrolizini katalizleyebilen bir esteraz olabileceğini göstermektedir. Benzer sonuçlar *Anaxybacillus gonensis* A4 (Faiz vd., 2007), EM2L8 (Park vd., 2007) gibi farklı organizmalarda yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir.

*A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* mantar numunelerinden hazırlanan özütlerin esterolitik aktivitelerinin pH'ya bağımlılığı incelendiğinde, her iki mantar numunesi için de optimum pH değerinin 8,0 olduğu, ancak *A. vaginata* var. *vaginata*'da pH 5,0'te ilave bir pikin varlığı gözlenmiştir (Şekil 7 ve Şekil 8). İki pik gözlenmesi, çalışmanın ham özütten gerçekleştirilmesi nedeniyle farklı özellikler gösteren izoenzimlerin veya benzer reaksiyonları katalizleyebilen farklı enzimlerin varlığından kaynaklanabilir. Bu sonuç, doğal elektroforezde elde edilen profili de desteklemektedir. Farklı çalışmalarda esteraz enzimlerinin sahip olduğu optimum pH değerleri *Mucor* sp. için 7,0 (Abbas vd., 2002),

*Cucurbita pepo* için 8,0 (EII) (Fahmy vd., 2007), *Escherichia coli* için 7,0 (Kim vd., 2006), EM2L8 için 10,0-11,0 (Park vd., 2007) ve *Bacillus coagulans* BTS-3 için 7,5 (Pahujani vd., 2007) olarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalara dayanarak, karakterize edilen esteraz enzimlerinin optimum pH değerinin çoğunlukla 7,0–8,0 aralığında olduğu söylenebilir. Her iki mantar numunesi için pH kararlılığı incelendiğinde, pH'ın 3,0–10,0 arasında sabit olduğu gözlenmiştir (Şekil 15 ve Şekil 16). Bu sonuç, aktif bölgede hidrofobik amino asitlerin varlığının bir göstergesi olabilir. Palmiye meyvesinden izole edilen *Mucor* sp. ile gerçekleştirilen esterolitik aktivite çalışmasında, enzimin pH kararlılığını 24 saat sonunda 3,0 ve 9,0'da tamamen kaybettiği, diğer değerlerde ise aktivitede % 20 oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Abbas vd., 2002). *Bacillus megaterium*'da yapılan çalışmada ise, esteraz enziminin pH kararlılığının 6,0 ile 9,0 arasında sabit olduğu gözlenmiştir (Jung vd., 2003). Bu sonuçlar, mantar numunelerindeki esterolitik aktiviteden sorumlu enzimlerin geniş bir pH aralığında aktivitelerini kaybetmediğini göstermektedir.

Özütlerde esterolitik aktiviteden sorumlu enzimlerin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde her iki mantar numunesindeki enzimler için de optimum sıcaklığın 30–40 °C arasında olduğu gözlenmiştir (Şekil 9 ve 10). Tespit edilen bu sıcaklık aralığı, makromantarlar veya bitki dokularından elde edilen enzimler için uygun değerlerdir. Farklı organizmalarla yapılan çalışmalarda; *C. pepo* esteraz Elc ve EII'de optimum sıcaklık 40 °C (Fahmy vd., 2007), *Pseudomonas fluorescens*'da optimum sıcaklık 43 °C (Khalameyzer vd., 1999) ve *Stophylococcus simulans*'da optimum sıcaklık 37 °C (Sayari vd., 2001) olarak tespit edilmiştir. *A.vaginata* var. *vaginata*'nın ısıl kararlılığı incelendiğinde en yüksek aktivite değerine 30 °C'de ulaşılmıştır. Bu sıcaklıkta aktivitenin ilk 20 dakikada yaklaşık 2,5 kat artması oldukça dikkat çekicidir. *T. terreum* için yapılan ısıl kararlılığı denemesinde ise 10–40 °C aralığında önemli bir azalış olmadığı ve daha sonraki sıcaklık denemelerinde ise her iki mantar için de aktivitenin zamanla azalarak sifıra düştüğü gözlenmiştir (Şekil 17 ve Şekil 18). *E. coli*'de gerçekleştirilen çalışmalarda enzimin ısıl kararlılığı 25-45 °C aralığında incelenmiş ve 3 saat sonunda 25-30 °C arasında aktivitenin % 80 korunduğu, 2 saat sonunda 40 °C'de ise aktivitenin % 50 azaldığı gözlenmiştir (Kim vd., 2006). *C. pepo* esteraz Elc ve EII ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise, 15 dakika sonunda sırasıyla 55 °C ve 50 °C'de aktivitelerin % 50 oranında azaldığı gözlenmiştir. 70 °C'de 15 dakika sonunda ise *C. pepo* esteraz EII'nin aktivitesi tamamen

