MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARA AİT LİPAZ ENZİMLERİNİN *Escherichia coli*'DE ÜRETİLMESİ VE ANALİZİ

ABDOULİE O. TOURAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Kadir TURAN

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARA AİT LİPAZ ENZİMLERİNİN *Escherichia coli*'DE ÜRETİLMESİ VE ANALİZİ

ABDOULİE O. TOURAY
(520614921)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Kadir TURAN

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRODUCTION AND ANALYSIS OF LIPASE ENZYMES OF HALOPHILIC MICROORGANISMS IN *Escherichia coli*

ABDOULİE O. TOURAY

(520614921)

MASTER THESIS
Department of Chemistry
Biochemistry Program

THESIS SUPERVISOR
Prof. Dr. Ayşe OGAN

THESIS CO- SUPERVISOR
Prof. Dr. Kadir TURAN

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Abdoulie O. TOURAY'ın "**Halofilik mikroorganizmalara ait lipaz enzimlerinin *Escherichia coli*'de üretilmesi ve analizi**" başlıklı tez çalışması, 17.07.2017 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Ayşe OGAN (Danışman)
Marmara Ün. Fen Edebiyat Fak. ....(İMZA).....

Prof.Dr. Kadir TURAN (Eş Danışman)
Marmara Ün. Eczacılık Fak. .....(İMZA).....

Prof.Dr. Meral BİRBİR (Üye)
Marmara Ün. Fen Edebiyat Fak. ....(İMZA).....

Prof.Dr. Bedia PALABIYIK (Üye)
İstanbul Ün. Fen Edebiyat Fak... ....(İMZA).....

Doç.Dr. Özkan DANIŞ
Marmara Ün. Fen Edebiyat Fak. ....(İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18.07.2017..... tarih ve .2017/16-02..... sayılı kararı ile Abdoulie O. TOURAY'ın Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Uğur YAHŞİ

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tezi Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmam kapsamında engin bilgi ve deneyimini hiç eksik etmeyen, sabrını ve değerli zamanını benden esirgemeyen, bir akademik çalışmanın nasıl yapılması gerektiğini öğreten ve kılavuzluk eden çok değerli hocam, tez danışmanım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Ogan'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, tez konumun seçilmesinde ve tez çalışmamın her aşamasında büyük desteğini gördüğüm ikinci danışmanım Eczacılık Fakültesi-Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalında Sayın Prof. Dr. Kadir Turan'a şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamda lipaz genlerinin hazırlanmasında yararlandığım mikroorganizmaları sağladıkları için değerli hocam Prof. Dr. Meral Birbir'e ve Sayın Dr. Pınar Çağlayan'a şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen ve hoşgörüsü ile beni motive eden değerli hocam Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında Doç. Dr. Serap Demir'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı arkadaşım Ayşegül Pirinçal'a ve ayrıca en sıkıntılı zamanlarda bile maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, bugünlere gelmemde şüphesiz üzerimde büyük emekleri olan ve bu emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim canım ailemeden Omar Touray, Fatou Jabang, Lamin Touray, Amie Touray ve Bintou Touray sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2017 **Abdoulie O. TOURAY**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET vii
ABSTRACT ix
SEMBOLLER xi
KISALTMALAR xii
ŞEKİL LİSTESİ xiii
TABLO LİSTESİ xv
1. Giriş ve amaç 1
1.1. Genel Bilgiler 3
1.1.1. Gıda endüstrisinde gıdaların tadının arttırılmasında lipazlar 4
1.1.2. Lipazların çeşitli kimyasal maddelerin üretiminde kullanımı 5
1.1.3. Biyosensörlerde lipazların kullanımı 5
1.1.4. Lipazların çevre kirliğinde ve kirliğin takibinde kullanılması 5
1.1.5. Lipazların biyopolimer ve biyodizel üretiminde kullanılması 6
1.1.6. Deterjan, pulp ve gıda endüstrisinde lipazların kullanımı 7
1.2. Mikrobiyal lipaz enzimleri 8
1.2.1. Lipaz enzim kaynağı olarak bakteriler 9
1.2.2. Lipaz enzimi kaynağı olarak mantarlar 10
1.3. Tez çalışmasında kullanılan halofilik mikroorganizmalar 12
1.3.1. *Bacillus spp.* 12
1.3.1.1. Halofilik *Bacillus*'lar 12
1.3.2. *Arkebakteriler* 13
1.3.2.1. Aşırı halofil *Arkebakteriler* 13
1.4. Rekombinant DNA teknolojisi 13
2. GEREÇ VE YÖNTEM 16
2.1. Kullanılan kimyasal maddeler 16
2.2. Enzimler 17
2.3. Ticari kitler 18
2.4. Antikorlar 18
2.5. Cihazlar 18
2.6. Besiyerleri 19
2.6.1. Luria bertani (LB) besiyeri 19
2.6.2. Luria bertani agar (LBA) besiyeri 19

2.7. Çözeltiler 19
2.7.1. Akrialmid/bis-akrilamid çözeltisi (% 29 akrilamid / % 1 bis-akrilamid–a/h) 19
2.7.2. Amonyum persülfat çözeltisi (% 10 – a/h) 19
2.7.3. Bloklama çözeltisi (% 5 lik yağsız süt tozu) 19
2.7.4. Etidyum bromür (10 mg/ml) 20
2.7.5. %70 Etil alkol 20
2.7.6. Etilendiamintetraasetik asit (edta) çözeltisi (0.5 m, ph: 8.0) 20
2.7.7. Fenol : kloroform : izoamil alkol (25:24:1) 20
2.7.8. Glikoz çözeltisi (1 M) 20
2.7.9. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N) 20
2.7.10. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M) 21
2.7.11. Mangan klorür çözeltisi (0.55 M) 21
2.7.12. PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) çözeltisi (1 M) 21
2.7.13. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 – a/h) 21
2.7.14. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M) 21
2.7.15. Potasyum asetat çözeltisi (3 M) 21
2.7.16. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M) 21
2.7.17. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10 –a/h) 21
2.7.18. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N) 22
2.7.19. Bradford reaktifi 22
2.7.20. P-nitrofenil laurat (10 mm) 22
2.7.21. P-nitrofenil asetat (10 mm) 22
2.7.22. P-nitrofenil palmitat (10 mm) 22
2.8. Tamponlar 23
2.8.1. Bakteri transformasyon tamponu 23
2.8.2. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0) 23
2.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu II (0.2 N NaOH, % 1 SDS) 23
2.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum / 5 M Asetat) 23
2.8.5. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu 23
2.8.6. 4x Konsantre ayırma jel tamponu (1.5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8.8) 23
2.8.7. 4x Konsantre paketleme jel tamponu (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH :6.8) 24
2.8.8. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M Tris; % 8 SDS – a/h; % 0.2 Bromophenol mavisi – a/h ; % 4 2-Merkaptoetanol - h/h; % 40 Gliserin– h/h, pH:6.8) 24
2.8.9. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0.125 M Tris,1.25 M Glisin, pH:8.3) 24
2.8.10. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 –

a/h SDS, pH 8.3) 24
2.8.11. Protein transfer tamponu 24
2.8.12. Sodyum asetat tamponu (3 M) 24
2.8.13. 50x Konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu 25
2.8.14. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8.0) 25
2.8.15. Tris/EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH : 8.0) 25
2.8.16. 20x Konsantre TBS tamponu 25
2.8.17. TBS ve TBS-T tamponu 25
2.9. Plazmit vektörler 25
2.10. Çalışmada kullanılan oligonukleotid primerler 25
2.11. Agaroz jellerin hazırlanması ve elektroforez 26
2.12. Transformasyon için *Escherichia coli* hücrelerinin kompetent hale getirilmesi ... 27
2.13. Bakterilerden genomik DNA izolasyonu 27
2.14. Lipaz kodlayan DNA fragmentinin PZR ile çoğaltılması ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılması 28
2.15. His uzantılı lipaz kodlayan DNA fragmentlerinin plazmitler üzerinden türetilmesi 29
2.16. pET-14b, pGEX-6p-1 ve pGFP plazmit DNA'larının ligasyon için hazırlanması. 29
2.17. Doğrusal Hale Getirilen pET-14b, pGEX ve pGFP Plazmit Vektörlernin Lipaz Kodlayan DNA Fragmentleri ile ligasyonu ve transformasyon. 31
2.18. Koloni-PZR yöntemi ile pozitif kolonilerin saptanması 31
2.19. Rekombinant plazmitleri taşıyan bakterilerden küçük ölçekte DNA izolasyonu. . 32
2.20. Küçük ölçekte plazmit DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi 32
2.21. DNA dizi analizleri 33
2.22. Bradford yöntemi protein bsa satandart grafiğinin hazırlanmsı ve protein miktar tayini 33
2.23. Halofilik bakteri lipaz enzimlerinin *E. coli* hücrelerinde sentezinin SDS-PAGE ile analiz edilmesi 33
2.23.1. Protein analizi için hücre lizatlarının hazırlanmsı 33
2.23.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması 34
2.23.3. Proteinlerin jelde yürütülmesi 34
2.23.4. Jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması 34
2.23.5. Proteinlerin nitrosellüloz membrana transfer edilmesi ve Western melezleme 35
2.24. Ticari olarak temin edilen *Candida rugosa'*ya ait lipaz enziminin spesifik aktivitesinin belirlenmesi 35
2.25. *Candida rugosa'*ya ait lipaz enzimi ile standart aktivite grafiğinin hazırlanması.. 36

