

ÖZET

Doktora Tezi

TERMOFİLİK *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ÜN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Zehra Burcu BAKIR ATEŞLİER

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresindeki çeşitli sıcak su kaynaklarından izole edilerek Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Kültür Stok'larında kayıtlı bulunan 201 adet termofilik bakteri izolatının 43 tanesinin lipolitik aktivite açısından pozitif sonuç verdiği ve bunlardan 22 tanesinin de lipaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Seçilen 22 izolat LB broth ortamında geliştirilerek kantitatif lipaz aktiviteleri belirlenmiş ve HBB 134 19,925 U/mL ile en iyi aktivite gösteren izolat olarak seçilmiştir. HBB 134 izolatının 16S rRNA dizi analizi sonucu en yüksek benzerlik oranı (% 99) *Anoxybacillus flavithermus* ile saptanmıştır. HBB 134 suşu en iyi enzim üretimini karbon kaynağı olarak % 0,5'lik zeytin yağı, azot kaynağı olarak % 0,5'lik pepton içeren enzim üretim ortamında pH 6,50'de ve 45°C'de gerçekleştirmiştir. HBB 134 izolatı optimum koşullarda geliştirildiğinde enzim üretimi logaritmik evrenin başlarında başlamış ve ortasında (12. saat) maksimuma ulaşmıştır. Enzimin büyük oranda hücre içinde olduğu saptanmıştır. HBB 134 izolatından elde edilen lipaz sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile 7,4 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile yaklaşık 64 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin en yüksek aktivitesini pH 9,00'da ve 50°C'de gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin pH 6,00-11,00 arasında geniş bir pH aralığında 24 saat boyunca stabilitesini koruduğu saptanmıştır. Enzim 25, 40 ve 50°C'de 24 saat sonunda aktivitesinin sırasıyla % 100, 92 ve 85'ini korumuştur. Enzimin Km ve Vmax değerleri sırasıyla 83,47 µM ve 500 U/mg olarak bulunmuştur. Gliserol, sorbitol ve mannitolün enzimin sıcaklık stabilitesini artırdığı saptanmıştır. Enzim aseton (% 10), etilasetat (% 10) ve dietileter (% 10, 50) karşısında stabilitesini korumuştur. Enzim triptofan inhibitörü olan NBS ve serin inhibitörü olan PMSF tarafından inhibe edilmiştir. Hg⁺², Fe⁺³, Pb⁺², Al⁺³ ve Zn⁺² enzimi kuvvetle inhibe ederken Li⁺, Na⁺, K⁺ ve NH₄⁺ hafif bir aktivasyona yol açmıştır. Enzim sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat, n-oktil-β-D-glukopiranozit ve CHAPS karşısında aktivite ve stabilitesinin en azından % 60'dan fazlasını korumuştur. Triton X-100 ise % 1'lik konsantrasyonda enzim aktivitesini % 34 oranında artırmıştır. Lipazın geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğu saptanmıştır. En yüksek enzim aktivitesi

gerçek substratlardan Span 80, yapay substratlardan p-nitrofenil kaprilat kullanıldığında elde edilmiştir. HBB 134 lipazının trioleinin 3. pozisyonundaki ester bağlarını hidrolizleyerek 1,2-diolein ve oleik asit ürünlerinin açığa çıktığı saptanmıştır.

2009, 156 sayfa

Anahtar sözcükler

Lipaz, *Anoxybacillus*, lipaz üretimi, termostabil enzim, karakterizasyon