kaybolmuş, *C. pepo* esteraz Elc'nin ise aktivitesi % 34 oranında korunmuştur (Fahmy vd., 2007).

Protein miktarı sabit tutularak *pNPB* varlığında gerçekleştirilen aktivite tayinlerinden elde edilen değerler kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri *A. vaginata* var. *vaginata* için sırasıyla 14,2 U/L ve 0,071 mM, *T. terreum* için ise 34,6 U/L ve 9,6  $\mu$ M olarak bulundu (Şekil 13 ve Şekil 14). Yapılan diğer bazı çalışmalar incelendiğinde, *pNP* esterleri mevcudiyetinde  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırası ile *Geobacillus thermoleovorans* için 6,74 mM ve 5350  $\mu$ mol/dak.mg (Soliman vd., 2007), *Bacillus coagulans* BTS-3 için 4 mM ve 10  $\mu$ mol/dak/ml (Pahujani vd., 2007), *E. coli* için 1mM ve 63,7 U/mg (Kim vd., 2006), *C. pepo* esteraz Elc için 1,22 mM ve *C. pepo* esteraz Ell için 1,56 mM (Fahmy vd., 2007) olarak bulunmuştur.

*A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* mantar numunelerinden elde edilen özütlerin sergilediği enzimatik aktivitenin protein konsantrasyonuna bağımlılığı incelendiğinde, *A. vaginata* var. *vaginata* için 0,35 mg/mL, *T. terreum* için 0,5 mg/mL değerlerinde optimuma ulaştığı ve bu değerlerden sonra aktivitenin sabit kaldığı, yani esterolitik aktivitenin enzim miktarından bağımsız olduğu gözlemlendi (Şekil 11 ve Şekil 12). Sonuç olarak maksimum protein konsantrasyonuna ulaştıktan sonra *pNPB*'nin parçalanma hızının protein miktarından bağımsız bir şekilde gerçekleştiği söylenebilir. Esteraz/lipaz gibi hidrolaz sınıfı bir enzim olan depolimerazlarla yapılan bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, substratın hidrolizi maksimum bir değere ulaştıktan sonra artık hidrolizlenme hızının protein miktarından bağımsız olarak gerçekleştiği belirtilmiştir (Tomasi vd., 1996; Çolak ve Güner, 2004)

Birçok enzim, aktivitesi için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu sebeple metal iyonları proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). *A. vaginata* var. *vaginata* için  $K^+$ ,  $Al^{+3}$ ; *T. terreum* için de  $Na^+$ ,  $K^+$  ve  $Li^+$  varlığında enzim aktiviteleri hemen hemen hiç değişmezken, diğer metallerin varlığında ise aktivitelere belirli oranlarda azalmalar gözlemlendi (Tablo 6 ve Tablo 7). *A. vaginata* var. *vaginata*'da en düşük aktivite  $Hg^{+2}$  varlığında, *T. terreum*'da ise  $Co^{+2}$  varlığında gözlemlendi. Esteraz aktivitesi, divalent metal iyonları ve iyonik olmayan

yüzeş aktif maddeleri gibi bazı faktörler tarafından sıkça etkilenmektedir (Krebsfanger vd., 1998; Liu vd., 2000; Choi vd., 2004).