2.26. Plazmit aktarılan *E. coli* hücrelerinden enzim aktivite testleri için lizat hazırlanması 36
2.27. *Escherichia coli* hücrelerinden hazırlanan lipaz enzimlerinin aktivitelerinin belirlenmesi 37
2.27.1. Bilinen standart koşullarda lipaz enzim aktivitesinin belirlenmesi 37
2.27.2. *Escherichia coli* hücrelerinden hazırlanan lipaz enzimlerinin farklı sıcaklıklarda aktivite ve stabilitelerinin belirlenmesi 38
2.27.3. Lipaz enzimlerinin farklı pH değerlerinde aktivitelerinin belirlenmesi 38
2.27.4. Farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında lipaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi……...38
2.27.5. Trixton X-100'ün lipaz enizmi aktivitesine etkisinin belirlenmesi 38
2.27.6. *Escherichia coli* hücrelerinden hazırlanan lipaz enzimlerinin substrat tercihinin belirlenmesi 39
3. BULGULAR 40
3.1. *Escherichia coli*'de Halofilik Lipaz Ekspresyonu İçin Plazmit Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler 40
3.1.1. Halofilik bakteri ve arke hücrlerinden genom DNA'ların izolasyonu ile ilgili veriler…… 40
3.1.2. Halofilik bakteri lipaz genlerinin PZR ile çoğaltılmasıyla iligili veriler 41
3.1.3. pET-14b, pGFP ve pGEX-6p-1 plazmitlerinin ligasyon için hazırlanması ile ilgili veriler. 43
3.1.4. Lipaz genlerinin T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen vektörler ve kontrolleri ile ilgili veriler 44
3.1.5. Lipaz genlerinin P_{lac} promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen vektörler ve kontrolleri ile ilgili veriler 47
3.2. *Escherichia coli*'de halofilik lipaz ekspresyonu ile ilgili veriler 49
3.3. Protein miktar tayini ile ilgili veriler 51
3.4. *Candida rugosa* lipaz enziminin aktivitesinin saptanması ile ilgili veriler 51
3.5. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen lipaz aktivitesi ile ilgili veriler 53
3.5.1. pET-14b plazmitine klonlanan lipaz genlerinin *E. coli* BL21'de ekspresyonu ve lipaz aktiviteleri ile ilgili veriler 53
3.5.2. Farklı *E. coli* suşlarında sentez edilen lipaz enzimlerinin farklı substratlar için aktivitelerinin saptanması ile ilgili veriler 54
3.5.3. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı pH değerlerinde gösterdiği aktiviteler ile ilgili veriler 56
3.5.4. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerinde gösterdiği aktiviteler ile ilgili veriler 56
3.5.5. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında gösterdiği aktiviteler ile ilgili veriler 57

3.5.6. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı non-iyonik deterjan (Triton X-100) konsantrasyonlarında gösterdiği aktiviteler ile ilgili veriler 58
4. TARTIŞMA VE SONUÇ 60
KAYNAKLAR 67
ÖZGEÇMİŞ 75

ÖZET

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARA AİT LİPAZ ENZİMLERİNİN *Escherichia coli*'DE ÜRETİLMESİ VE ANALİZİ

Lipazlar (triaçilgliserol hidrolazlar E.C. 3.1.1.3), hidrolazlar enzim ailesi içerisinde yer alan, gliserol ve yağ asiti zincirlerinin oluşturduğu esterlerin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar ökaryotik ve prokaryotik yapıda tüm canlılarda yaygın olarak bulunurlar. Özellikle mirobiyal organizmalarda sentezlenen lipazlar, pH, sıcaklık, tuz konsantrasyon gibi ortam koşullarındaki değişmelere karşı daha toleranslı olmaları ve substrat spsesifikliklerinin yüksek olması nedeniyle, endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu enzimlerin bir kısmı, gıda, deterjan, ilaç ve çeşitli kimyasal maddelerin üretilmesinde endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bakımdan var olan lipaz enzimlerini daha etkin hale getirmek, daha düşük maliyetlerle üretmek, endüstriyel kullanım kapasitesi yüksek yeni lipaz enzimleri keşfetmek amacıyla, rekombinant DNA teknolojilerini de kullanarak yoğun bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında da ılımlı halofilik bakteriler olan *Bacillus safensis* ve *Bacillus licheniformis* ile aşırı halofilik arkebakter olan *Haloarcula hispanica*'ya ait hipotetik olarak tanımlanmış lipaz genleri, daha düşük maliyette enzim üretmek amacıyla *Escherichia coli* hücrelerine aktarıldı. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen halofilik bakteri lipaz enzimleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi.

Çalışmada mikroorganizma olarak *B. safensis*, *B. licheniformis, H. hispanica* ve *E. coli*'nin farklı suşları kullanıldı. Halofilik bakteri genleri, bu bakterilerden izole edilen genom DNA'sı üzerinden, spesifik oligonukleotid primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyon (PZR) ile çoğaltıldı. Çoğaltılan lipaz genleri, standart DNA teknikleri ile *E. coli* hücrelerinde ekspresyon yapan plazmit vektörler klonlandı. Vektörlere klonlanan lipaz genleri DNA dizi analizleri ile kontrol edildi. Lipaz ekspresyon vektörleri *E. coli* hücrelerine transforme edildi ve bu hücrelerde lipaz enzimi sentezi SDS-PAGE teknikleri ile analiz edildi. Lipaz geni aktarılan *E. coli* hücrelerinde, lipaz enzim aktiviteleri pNFL, pNFP ve pNFA sentetik substratlar kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

DNA dizi analizleri sonuçları oluşturulan pazmit vektörlerinin tasarlanan yapılar ile birbiri uyumlu olduğunu gösterdi. Transformant *E. coli* lizatlarının SDS-PAGE analizleri halofilik organizma lipaz enzimlerinin farklı miktarlarda da olsa sentezlendiğini ortaya koydu.

Sentetik p-nitrofenil laurat ve p-nitrofenil palmıitat substratları kullanılarak yapılan aktivite testlerinde, *B. licheniformis*'e ait hipotetik lipaz geni üzerinde sentez edilen enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Aşırı halofilik *H. hispanica* lipaz enziminin *E. coli* hücrelerinde yeteri kadar sentez edilmediği ve istenilen düzeyde aktif olmadığı saptandı. P-nitrofenil asetat ile yapılan aktivite testlerinde ise, büyük olasılıkla endojen esteraz enzimlerinin reaksiyonu etkilemeleri nedeniyle ayırt edici sonuç alınamadı. Ilımlı halofilik özellik taşıyan *B. licheniformis*'e ait lipaz enziminin NaCl ve Triton X-100 konsantrasyonlarındaki artışa daha yüksek tolerans gösterdiği ortaya konuldu. Bu özellikler, *B. licheniformis* lipaz enziminin, endüstriyel kullanım potansiyeline sahip oluğunu göstermektedir. Dolayısıyla *B. lichenifomis* hipotetik lipaz geni tarafından kodlanan bu enzimin saflaştırılması ve daha ileri düzeylerde işlevsel analizlerin gerçekleştirilmesi ileriye yönelik önemli bir hedef olarak görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *Bacillus*, *Haloarcula*, Recombinant, *Escherichia coli*

Haziran, 2017 **Abdoulie O. TOURAY**

ABSTRACT

PRODUCTION AND ANALYSIS OF LIPASE ENZYMES OF HALOPHILIC MICROORGANISMS IN *Escherichia coli*

Lipases (EC.3.1.1.3, triacylglycerol acyl hydrolases) are members of hydrolases that catalyze the hydrolysis of ester bonds between glycerol and fatty acids. Lipases are abundant in all eukaryotic and prokaryotic organisms. Microbial lipases are relatively tolerant to changes in pH, temperature and salt concentration and are capable of catalyzing reactions with high substrate specificity therefore, are potentially important for industrial applications. Microbial lipases are mostly used in food, detergent, pharmaceutical industries and production of fine chemicals. Using recombinant DNA technologies, intensive studies are being performed to improve the existing lipases, reduce the production cost, and discover new lipases with high industrial performance. In this thesis, to produce a low cost lipase, hypothetically defined lipase genes belonging to *Bacillus safensis*, *Bacillus licheniformis* and extremely halophilic archaea *Haloarcula hispanica* were transformed into *Escherichia coli* cells. Halophilic bacterial lipase enzymes synthesized in *Escherichia coli* cells were then quantitatively and qualitatively analyzed.

The test microorganisms used were *B. safensis, B. licheniformis, H. hispanica* and different strains of *E. coli*. Genomic DNA isolated from these bacteria comprising the halophilic bacteria genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific oligonucleotide primers. Using standard recombinant DNA technologies, amplified lipase genes were cloned into the plasmid vectors expressing in *E. coli* cells. Lipase genes cloned into the vectors were checked by DNA sequence analysis. The expression vectors carrying lipase genes were transformed into the *E. coli* cells. Synthesized lipases were characterized by SDS-PAGE and the lipase activities were assayed spectrophotometrically using *p*-nitrophenyllaurate (*p*-NPL) and *p*-nitro-phenylpalmitate (*p*-NPP) as synthetic substrates.

DNA sequence analysis and the designed vectors were compatible. SDS-PAGE analysis of the transformed *E. coli* lysates confirmed the production of lipases by the halophilic organisms at various yields. High lipase activity was observed for hypothetically defined lipase belonging to *B. licheniformis* with *p*-NPLand *p*-NPP substrates. Lipase of extremely halophilic *Haloarcula hispanica* could not be synthesized in good yield and was

not active at the desired level. Due to presence of endogenous esterase enzymes, no distinctive activity was obtained with *p*-nitrophenylacetate (*p*-NPA). Lipase of moderately halophile, *B. licheniformis* was shown to be tolerant to high NaCl and Triton X-100 concentration. These features reveal that *B. licheniformis* may have potential in industrial uses. Therefore, further purification and characterization tests seem to be important goals for future research.

Key words: Lipase, *Bacillus*, *Haloarcula*, Recombinant, *Escherichia coli*

June, 2017 **Abdoulie O. TOURAY**

SEMBOLLER

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
g	: Gram
IU	: Unite Enzim
Kbç	: Kilo baz çifti
Bç.	: Baz çifti
kD	: Kilo Dalton
L	: Litre
M	: Molarite
Dk	: Dakika
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
N	: Normalite
ng	: Nanogram
nmol	: Nanomol
s	: Saniye
a/h	: Ağırlık/Hacim
a/a	: Ağırlık/Ağırık

KISALTMALAR

APS : Amonyum Persülfate

BSA : Bovin serum albumin

CRL : *Candida rugosa* Lipaz enzimi

EC : Enzim Komisyou

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

EI : Enzim inhibitör kompleksi

ES : Enzim substrat kompleksi

HRP : Yaban turpu peroksidaz enzimi (*İng. Horseradish Peroxidase*)

LB : Luria-Bertani broth besiyeri

LBA : Luria-Bertani broth agar besiyeri

MOPS : 3-(N-morfolin) propansulfonik asit

OD : Optik densite

PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi

PEG : Polietilen glikol

PIPES : 1,4-piperazindietansulfonik asit

pNF : Para-Nitro Fenol

pNFA : p-Nitro fenil asetat

pNFL : p-Nitro fenil laurat

pNFP : p-Nitro fenil palmitat

S : Substrat

SAP :Karides alkalen fosfataz enzim (*İng. Shrimp Alkaline Phosphatase)*

SDS : Sodyun dodesil sülfat

TAE : Tris-asetat-EDTA

TBE : Tris-Borat--EDTA

TBS : Tris ile tamponlanmış tuz çözeltisi (*İng.Tris-buffered saline*)

TBS-T : Tris ile tamponlanmış tuz çözeltisi - Tween 20

TE : Tris-EDTA

TEMED : Tetrametilethilendiamine

UV : Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Lipaz enzimlerinin sulu ve organik ortamda katalizlediği reaksiyonlar..... 3

Şekil 1.2. Rekombinant bir DNA molekülünün elde edilmesi ve çoğaltılması aşamaları..... 15

Şekil 3.1. Halofilik bakterilerden izole edilen genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi..... 40

Şekil 3.2. PZR ile çoğaltılan lipaz kodlayıcı DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi profilleri 42

Şekil 3.3. Restriksiyon endonukleaz enzimleri ile doğrusal hale getirilen pET-14b plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforez profilleri..... 43

Şekil 3.4. Ters PZR ile doğrusal şekle dönüştürülen pGFP (**A**) ve pGEX-6p-1 (**B**) plazmit DNA'ların agaroz jel elektrofor profilleri..... 44

Şekil 3.5. Lipaz genlerinin pET-14b plazmit vektöründe T7 RNA polimeraz promotör dizisi kontrolünde klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörleri..... 45

Şekil 3.6. Dra I restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen plazmit vektörlerin elektroforez profilleri..... 45

Şekil 3.7. x6 His kodlayıcı dizi taşmayan lipaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları..... 46

Şekil 3.8. x6 His kodlayıcı dizi taşıyan lipaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları..... 47

Şekil 3.9. Lipaz genlerinin pGFP ve pGEX plazmit vektöründe lac promotör dizisi kontrolünde klonlanması ile elde edilen E. coli ekspresyon vektörleri..... 48

Şekil 3.10. Dra I restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen plazmit vektörlerin elektroforez profilleri..... 48

Şekil 3.11. Lac promotör dizisi kontrolünde klonlanan lipaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları..... 49

Şekil 3.12. *Escherichia coli* hücrelerinde halofilik bakteri lipaz enzimlerinin SDS-PAGE ile analizi..... 50

Şekil 3.13. Bovin serum albümin kullanılarak Bradford metodu ile hazırlanan protein standart grafiği..... 51
Şekil 3.14. Zaman bağlı olarak 0.5 µg *C. rugoza* lipaz enzimi ile hidroliz olan pNFL'ın spektrofotometrik olarak ölçülmesi..... 52
Şekil 3.15. *Candida rugoza* lipaz enzimi için, PNFL ile hazırlanan standart aktivite grafiği..... 52
Şekil 3.16. *Escherichia coli* BL21 hücrelerinde recombinant olarak sentez edilen halofilik lipaz enzimlerinin rölatif aktiviteleri..... 53
Şekil 3.17. *Escherichia coli* BL21 ve JM107 bakteri suşlarında recombinant olarak sentez edilen halofilik lipaz enzimlerinin farklı substratlara karşı gösterdikleri rölatif aktiviteleri..... 55
Şekil 3.18. *Escherichia coli* JM107 bakteri suşlarında sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enzimi ve *Candida rugosa* lipaz enziminin farklı pH değerlerinde pNFL üzerinde gösterdikleri kataliz aktivitesi 56
Şekil 3.19. *Escherichia coli* JM107 bakteri suşlarında sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enzimi ve *Candida rugosa* lipaz enziminin farklı sıcaklıklarda pNFL üzerinde gösterdiği kataliz aktivitesi..... 57
Şekil 3.20. *Escherichia coli* JM107 bakteri suşlarında sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enzimi ve *Candida rugosa* lipaz enziminin farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında pNFL üzerinde gösterdiği kataliz aktiviteleri..... 58
Şekil 3.21. *Candida rugosa* lipaz enzimi ve *Escherichia coli* JM107 bakteri suşlarında sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı konsantrasyonlarında Triton X-100 içeren ortamlarda pNFL üzerinde gösterdiği kataliz aktiviteleri..... 59

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Farklı organizma grupları ve bu organizmalardan izole edilen lipaz enzimleri……... 8

Tablo 2.1. Lipaz genlerinin PZR ile çoğaltılması, vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ve oluşturulan plazmit vektörlerin DNA dizi analizleri ile kontrolünde kullanılan olionukleotid primerler…… 26