Her iki mantar numunesi için de  $\text{NaN}_3$ , EDTA, PMSF ve DTT'nin her birinden farklı miktarlar içeren bir seri reaksiyon karışımı hazırlanarak  $I_{50}$  değeri belirlendi (Tablo 8 ve Tablo 9).  $I_{50}$  değerleri EDTA,  $\text{NaN}_3$ , DTT ve PMSF için *A. vaginata* var. *vaginata*'da sırasıyla 47,7 mM, 6,6 mM, 0,7 mM ve 2,8 mM olarak; *T. terreum*'da ise sırasıyla 44,5 mM, 27,6 mM, 0,7 mM ve 0,9 mM olarak bulundu.  $I_{50}$  değerleri incelendiğinde her iki mantar numunesi için yaklaşık 44–47 mM'lık yüksek bir EDTA konsantrasyonunun enzim aktivitesini % 50 azalttığı gözlenmiştir. EDTA'nın artan konsantrasyonuyla birlikte aktivitenin de azaldığı tespit edildi. Ayrıca  $\text{NaN}_3$  varlığında da aktivitenin azaldığı gözlendi. *Ralstonia* sp. MI'de yapılan bir çalışmada esteraz enziminin farklı EDTA konsantrasyonlarındaki aktivite profili incelenmiştir. 0,1, 1 ve 10 mM EDTA varlığında % kalan aktiviteler sırasıyla 105, 101 ve 85 olarak tespit edilmiştir (Quyen vd., 2007). DDT mevcudiyetinde aktivitenin azaldığı ve  $I_{50}$  değerlerinin oldukça küçük değerler olduğu gözlendi. Disülfür köprülerini indirgeyen DDT'nin (Smialowski-Fleter vd., 2000) aktiviteyi azaltması, disülfür köprülerinin aktivite için gerekli olduğu sonucunu ortaya koyabilir. Serin birimlerini süfolayan ve enzim aktivitesini inhibe eden PMSF (Cornec vd., 1998) ile yapılan çalışmalarda da aktivite azalmış ve  $I_{50}$  değerleri oldukça küçük konsantrasyonlar olarak tespit edildi. Bu inhibisyon serinin katalitik grubun bir üyesi olduğu sonucunu ortaya koyabilir (Teo vd., 2003). Benzer bir çalışmada *Ralstonia* sp. MI esterazının farklı PMSF konsantrasyonlarındaki aktivite profili incelenmiştir. 0,1, 1 ve 10 mM PMSF varlığında % kalan aktiviteler sırasıyla 77, 80 ve 17 olarak tespit edilmiştir (Quyen vd., 2007).

Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, bu iki mantar numunesinde esterolitik aktivitenin mevcudiyeti ortaya konulmuştur. Her iki mantar birbirine fazla benzemeyen aktivite profilleri sergilemiştir. Her iki özütte de kısa karbon zincirli bir substrat olan *pNPB* mevcudiyetinde aktivitenin maksimum olması ve uzun karbonlu substratlar varlığında aktivitenin az olması veya hiç olmaması karakterize edilen enzimlerin gerçek esteraz sınıfı enzimler olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

## 5. ÖNERİLER

Enzimlerin endüstride en çok kullanıldıkları alan hiç şüphesiz organik sentezlerdir. Sentez reaksiyonları genellikle yüksek basınç, yüksek sıcaklık ve organik çözücüler mevcudiyetinde gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla sentez reaksiyonlarında kullanılacak olan enzimlerin, yukarıda saydığımız şartlarda kararlı olmaları ve katalitik fonksiyonlarını yüksek oranda gerçekleştirilmeleri gerekmektedir. Gıda, deri, deterjan, ilaç gibi birçok sanayide esteraz/lipaz enzimi kullanılmaktadır. *A. vaginata* var. *vaginata* mantar numunesinden hazırlanan özütte gerçekleştirilen ısıl kararlılık denemesinde, 30 °C’de aktivite de büyük bir artış olduğu dikkati çekmektedir. *A. vaginata* var. *vaginata* ve *T. terreum* mantar numunelerindeki esteraz enzimlerinin geniş bir optimum sıcaklık aralığına sahip olmaları bir avantaj olsa da, yüksek sıcaklıklarda düşük oranda ısıl kararlılığa sahip olmaları bir dezavantajdır. Her iki mantar numunesindeki enzimlerin aktivitelerinin geniş bir pH aralığında sabit kalması da önemli bir özelliktir. Ayrıca *T. terreum* mantar numunesinin 12 karbonlu yağ asidini içeren pNPL varlığında aktivitesinin % 60 civarında olması, enzimin bu substratı da kullanabildiğini göstermektedir. Özellikle uzun zincirli yağ asitlerinin hidrolizi esteraz sınıfı enzimlerde aranan bir özellik olduğundan, bu veri dikkat çekicidir.