1. Giriş ve Amaç

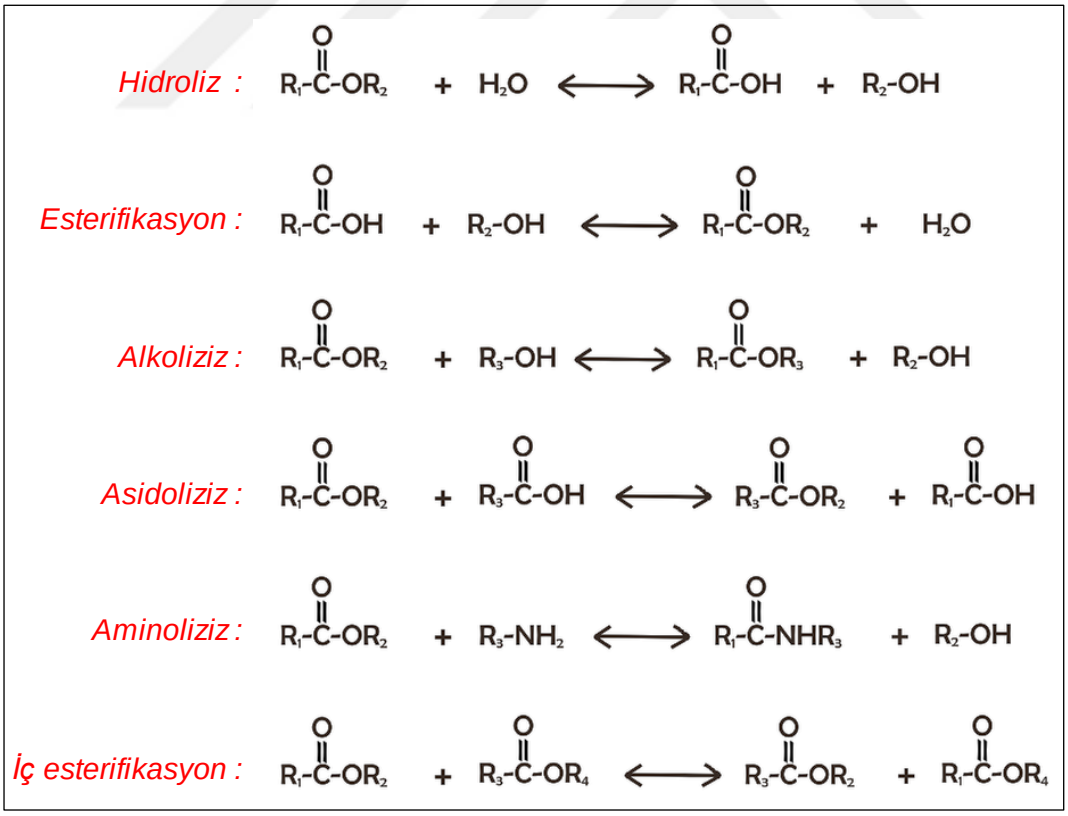
Düşük maliyetli ve çevre için risk oluşturmayan üretim tekniklerinin geliştirilmesine yönelik çabalar, faklı kimyasal bileşiklerin sentezinden başlayarak tekstil üretimi, tanı ve araştırma amaçlı ilaç ve reaktiflerin üretimine kadar çok geniş bir yelpazede çeşitli enzimlerin artan miktarlarda kullanımına yol açmaktadır (Casas-Godoy ve ark., 2012; Jaeger ve Eggert, 2002; Loli ve ark., 2015; Reetz, 2002). Çeşitli endüstri alanlarında kullanılan birçok inorganik katalizörün ve organik kimyasalların aksine, biyolojik katalizörler olan enzimler daha verimli sonuçlar vermekle kalmaz aynı zamanda çevre için çok az veya hiç tehlike oluşturmaz ve daha yüksek saflıklara sahip ürünlerin üretilebilmesine olanak verirler. Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri büyük ölçüde pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, inhibitörler, aktivatörler gibi ortam koşullarına bağlıdır. Bu koşullarda meydana gelecek en küçük değişiklikler bile enzimlerin aktivitelerinde büyük ölçüde azalmaya ya da tamamen aktivitelerini kaybetmelerine neden olabilirler. Bir çok endüstriyel süreç ekstrem koşullarda gerçekleştirilir ve bu nedenle bu koşullarda kararlılığını ve aktivitesini koruyacak enzimlere gereksinim duyulur. Yüksek tuz konsantrasyonu gibi ekstrem koşullara adapte olmuş mikroorganizmaların (halofillerin) sahip oldukları enzimler bu koşullarda işlevselliklerini sürdürebildikleri için bir çok endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanım için önemli bir potansiyele sahiptirler (Schreck ve Grunden, 2014). Doğal olarak, bu enzimlerin organizmalardaki temel işlevleri, endüstriyel kullanım amaçlı değildir, organizmanın bu ekstrem koşullarda varlığını sürdürmesini sağlamaktır. Fakat bu enzimler endüstride çeşitli organik bileşiklerin ekstrem koşullarda parçalanmasında kullanılabilirler. Örneğin lipazlar gibi bir çok hidrolitik aktiviteye sahip enzimler, endüstride kompleks organik bileşiklerin kullanılabilir ürünlere dönüştürülmesine olanak sağlarlar (Sanchez-Porro ve ark., 2003). Üç temel yaşam formu (Bakteriler, Arkea ve Ökaryotlar) içerisinde yer alan ve ekstrem koşullarda yaşayabilen birçok mikroorganizma, biyoteknoloji alanındaki uygulamaları etkileyecek yeni ve etkin kullanım alanlarına sahip enzimler için çok sayıda araştırmaya konu olmakla birlikte, halen ekstrem koşullarda işlevsel olan enzimleri (*ekstromozim*) yüksek düzeylerde eksprese eden mikroorganizmaların saptanmasına ya da geliştirilmesine gereksinin vardır. Ekstrem halofillerin popülaritesi, ürettikleri biyolojik ürünlerin endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyellerinin yüksek olmasıdır (Ventosa ve Nieto, 1995). Halofilik mikroorganizmalara ait enzimler, çok ekstrem endüstriyel reaksiyon koşullarda

kararlı yapılarını ve aktivitelerini korumaları nedeniyle bir çok araştırmacının özel ilgisini çekmektedir. Yeni mikrobiyal enzimlerin saptanmasında izlenen temel yöntem, gerekli enzimlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve aktivite çalışmaları yapıldıktan sonra bu enzimlerin bol miktarda ve ucuz yollarla üretilmesi için ilgili genlerin DNA teknolojileri ile klonlanmasıdır (Jiang ve ark., 2012a).

Bu tez çalışmasına konu olan lipaz enzimleri (EC 3.1.1.3), hidroliz reaksiyonlarını kataliz eden hidrolazlar grubu enzimler içerisinde sınıflandırılırlar. Halofilik mikroorganizmalara ait lipazlar kararlılığı yüksek enzimlerdir ve bu organizmalar ile ilgili genetik çalışmalar yapmak yüksek organizasyonlu canlılar ile karşılaştırıldığında çok daha kolaydır. Mikroorganizmalarda, biyoteknoloji alanında kullanım potansiyeline sahip tanımlanmamış enzimlerin araştırılması yeni bir yaklaşım olmamakla birlikte halofilik mikroorganizmalar bu yönüyle halen üzerinde durulmaya değer öneme sahiptirler. Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında da bazı halofilik arkea ve bakterilere ait lipaz enzimlerinin, üretilmesi daha kolay ve ucuz olan *Escherichia coli* hücrelerinde rekombinant olarak üretilmesi hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda lipaz enzimlerini kodlayan genler *E. coli* hücrelerinde ekspresyon yapan plazmit vektörlerine klonlandı. Oluşturulan ekspresyon vektöleri *E. coli* hücrelerine transforme edildi ve hücrelerde üretilen lipaz enzimleri aktivite açısından analiz edildi.

1.1. Genel Bilgiler

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açil hidrolazlar) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini kataliz eden enzimlerdir (Ghasemi ve ark., 2011; Kumar ve ark., 2005). Bu enzimler hidroliz, iç esterifikasyon, esterifikasyon, asidoliz ve aminoliz gibi çeşitli biyodönüşüm reaksiyonlarını katalizlerler. Dolayısıyla çok amaçlı endüstriyel kullanım alanlarına sahiptirler (Borrelli ve Trono, 2015; Kumar ve ark., 2017; Ramnath ve ark., 2017). Lipaz enzimleri uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan ester grupları üzerinde etkili olur ve aynı zamanda boya ve yağ molekülleri gibi hidrofobik yüzeylere karşı da aktivite gösterirler (Kumar ve ark., 2016a; Lopez-Iglesias ve Gotor-Fernandez, 2015). Lipazlar, endüstriyel enzim pazarında proteazlar ve karbohidratazlardan sonra en önemli enzim grubunu oluştururlar (Adrio ve Demain, 2014). İlaç, pestisit, kozmetik, gıda, biyosensörler ve deterjan sanayi ve biyodizel üretimi gibi birçok alanda lipaz enzimi yaygın olarak kullanılmaktadır (Bassegoda ve ark., 2012; Nagarajan, 2012). **Şekil 1.1**'de lipazın enzimlerinin sulu ve organik ortamda katalizlediği reaksiyonlar gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Lipaz enzimlerinin sulu ve organik ortamda katalizlediği reaksiyonlar (Borrelli ve Trono, 2015).

Lipazlar enzimatik reaksiyonları yüksek substrat spesifikliği, kararlılık, bölgesel ve enansiyo seçicilik ile kataliz ederler. Bu özelliklerinden ötürü lipazların biyoteknolojinin farklı alanlarında kullanımı her geçen gün artmaktadır.

Endüstride pek çok alanda uygulama bulduğu için lipaz enzimlerinin dünya enzim pazarındaki payı büyük hızla artmaktadır. Freedonia Group firması 2003 yılında, lipaz enzimlerinin pazar payının 8 Milyar $'a ulaşacağını bildirmiştir. Endüstriyel alanda lipaz enzimleri karbohidratazlar, proteazlar, polimerazlar ve nükleazlar gibi diğer endüstriyel enzimlerle birlikte gıda endüstrisinde, biyoteknoloji uygulamalarında, farmasötiklerin ve diğer değerli kimyasalların üretiminde ve çevrenin temizlenmesinde her geçen gün artan bir şekilde kullanılmaktadır (Freedonia, 2015).

Lipazlar, karmaşık moleküllerin seçici transformasyonu gibi bir çok transformasyon prosesinde geleneksel organik sentez yöntemlerine alternatif olarak sunulmaktadır. Kimyasal katalizörler ile kıyaslandığında reaksiyonları büyük bir spesifikle katalizlerler. Lipazların katalizlediği reaksiyonlarda yan ürünler oluşmaz ve oluşan ürünlerden kolaylıkla ayrılır. Kimyasal katalizörler toksik yan ürünler oluştururlar ve çok yüksek sıcaklıklarda reaksiyonları gerçekleştirirler. Bu yüzden çok fazla enerjiye gereksinim duyarlar (Ghosh ve ark., 1996; Pandey ve ark., 1999).

1.1.1. Gıda endüstrisinde gıdaların tadının arttırılmasında lipazlar

Gıda endüstrisi enzimlerin en yaygın olarak kullanıldığı alandır. Gıda üretiminde kullanılan enzimlerin çoğunluğu gıdanın biyotransformasyonlar ve yıkımları yoluyla tadını ve kokusunu arttırmak için kullanılır. Lipazlar ekmek gibi unlu mamullerin lezzetinin arttırılmasında önemli rol oynarlar. Aynı zamanda bira, fırınlanmış gıdalar ve et ürünlerinin kalitesini arttırmak için de kullanılırlar. Süt endüstrisinde lipaz enzimleri lezzeti arttırmak için kullanılır. Enzim süt yağlarını hidroliz eder ve kısa zincirli yağ asitlerini açığa çıkarak kokuyu geliştrir. Lipaz enzimleri aynı zamanda peynirin olgunlaşmasını arttırır. Süt veya tereyağının lipolize olmasıyla süt yağ serbest yağ asitlerinin açığa çıkmasıyla peynirin tadı iyileştirilir. Lipaz margarine yapay koku verilmesinde ve çikolatalı ürünlerin kaplanmasında da kullanılır. Bazı mikrobiyal lipazlarin bölgesel ve yağ asidi spesifikligi ile esterifikasyon ve iç esterifikasyon yoluyla çoklu doymamış yağ asitleri, koko yağı eşdeğerleri ve süt katkı maddeleri gibi çok değerli ürünler elde edilir.

Çoklu doymamış yağların farmasötik endüstrisinde önemli uygulamaları vardır. Transesterifikasyon reaksiyonu ile triaçilgliserolden düşük trans yağ içeriğine sahip yağların üretimi yapılır (Anobom ve ark., 2014). Lipazlar aynı zamanda meyve suyu et ve balık ürünlerinde, kremalarda ve sebzelerin fermentasyonunda kullanılır (Kumar ve ark., 2016b; Pandey ve ark., 1999).

1.1.2. Lipazların çeşitli kimyasal maddelerin üretiminde kullanımı

Kozmetik koku, ilaç, pestisist ve diğer tarım kimyasallarının üretim sektörleri lipazın en önemli alıcılarıdır. Lipazların bölgesel ve enanşiyo seçiciliği bu tür kimyasalların üretiminde lipaz enzimlerini çok önemli hale getirmiştir. İlaç ve tarım kimyasalları gibi biyoaktif moleküllerin üretiminde sterospesifiklik bu tür maddelerin etkin olarak kullanılmasında çok temel bir rol oynar. Lipazlar, pestisist ve farmasotikler gibi anansiyomerik olarak çok saf ürünlerin sentezi için gerekli olan ara ürünlerin üretilmesini sağlarlar (Anobom ve ark., 2014). Esterifikasyon, transesterifikasyon ve iç esterifikasyon reaksiyonu verme yeteneklerinden ötürü *Pseudomonas* lipazı, lipofilik fenoller sinnomoil esterleri gibi pek çok antioksidan bileşiklerinin üretiminde kullanılırlar (Choo ve ark., 2009).

1.1.3. Biyosensörlerde lipazların kullanımı

Lipaz enzimleri, lipitlerin ve lipit bağlayan proteinlerin kalitatif ve kantitatif tayini için kullanılan biyosensörlerde kullanılır. Bu tip biyosensörler, gıda endüstrisi, çevre analizleri ve tıpta teşhis gibi endüstrinin çeşitli kollarında uygulama alanı bulurlar. Bu biyosensörlerin çalışma prensibi triaçilgliserolün hidrolizi ile gliserol vermesi ve bu gliserolün de kimyasal veya enzimatik yöntemlerle tayin edilmesi temeline dayanır (Aravindan, 2007). Lipaz temelli biyosensörler gıda endüstrisinde gıdaların trigliserid miktarlarının tayininde kullanılır. Ayrıca tıpta trigliserid miktarını ölçerek pankreas hasarını ve pankreas iltihabını belirlemek için teşhis amaçlı da kullanılır (Sangeetha, 2011). Biyolojik bileşen olarak lipaz enziminin kullanıldığı biyosensörlerinin kalitatif ve kantitatif pestisit analizlerinde kullanılabileceği de gösterilmiştir (Pandey ve ark., 1999).

1.1.4. Lipazların çevre kirliğinde ve kirliğin takibinde kullanılması

Lipazlar yağla kirlenmiş atık suların temizlenmesinde kullanıldıkları için çevre kontrolünde büyük bir öneme sahiptir. Endüstriyel ve evsel atık sular lipazla muamele

edilerek organik atıkların yüzey alanını genişleterek onların çözünürlüğünü ve biyolojik yıkımını arttırır (Mello Bueno ve ark., 2015; Valladao ve ark., 2009). Lipaz, selülaz, amilaz ve proteazlar gibi enzimler atık sulardaki katı veya yağlı filmlerin yıkılmasını sağlarlar. Enzimatik yolla atık arındırma uygulamalarından biri de aktif çamurdan yağ tabakalarının giderilmesi, organik kalıntıların kırılması, şehir kanalizasyon sistemlerinin, toplama tanklarının ve yağ tuzaklarının temizlenmesidir. Lipazlar endüstriyel atıkların da örneğin tavuk çiftliklerinin atık sularının işlenmesinde, gıda endüstrisinde ve mezbahalarda yağı ve yağdan zengin atık suların temizlenmesinde kullanılır. Bu işlemler için *C. rugosa* lipaz enzimi kullanılır. Bakteriyel kaynaklı lipazların kanalizasyon sistemlerindeki yağları kırarak çevre kirliğinin giderilmesinde kullanılması ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır (Shah ve ark., 2008). Margesin ve ark. (2003) tarafından toprak mikrobiyal lipazlarının aktivitesini izleyerek topraktaki petrol kirliğinin biyo bozunumunun takip edilebileceğini öne sürmüşlerdir. Bu araştırmacılar, mantar kaynaklı lipazlar gibi bazı mikrobiyal lipazların da sahillerdeki ve soğuk ortamlardaki petrol sızıntılarının ve petrol hidrokarbonlarının giderilmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