Bundan sonra yapılabilecek olan çalışmalar, ham özütte karakterize edilmiş olan ve mantarlar tarafından oldukça fazla ekspres edilen bu enzimlerin saflaştırılması ve ileri derecede karakterizasyonu olabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V. ve Comeau, L., 2002. Isolation and Characterization of Extracellular Lipase from *Mucor* sp Strain Isolated from Palm Fruit, Enzyme Microb. Technol., 31, 968-975.
- Balcao, V.M., Paiva, A.L. ve Malcata, F.X., 1996. Bioractors with Immobilized Lipases: State of the Art, Enzyme Microb. Technol., 18, 392-416.
- Bano, M.C., González-Navarro, H. ve Abad, C., 2003. Long-Chain Fatty acyl-CoA Esters Induce Lipase Activation in the Absence of a Water-Lipid Interface, BBA-Mol. Cell Biol. L., 1632, 55-61.
- Ben-Shem, A., Fass, D. ve Bibi, E., 2007. Structural Basis for Intramembrane Proteolysis by Rhomboid Serine Proteases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 462-466.
- Benjamin, S. ve Ashok, P., 2000. Panorama of Lipases in Bioindustry, Biotech. J. Int., 11-14.
- Blackwell, W. H., 1988. Pisonous and Medicinal Plant, Prentice Hall, New Jersey.
- Bock, W.C., Katz, A.G., Markham, G.D. ve Glusker, J.P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparasion of the Divalent Ions, J. Am. Chem. Soc., 121, 7360-7372.
- Bornscheuer, U.T., 2002. Microbial Carboxyl Esterases: Classiffication, Properties and Application in Biocatalysis, FEMS Microbiol.Rev., 26, 73-81.
- Bourquelot, E. ve Bertrand, A., 1895. A re-examination of the Raper's Scheme: Cyclodopa as a Biological precursor of eumelanin, C. R. Soc. Biol., 47, 582-584.
- Boztok, K., 1990. Mantar Üretimi Tekniği, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 489, 168, İzmir.
- Breitenbach, J. ve Kränzlin, F., 1984-2000. Fungi of Switzerland, vols.1-5, Verlag Mykologia.
- Camadan, Y., 2006. *Lycoperdon perlatum* Mantarlarından Hazırlanan Özütte Esterolitik Aktivitenin Tayini ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Choni, Y. J., Miguez, C.B. ve Lee, B.H., 2004. Characterization and Heterologous Gene Expression of a Novel Esterase from *Lactobacillus casei* CL96, Appl. Environ. Microbiol., 70, 3213-3221.
- Colak, A. ve Güner, S., 2004. Polyhydroxyalkanoate Degrading Hydrolase-like Activities by *Pseudomonas* sp. Isolated from Soil, Int. Biodeter. Biodegr., 53, 103-109.