1.1.5. Lipazların biyopolimer ve biyodizel üretiminde kullanılması

Lipazların biyodizel üretiminde kullanılabileceğinin gösterilmesi ile bu enzimler araştırmacıların ve enerji endüstrisinin büyük ilgisini çekmiştir. Petrol fiyatlarının artması, kaynaklarının tükenecek olması ve petrolün çevreye verdiği zararlar, biyodizel üretiminin temiz ve sürekli bir kaynak olması gibi nedenlerden ötürü biyodizel üretimine bir kayış olmuştur. Bir diğer faktör de biyodizel üretiminde atık yağların, bitkisel yağların, hurma çekirdek yağının, kısa zincirli alkoller ve etanol gibi ucuz hammaddelerin kullanılmasıdır (Pandey ve ark., 1999; Sangeetha ve ark., 2011; Schmidt-Dannert, 1999). Biyodizeller yağ asitlerinin ve trigliseridlerin yanı sıra etanol ve metanol gibi kısa zincirli alkollerin esterifikasyonu veya transesterifikasyonu ile üretilirler. Bu reaksiyonlar büyük bir spesifikle yan ürünler oluşmadan gerçekleşir ve yan ürün olarak ortama çıkan gliserol de kolaylıkla ortamdan uzaklaştırılır (Borrelli ve Trono, 2015). Noureddini ve ark., *Pseudomonas capacia*'dan elde edilen lipaz enzimi immobilize ederek soya yağının metanol ve etanol ile transesterifikasyonunu sağlamışlardır (Noureddini ve ark., 2005). Lipaz enzimi kullanılarak biyodizel üretilmesi uzun dönemli enerji alternatifi olarak bugün kullanılan kimyasal metotlara göre gelecek vaat etmektedir. Sayısız iyi taraflarına rağmen lipaz enziminin yüksek

maliyetinden dolayı bugün için biyodizel üretimi endüstriyel boyutta gerçekleşmemektedir (Borrelli ve Trono, 2015). Dolayısı ile maliyeti düşürmek için yeni ve dayanıklı lipaz enzimlerinin izole edilip saflaştırılması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Lipaz enzimlerinin diğer önemli bir uygulama alanı biyopolimerlerin üretilmesidir. Lipazlar biyopolimerlerin üretiminde veya hali hazırda var olan polimerlerin kalitesini arttırmada ve biyobozunurluk özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılırlar. Bu ürünler çevre ile uyumludur. Doğal şekerlerin fermentasyonu ile elde edilen polilaktat fiberlerin enzimatik olarak biçimlendirilmesinde kullanılırlar (Sangeetha ve ark., 2011).

1.1.6. Deterjan, pulp ve gıda endüstrisinde lipazların kullanımı

Lipaz enzimleri katı yağların hidrolizini sağlar. Bu nedenle çeşitli gıdalar ve süt endüstrisinde, deterjan üretiminde, pulp ve kağıt endüstrisi gibi pek çok ticari alanda kullanılmaktadır**.** Lipaz uygulamasında yağların yapışkanlığının giderilmesi önemli bir uygulamadır. Bu işlemde mikrobiyal kaynaklı bir hayli seçici fosfolipazlar kullanılarak bitkisel yağlardan fosfolipitler giderilir (Teh ve ark., 2016). Lipazın çamaşır deterjanlarında kullanımı ticari olarak bu enzimlerim en önemli uygulama alanıdır (Cherif ve ark., 2014). Lipazların deterjan katkısı için kullanılabilmelerinde önemli kriterler; suda çözünür olma, yüzey aktif maddeleri gibi diğer deterjan bileşenlerine, metal iyonlarına, yüksek sıcaklığa ve proteazlara toleranslı ve geniş substrat seçiciliği sahip olmalı ve alkali pH'larda da yüksek aktivite şeklinde sıralanabilir. *Pseudomonas alcaligenes* ve *Pseudomonas Mendocina*'dan elde edilen Lipomax ve Lumafast adı ile satılan ticari lipazlar deterjan katkı enzimleridir. Deterjan katkısı olarak kullanılan diğer önemli bir enzim "Lipolazdır". Lipolaz rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak üretilen ilk ticari lipaz enzimidir. Orijinal haliyle *Thermomyces lanuginosa'*dan izole edilmiş, daha sonra Lipolazı kodlayan gen zararsız bir organizma olan *Aspergillus oryzae'*ye aktarılarak daha düşük maliyetlerde lipaz üretilmiştir (Anobom ve ark., 2014). Deterjanlara katılan lipaz enzimlerinin temel işlevi çamaşırlardaki yağlı lekelerin giderilmesidir. Yıkama esnasında çamaşır ile leke kompleks oluşturur ve zorlu yıkama işlemlerine direnç göstererek bu kompleks yıkama işlemi sırasında çamaşırların üstünde kalır ve temizleme işlemine devam eder. Lipazlar kağıt sanayinde de yoğun şekilde kullanılır. Kağıt hamurunda bulunan balmumu ve trigliseridlerden oluşan reçineyi uzaklaştırmak için kullanılır (Sangeetha ve ark., 2011). Bu reçinenin giderilmesi kağıdın kalitesini arttırır (Anobom ve ark., 2014). Deri endüstrisinde ise lipazlar, yağların ve kollagen

olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Böylelikle yumuşak yüzeyli ve düzgün boya dağılımı gösteren çok kaliteli deriler üretilebilir (Seitz, 1974).

1.2. Mikrobiyal lipaz enzimleri

Canlıların temel yapısal bileşenlerinden olan lipitler yeryüzünde en yaygın bulunan biyolojik moleküllerdir. Canlının yapısal bir bileşeni olmanın yanı sıra lipitler hücresel işlevlerin gerçekleştirilmesinde enerji kaynağı olarak da hayati öneme sahiptirler. **Tablo 1.1**'de farklı organizma grupları ve bu organizmalarda üretilen öneli lipaz enzimleri verilmiştir.

Tablo 1.1. Farklı organizma grupları ve bu organizmalardan izole edilen lipaz enzimleri. (*http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/sources.htm-Erişim tarihi 02.06.2017*).

Kaynak (Organizma)	Lipaz Enzimleri
Memeli Organizmalar	İnsan pankreas Lipazı At pankreas Lipazı Domuz pankreas Lipazı Guinea Pig pankreas Lipazı
Mantarlar	*R. meihei* lipaz enzimi *P. cambertii* lipaz enzimi *H. lanuginose* lipaz enzimi *R. oryzae* lipaz enzimi *A. niger* lipaz enzimi
Mayalar	*C. rugose* lipaz enzimi *C. antarctica* lipaz A enzimi *C. antarctica* lipaz B enzimi *G. candidum* lipaz enzimi
Bakteriler	*C. viscosum* lipaz enzimi *P.s viscosum* lipaz enzimi *P. cepacia* lipaz enzimi *P. aeruginosa* lipaz enzimi *P. fluorescens* lipaz enzimi *P. fragi* lipaz enzimi *B. thermocatnulatus* lipaz enzimi *S. hyicus* lipaz enzimi *S. aereus* lipaz enzimi *S. epidermidis* lipaz enzimi

Lipitlerin hidrolizi ile enerji üretimindeki rolleri ve endüstrideki uygulamalarından dolayı lipaz enzimleri biyolojik sistemlerde ve endüstriyel uygulamalarda önemli bir yere sahiptir. Lipazlar doğada yaygın olarak bulunan enzimlerdir ve pek çok bitki hayvan ve mikroorganizma hücrelerinde üretilirler. Özellikle mikroorganizma kaynaklı lipaz enzimlerinin spesifikliğinin yüksek olması ve kararlı yapıları, bu enzimleri üreten bakterilerin ön plana çıkmasına yol açmaktadır. Lipaz aktivitesine sahip farklı türden mikroorganizmalar, çoğunlukla yağlarla kontamine olmuş topraklarda, endüstriyel atık alanlarında, yağların işlendiği fabrikalar, yağ ya da yağlı tohumlarla kontamine olmuş çevrelerde bulunurlar. Büyük ölçeklerde üretilebilmeleri ve genetik olarak daha kolay değiştirilebilmeleri, mikrobiyal lipazların hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere göre sahip oldukları üstün özelliklerdir. Çeşitli bakteriler, mantarlar ve mayalar biyoteknolojik olarak lipaz enzimlerinin üretilmesinde kullanılan mikroorganizmalardır (Ghori ve ark., 2011; Ghosh ve ark., 1996). Yakın bir zaman dilimi içerisinde, birçok lipaz geni, DNA teknolojileri kullanılarak farklı organizma türlerine aktarılmış ve daha düşük maliyelerde ve daha fazla miktarlarda enzim üretme olanağı doğmuştur (Adham ve Ahmed, 2009; Hasan ve ark., 2006b).