- Cornec, L., Robineau, J.L., Dietrich, J. ve Barbier G., 1998. Thermostable Esterases Screened on Hyperthermophilic Archaeal and Bacterial Strains Isolated from Deep-Sea Hyperthermal Vents: Characterization of Esterase Activity of a Hyperthermophilic Archaeum, *Pyrococcus abyssi*, J. Mar. Biotechnol., 6, 104-110.
- Çakır, Ş. ve Yamanel, Ş., 2005. Böceklerde İnektisidlere Direnç, Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, 6, 1, 21-29.
- Derewenda, U., Brzozowski, A.M., Lawson, D.M. ve Derewenda, Z.S., 1992. Catalysis at the Interface: the Antomy of a Conformational Change in a Triglyceride Lipase, Biochemistry, 31, 1532–41.
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Dodson, G. G., Yamaguchi, S., Haas, M.J. ve Derewenda, Z.S., 1994. An Unusual Buried Polar Cluster in a Family of Fungal Lipases, Nat Struct Biol, 1, 36-47.
- Desnuelle, P., 1972. The lipases; the enzymes, 37. New York, Academic press, 575.
- Di Tusa, C.A., Christensen, T., Mc Call, K.A., Fierke, C.A. ve Toone, E.J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding 1.Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 5338-5344.
- Eggert, T., Pouderoyen, G.V., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, E., Dijkstra, B.W. ve Jeager, K., 2002. Biochemical Properties and Three Dimensional Structures of Two Extracellular Lipolytic Enzymes from *Bacillus Subtilis*, Colloids Surface B., 26, 37-46.
- Faiz, Ö., Colak, A., Saglam, N., Canakçi, S. ve Beldüz, A.O., 2007. Determination and Characterization of Thermostable Esterolytic Activity from a Novel Thermophilic Bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4, J. Biochem., 40, 4, 588-594.
- Fahmy, A.S., Abo-Zeid, A.Z., Mohamed, T.M., Ghanem, H.M., Borai, İ.H., Mohamed, S.A., 2007. Characterization of Esterases from *Cucurbita pepo* cv. "Eskandrani", Bioresource Technology, 99, 437–443.
- Fojan, P., Jonson, P.H, Petersen, M.T.N. ve Petersen, S.B., 2000. What Distinguishes an from Esterase a Lipase: a Novel Structural Approach, Biochimie, 82, 1033–1041.
- Fukumoto, J., Iwai, M. ve Tsujisaka, Y., 1963. Studies on Lipase I. Purification and Crystallisation of a Lipase Secreted by *Aspergillus niger*, J. Gen .Appl. Microbiol., 9, 353-361.
- Güner, S., 2007. Biyokimya-I, KTÜ Matbaası, 1, Trabzon.
- Godfrey, T. ve West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology, In Industrial Enzymology, 2. baskı, New York.

- Hemila, H., Koivula, T.T. ve Palva, I., 1994. Hormone-sensitive Lipase is Closely Related to Several Bacterial Proteins, and Distantly Related to Acetylcholinesterase and Lipoprotein Lipase: Identification of a Superfamily of Esterases and Lipases, Biochim. Biophys. Acta, 1210, 249-253.
- Hespell, R.B. ve O'Bryan-Shah, P.J., 1988. Esterase Activities in *Butyrivibrio fibrisolvens* Strains, Appl. Environ. Microbiol., 54, 1917-1922.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sondra, L. ve Comeau, L.C., 2000. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from Thermophilic *Rhizopus oryzae* Strain Isolated from Palm Fruit, Enzyme Microb. Tech., 26, 421-430.
- Jaeger, K.E. ve Reetz, M.T., 1998. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology, TIBTECH, 16, 396-403.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Van Heuvel, M. ve Misset, O., 1994. Bacterial lipases, FEMS Microbiol.Rev., 15, 29-63.
- Jung, Y.J., Lee, J.K., Sung, C.G., Oh, T.K. ve Kim, H.K., 2003. Nonionic Detergent Induced Activation of an Esterase from *Bacillus megaterium* 20-1, J. Mol. Catal. B-Enzym., 26, 223-229.
- Khalameyzer, V., Fischer, I., Bornscheuer, U.T. ve Altenbuchner, J., 1999. Screening, Nucleotide Sequence, and Biochemical Characterization of an Esterase from *Pseudomonas fluorescens* with High Activity towards Lactones, Appl. Environ. Microbiol., 477-482.
- Khmelnitsky, Y.L., 1999. Biocatalysis in Nonaqueous Solvents, Curr. Opin. Chem. Biol., 3, 47.
- Kim, Y.J., Choi, G.S., Kim, S.B., Yoon, G.S., Kim, Y.S. ve Ryu, Y.W., 2006. Screening and Characterization of a Novel Esterase from a Metagenomic Library, Protein Expression Purif., 45, 315-323.
- Kolcuoğlu, Y., 2005. Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Macrolepiota mastoidea*'da Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Krebsfanger, N., Schierholz, K. ve Bornscheuer, U.T., 1998. Enantioselectivity of a Recombinant Esterase from *Pseudomonas fluorescens* towards Alcohols and Carboxylic Acids, J. Biotechnol., 60, 105-111.
- Lambrechts, C. ve Galzy, P., 1995. Esterase Activities of *Brevibacterium* sp. R312 and *Brevibacterium Linens* 62, Biosci. Biotechnol.Biochem., 59, 1464-1471.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. ve Pyun, Y., 1999. Isolation and Characterization of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiol. Lett., 179, 393-400.