1.2.1. Lipaz enzim kaynağı olarak bakteriler

Bakteriyel lipazlar enzimleri genellikle ekstraselüler ortamda bulunurlar ve büyük miktarları kolaylıkla üretilebildiği için ticari olarak değerlidirler. Lipaz enzimi üreten çok sayıda bakteri türü olmasına rağmen çok azı ticari olarak değerlidir. En fazla lipaz üreten bakterilerin *Bacillus* cinsi bakterilerden *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Bacillus alcalophilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus coagulans* türleri olduğu, bunlara ek olarak *Achromobacter, Alcaligenes, Chromobacterium, Arthrobacter* ve *Pseudomonas* cinsi bakterilerin de iyi birer lipaz üreticisi olduğu bildirilmiştir (Arpigny ve Jaeger, 1999; Gupta ve ark., 2004). Bakteriler hızlı çoğalır ve oldukça kısa sürelerde lipaz enzimi üretebilirler. Bakteri genleri rekombinant DNA teknolojileri ile kolaylıkla manipule edilebildiğinden, farklı bakteri türleri arasında gen aktarımı ile lipaz üretimi açısından daha verimli organizmalar geliştirme, ya da gen üzerinde yapılacak değişikliklerle daha stabil ve daha aktif genler elde etme imkanları vardır (Padmapriya ve ark., 2011; Treichel ve ark., 2010). Bu tez çalışmasında da *E. coli* hücreleri ile karşılaştırıldığında üreme hızları daha yavaş olan ılımlı halofilik *Bacillus* türlerine ait lipaz genlerini ve çok yavaş üreme hızına aşırı halofilik arkebakter olan *Haloarcula hispanica* lipaz

genini, rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanarak. *E. coli* hücrelerine aktararak lipaz enzimini daha düşük maliyette üretmek hedeflenmiş ve bir ölçüde başarılı sonuçlar alınmıştır.

Bakteriyel lipaz enzim salgılanması karbon kaynağından, ortamdaki iyonlardan ve hatta metabolize olmamış polisakkaritlerden çok etkilenir. Bakteriler tarafından üretilen lipaz enzimleri hem açilgliserollerin hidrolizini ve hem de asidosis ve transesterifikasyon reaksiyonları katalizleyerek farklı reaksiyon mekanizmaları ile endüstriyel olarak önemli ürünlerin sentezlenmesine olanak sağlarlar. Biyolojik ürünlerin hem hidrolizini, hem de sentezini yüksek spesifiklik ve ucuza sağladıkları için bakteriyel lipazlar farmasötik endüstrisi alanında da çok rağbet görmektedir (Andualema ve Gessesse, 2012).

Bakteriyel lipazlar deterjan endüstrisinde kimyasalların yerini alarak sağlığa ve çevreye zararlı olan bu kimyasalların kullanımını azaltmıştır (Jaeger ve Eggert, 2002). Deterjan katkısı olarak genellikle *Pseudomonas mendocina, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas glumae* ve *Bacillus cepacia*'dan elde edilen lipazlar kullanılmaktadır (Gupta ve ark., 2004). *Pseudomonas fluorescens, Burkholderia cepacia* ve *Bacillus thermocatenulatus* ise genellikle biyodizel üretiminde kullanılan bakteri türleridir (Hwang ve ark., 2014; Yun ve Ryu, 2005).

Bakterilere sentez edilen lipaz enzimlerinin, hücre içi lokasyonları verimlilik açısından önemlidir. Diğer bir çok biyoteknolojik üründe olduğu gibi sentez edilen lipaz enzimlerinin hücre dışına salgılanması önemli bir tercih nedenidir. Bakterilerde lipaz enzimlerinin salgılanması için farklı yolaklar bildirilmiştir. Bunlar; Tip 1 salgılama sistemi (T1SS),Tip 2 salgılama sistemi (T2SS), Salgılama bağımlı yolak ve Tat-bağımlı yolaklardır (ikiz arjinin translokasyonu). TISS sistemi üç protein alt üniteli bir komplekstir, lipaz salgılanması için enerjiye gereksinim duyar. T2SS salgılama sistemi 2 alt üniteden oluşur. Bakteryel lipazların salgılanma işleminde ilk olarak enzim katlanmamış olarak salgı-bağımlı yolak ile periplazmik boşluğa salgılanır. Periplazmik boşlukta lipaza özgü bir şaperon olan foldaz (lif) yardımıyla katlanma işlemi gerçekleşir. Katlanan bu proteinler en sonunda dış ortama transport kompleksi ile taşınırlar (Angkawidjaja ve ark., 2005; Sangeetha ve ark., 2011).

1.2.2. Lipaz enzimi kaynağı olarak mantarlar

Endüstriyel olarak önemli lipaz enzimlerini için kaynak oluşturan önemli bir mikroorganizma grubu da mantarlardır. Mantarlar hem hücre içerinde lokalize olan hem de

hücre dışına salgılanan lipaz enzimleri sentez edebilmektedir. Mantarlardan elde edilen birçok lipaz enziminin yüksek seçicilik, geniş sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyon aralıklarında aktif olması endüstriyel alanda kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Mantar lipaz enzimlerinin bir kısmı ticarileşebilerek çevre atık yönetiminde, biyodizel üretiminde, evde kullanılan çamaşır ve temizlik deterjanlarında, gıda endüstrisinde kullanılarak günlük hayatımıza girmişlerdir.

Özellikle hifli mantarlar ekstraselüler lipazların kaynağıdır ve ticari uygulamalarda oldukça yaygın kullanılırlar. Fermentasyon prosesinden sonra ürünün kolaylıkla ekstre edilebilmesi, bu organizmaların tehlike oluşturmamaları ve hızlı çoğalmaları, bu tip mantarları lipaz kaynağı olarak oldukça popüler hale getirmiştir. Çeşitli araştırma grupları tarafından mantar lipazları ile ilgili çok sayıda yayın yapılmış olması endüstrinin bu tür lipazlara ihtiyacının artığını göstermektedir. Hifli mantarlar, lipaz üretiminde katı hal fermantasyon sistemlerinde kolaylıkla yetiştirilebildiklerinden ötürü üstün özellikler göstermektedir. Katı hal fermantasyonda katı substratların kullanılabilmesi hifli mantarların gelişimini kolaylaştırmakta ve enzim üretimini arttırmaktadır. Bu ortamlar büyümedeki doğal habitatlarına benzediği için gelişimlerinin daha kolay olabileceğini düşündürmektedir. Enzim immobilizasyonu enzimolojide diğer önemli bir konudur, enzimi katı bir desteğe veya matrikse tutundurduğu için ürününün saflığını arttırır. Enzimi immobilize etmektense lipaz üretmek için hifli mantar hücrelerini katı substratlar üzerinde yetiştirmek enzim immobiliazsyon maliyetini düşüreceğinden, ürünün saflığını arttırıp ortamından kolaylıkla ayrılmasını sağlayacağından dolayı tercih edilmektedir (Alberton ve ark., 2010; Fonseca ve ark., 2015; Singh ve Mukhopadhyay, 2012). Mantarlar subsratlarını yıkmak için çok sayıda enzim üretmektedirler. Enzim üreten mantarların taranarak ticari olarak değerli enzimlerin ve yeni lipaz üreten suşların tanımlanıp açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Mantarlar ayrıca hücre içi lipaz üreticisidirler ve genellikle geniş ölçekte uygulamalarda daha ekonomiktirler (Fukuda ve ark., 2009).

Mantar alemi içinde endüstriyel uygulamaları için gerekli özelliklere sahip olan ve oldukça yoğun çalışılmış türler arasında *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Rhizopus* öne çıkmaktadır (Kakde, 2011). Bir diğer çalışmada çalışılan 169 zigomositler arasında tributirini hidrolizleme kapasitesine göre *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Mortierella* ve *Umbelopsis* en çok dikkati çeken mantar türleridir (Kotogán ve ark., 2014). *Aspergillus sp*. ticari lipazların en çok üreticisi olduğu için doğal fabrika olarak adlandırılmaktadırlar ve bunlardan üretilen ürünler Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (*İng. Food and Drug Administration* - FAD)

tarafından genellikle tehlikesiz olarak kabul edilmektedir (Mahmoud ve ark., 2015; Sharma ve ark., 2001).

1.3. Tez çalışmasında kullanılan halofilik mikroorganizmalar

1.3.1. *Bacillus* türleri.

Bacillus farklı ortamlarda bulunan çomak şeklinde ve gram-pozitif bir bakterilerdir (Garabito ve ark., 1997). Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof ve termofilik türleri de vardır. Endospor oluştururlar. Vejetatif hücreler 0,5×1,2 μm ile 2,5×10 μm çapındadır. *Bacillus* cinsine ait türlerin koloni morfolojisi çeşitlik gösterir. Genellikle beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır. *Bacillus* türleri doğada çok yaygındır ve aynı zamanda yüksek pH *(B. alcalophilus)*, sıcaklık *(B.* thermophilus) veya yüksek tuz konsantrasyonu (*B. halodurans*), (*B. thuringiensis*) gibi ekstrem çevre koşullarında yaşayabilen türleri vardır. *Bacillus* türleri farklı fizyolojik özellikler göstermelerinden dolayı bir çok farmasötik, ziraat, tıp alanlarında ve endüstriyel proseslerde uygulama alanı bulur (Xu ve Cote, 2003). Bu bakteri grubu enzimler, antibiyotikler ve diğer önemli metabolitler olmak üzere çok sayıda değerli ürünün kaynağıdır (Donio ve ark., 2013; Latorre ve ark., 2016; Westers ve ark., 2004).