- Lesuisse, E., Schanck, K. ve Colson., C., 1993. Purification and Preliminary Characterization of the Extracellular Lipase of *Bacillus subtilis* 168, an Extremely Basic pH- tolerant Enzyme, Eur. J. Biochem., 216, 155–160.
- Liu, Y.Y., Xu, J.H. ve Hu, Y., 2000. Enhancing Effect of Tween-80 on Lipase Performance in Enantioselective Hydrolysis of Ketoprofen Ester, J. Mol.Catal. B: Enzymatic. 10, 523–529.
- Long., R. M., Satoh., H., Martin, B. M., Kimura, S., Gonzalez, F. J. ve Pohl, L. R., 1988. Rat Liver Carboxylesterase: cDNA Cloning, Sequencing, and Evidence for a Multigene Family, Biochem. Biophys. Res. Comm., 156, 866–873.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951. Protein Mesurement with the Folin Phenol Reagent, J.Biol.Chem., 193, 265-375.
- Manco, G., Adinolfi, E., Pisani, F.M., Carratore, V. ve Rossi, M., 1997. Identification of an Esterase from *Bacillus acidocaldarius* with Sequence Similarity to a Hormone Sensitive Lipase Subfamily, Prot.Pept.Lett., 4,375–382.
- Meghji, K., Ward, O.P. ve Araujo, A., 1990. Production, Purification and Properties of Extracellular Carboxyl Esterases from *Bacillus subtilis* NRRL 365, Appl. Environ. Microbiol., 56, 3735–3740.
- Nakagawa, A., Tsujita, T. ve Okuda, H., 1984. Purification and Some Properties of Intracellular Esterase from *Pseudomonas fluoresce*, J. Biochem., 95, 1047-1054.
- Nishizawa, M., Gomi, H. ve Kishimoto, F., 1993. Purification and Some Properties of Carboxylesterase from *Arthrobacter globiformis*; Stereoselective Hydrolysis of Ethyl Chrysanthemate, Biosci. Biotechnol. Biochem., 57, 594-598.
- Okumura, S., Iwa, M. ve Tsujisaka, Y., 1983. Studies on Microbial Esterases 2. Properties and Substrate Specificities of Four Esterases from *Aspergillus niger* NRLL-337, Agric.Biol.Chem., 47, 1869-1872.
- Ollis, D.L., Shea, E., Cygler, M.B., Dijkstra, B. ve Frolow, F., 1992. The  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold, Protein Eng., 5, 197–211.
- Osorio, N.M., Ferreira-Dias, S., Gusmao, J.H. ve Fonseca, M.N.R., 2001. Response Surface Modeling of the Pruduction of u-3 Polyunsaturated Fatty Acids-Enriched Fats by a Commercial Immobilized Lipase, J. Molec. Cat. B. 11, 677.
- Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G. ve Gupta, R., 2007. Glutaraldehyde Activation of Polymer Nylon-6 for Lipase Immobilization: Enzyme Characteristic and Stability, Bioresource Technology, Baskıda.
- Park, H.J., Ho Jeon, J., Kang, S.G., Lee, J.H., Lee, S.A ve Kim, H.K., 2007. Functional Expression and Refolding of New Alkaline Esterase EM2L8 from Deep-Sea Sediment Metagenome, Protein Expression Purif., 52, 340-347.

- Phillips, R., 1981. Mushrooms and other fungi of Great Britain and Europe. Milan, New Interlitho S.p.A.
- Rua, M.L., Díaz- Maurino, T., Fernández, V.M., Otero, C. ve Ballesteros, A. 1993. Purification and Characterization of Two Distinct Lipases from *Candida cylindracea*, Biochim.Biophys. Acta, 1156, 181–189.
- Quyen, D.T., Dao, T.T. ve Nguyen, S.L.T., 2007. A Novel Esterase From *Ralstonia* sp. M1: Gene Cloning, Sequencing, High-Level Expression And Characterization, Protein Expression Purif., 51, 133-140.
- Sağlam Ertunga, N., 2006. Termofilik *Anoxybacillus gonensis* G2 Suşunun Fruktöz-1,6-bisfosfat Aldolaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Sayari, A., Agrebi, N., Jaoua, S. ve Gargouri, Y., 2001. Biochemical and Molecular Characterization of *Staphylococcus simulans* Lipase, Biochimie, 83, 863-871.
- Schmitt-Rozieres, M., Vanot, G., Deryis, V. ve Comeau, L.C., 1999. Borago Officinalis Oil: Fatty Acid Fractionation by Immobilized *Candida rugosa* Lipase, J. Amer. Oil Chem. Soc., 76, 557.
- Schmid, R.D., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes With Attractive applications, Angew Chem Int Ed, 37, 1608–10.
- Schmid, R.D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 37, 1608–1633.
- Sesli, E., 1994. Trabzon Yöresinde Yetişen Makromantralar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma, Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C., 2001. Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases, Biotechnol. Adv., 19, 627 -662.
- Sherwani, M.K. ve Fixter, L.M., 1989. Multiple Forms of Carboxylesterase Activity in *Acinetobacter calcoaceticus*, FEMS Microbiol.Lett., 58, 75-80.
- Shum, A.C. ve Markovetz, A.J., 1974. Purification and Properties of Undecyl Acetate Esterase from *Pseudomonas cepacia* Grown on 2-tridecanone, J. Bacteriol., 118, 880–889.
- Smialowski-Fleter, S., Moulin, A., Villard, C. ve Puigserver, A., 2000. Structure-Function Relationships in the Carboxylic-Ester-Hydrolase Superfamily Disulfide Bridge Arrangement in Porcine Intestinal Glycerol-Ester Hydrolase, Eur. J. Biochem., 267, 2227-2234.
- Soliman, N.A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y.R., Schmid, R.D. ve Lange, S., 2007. Molecular Cloning And Characterization Of Thermostable Esterase And Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN Isolated from Desert Soil In Egypt, Process Biochemistry, 42, 1090-1100.

- Sugaira, M., Oikawa, T., Hirano, K. ve Inukai, T., 1997. Purification Crystallisation, and Properties of Triacylglycerol Lipase from *Pseudomonas fluorescens*, Biochim. Biophys. Acta, 488, 353-358.
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. ve Tominaga, Y., 1992. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*, J. Biochem., 112, 598 – 603.
- Stuer, W., Jaeger, K.E. ve Winkler, U.K., 1986. Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, J. Bacteriol., 168, 1070-1074.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitap Evleri, Genişletilmiş 2. Baskı, İstanbul.
- Teo, J.W.P., Zhang, L. ve Poh, C.L., 2003. Cloning and Characterization of a Novel Lipase from *Vibrio harveyi* Strain AP6, Gene, 312, 181-188.
- Tomasi, G., Scandola, M., Briese, B.H. ve Jendrossek, D., 1996. Enzymatic Degradation of Bacterial Poly(3-hydroxybutirate) Depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*, Macromolecules, 29, 507-513.
- URL-1, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Mantar>, 20.12.2007
- URL-2, [www.biseyogren.com/hakkinda/lipaz/](http://www.biseyogren.com/hakkinda/lipaz/), 20.12.2007
- Van Tilbeurgh, H., Sarda, L., Verger, R. ve Cambillau, C., 1992. Structure of the Pancreatic Lipase  $\tilde{A}$ -Procolipase Complex, Nature, 359, 159–62.
- Van Tilbeurgh, H., Egloff, M.P., Martinez, C., Rugani, N., Verger R. ve Cambillau, C., 1993. Interfacial Activation of the Lipase  $\tilde{A}$ -Procolipase Complex by Mixed Micelles Revealed by X-ray Crystallography, Nature, 362, 814–20.
- Vaughan, M., Berger, J.E. ve Steinberg, D., 1964. Hormone-sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue, J. Biol. Chem., 239, 401–409.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graile, J. ve Haas, M.J., 2000. Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches, J Mol Catal B: Enzymatic, 9, 113–48.
- Wilke, D., 1999. Chemicals from Biotechnology: Molecular Plant Genetics will Challenge the Chemical and Fermentation Industry, Appl. Microbiol. Biot., 52, 135-45.
- Winkler, F. K., D'arcy, A. ve Hunziker, W., 1990. Structure of Human Pancreatic Lipase, Nature, 343, 771–774.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology, İkinci Baskı, Bölüm 3, The Application of Enzymes in Industry, 274–373.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2001–2005 yılları arasında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimini tamamladı. 2005 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına girdi. Yabancı dili İngilizce'dir.