1.3.1.1. Halofilik *Bacillus*'lar

Bacillus türleri, fizyolojik özelliklerinden dolayı yüksek veya ılımlı tuzlu ortamlarda dahil olmak üzere pek çok ortama adapte olup yaşayabilir (Kalishwaralal ve ark., 2009; Setlow, 2006). Ilımlı halofilik *Bacillus* türlerinden olan *B. safensis* ve *B. licheniformis*'in lipaz gibi enzimleri ve basitrasin gibi önemli bileşikleri ürettiği bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2014; Rai ve ark., 2017; Rezaei ve ark., 2017; Shirazian ve ark., 2016). *Bacillus safensis* de diğer *Bacillus* türleri gibi çomak şeklinde gram negatif ve tuzlu koşullarına dayanıklı olduğu gibi gama ve UV radyasyonlarına da dayanıklıdır (Garabito ve ark., 1997; Setlow, 2006). Bu türler bitki hormonlarının elde edilmesi için iyi kaynaklardır ve aynı zamanda köklerin kolonileşmesini de sağlayarak bitki gelişimine katkıda bulunurlar. *Bacillus lincheniformis* en çok toprakta ve başta kuş olmak üzere çeşitli hayvanlarda bulunurlar. Enzim üretimi için uygun sıcaklık aralığı 30^{o}C ila 37^{o}C civarıdır. Bu türler alkali şartlarda büyüyebildiği için amilaz, lipaz ve proteazlar olmak üzere güçlü endüstriyel enzim kaynaklarıdır ve

nanoteknoloji alanında uygulamaları vardır (Kalishwaralal, Deepak, Ram, Pandian, & Gurunathan, 2009).

1.3.2. Arkebakteriler

Arkebakteriler, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* ve *Nanoarchaeota* olarak dört ana alt aleme ayrılır. *Euryarchaeota*, arkelerin fizyolojik olarak farklı gruplarını içerir ve bunların çoğu da farklı aşırı ortamlarda yaşarlar. Bu grubun içersinde termofilik (ısıya dayanıklı), metanojenik (metan gazı üretenler), psikrofil (soğuğa dayanıklı) asidofililik ve alkalifilik arkeler ve aşırı halofiller (*Halobacteria*) gibi arkeler bulunur. Aşırı halofillerin büyük bir kısmı zorunlu aeroplardır. (Mondino ve ark., 2009; Munson ve ark., 1997).

1.3.2.1. Aşırı halofil Arkebakteriler

Aşırı halofil arkeler (*Halobacteriaceae* familyası) tuz konsantrasyonunun 250 -300 g/L'yi aştığı tuzlu ortamlarda baskın olarak bulunan, kırmızı pigmentasyon oluşturan heterotrofik organizmalardır. Parlak kırmızı rengin gelişiminin tuzlu ortamlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Aşırı halofil terimi mikroorganizmanın, hem tuzlu ortamlarda geliştiğini hem de mikroorganizmanın tuza çok fazla gereksinim duyduğunu belirtmek için kullanılır. Bazen bu tuz gereksinimi tuzun doygunluk noktasına kadar olabilir. Aşırı halofillerin gelişmesi için en az 1.5 M NaCl (yaklaşık %9) ve çoğu türlerin optimal gelişmesi için 2-4 M NaCl (%12-23) gerekmektedir. Hemen hemen tüm aşırı halofiller 5.5 M NaCl'de gelişirler (NaCl doygunluğunun limiti % 32'dir). Buna rağmen bazı türler bu tuzlulukta çok yavaş gelişirler (Bowers ve ark., 2009). *Haloarcula hispanica* İspanya'da bir tuzladan elde edildiği için bu ismi almıştır. Salgıladıkları ekstraselüler bir polimer kolonilere mukus özelliği verir. Restriksiyon aktivitesi kısıtlı olduğu için arkeal genetik araştırmalarda en çok kullanılan türdür (Lü ve ark., 2017).

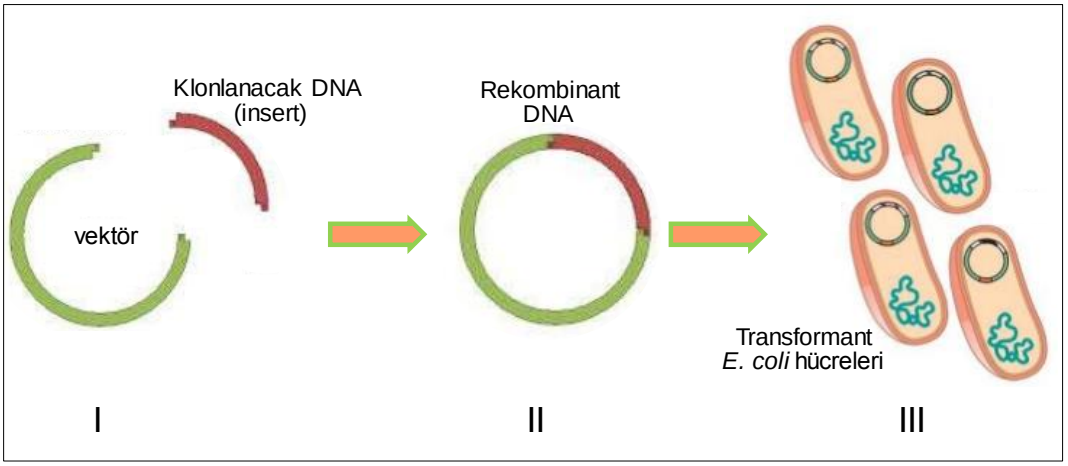
1.4. Rekombinant DNA teknolojisi

Gen klonlama ya da moleküler klonlama olarak da adlandırılan rekombinant DNA teknolojisi, bir organizmadan diğerine gen transferinde kullanılan bir çok deneysel protokolü kapsayan genel bir terimdir. 1970'li yılların başlarında restriksiyon endonukleaz enzimlerinin keşfi ve daha sonraları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniklerinin geliştirilmesi, farklı türler arasında gen aktarımı çalışmalarına büyük bir ivme katmış ve günümüzde insan

genomu dahil binlerce prokaryotik ve ökaryotik organizmanın tüm genom dizisinin ortaya konmasıyla doruk noktaya erişmiştir.

Rekombinant DNA teknolojileri için temel olan çalışmalar 1970'li yılların başında gerçekleştirilmiştir. İlk kez Cohen ve diğerleri 1973 yılında yayımlanan çalışmalarında *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kestikleri farklı plazmit DNA'larını *in vitro* koşullarda birbirine bağlayarak yeni bir plazmit oluşturdular. Bu araştırmacılar *E. coli* hücrelerine transforme ettikleri yeni plazmit DNA'nın replikasyon yapabildiğini göstertirler (Cohen ve ark., 1973). *İn vitro* koşullarda oluşturulan doğal olmayan bu yeni DNA molekülü rekombinant DNA olarak adlandırılmıştır. Bu çalışmayı Morrow ve diğerlerinin 1974 yılında yayımladıkları, bakteri plazmit vektörüne bağlanan ökaryotik bir organizma DNA'sının (*Xenopus laevis* rRNA kodlayan DNA) *E. coli* hücrelerinde replikasyon ve transkripsiyon yaptığını gösteren çalışma izlemiştir (Morrow ve ark., 1974). Sonraki yıllarda yapay plazmit vektörü, bakteri yapay kromozomu (BAC), maya yapay kromozomu (YAC), bakteriyofaj vektörler, Cosmit vektörler, retroviral vektörler, adenoviral vektörler gibi, farklı organizmalara gen aktarımı için kullanılan çok sayıda vektörlerin geliştirilmiş ve rekombinant DNA teknolojilerinin uygulama alanların çok genişlemiştir (Maniatis ve ark., 1982).

Rekombinant bir DNA elde etme işlemi temelde üç kademeden oluşur. Bunlar, klonlanacak DNA moleküllerinin hazırlanması; uygun bir vektöre ligaz enzimleri ile bağlanması ve rekombinant DNA'yı çoğaltmak amacıyla çoğunlukla *E. coli* hücrelerine transforme edilmesi aşamalarıdır (**Şekil 1.2**). Transformant *E. coli* hücrelerinin çoğaltılması ile rekombinant DNA istenilen miktarlarda elde edilebilir. *Escherichia coli* hücreleri sadece rekombinant DNA'ların çoğaltılmasında değil, bu çalışmada olduğu gibi aynı zamanda rekombinant proteinlerin sentez edilmesinde de kullanılmaktadır. Rekombinant DNA molekülleri daha sonra farklı bakterilere ya da mayalar başta olmak üzere diğer ökaryotik organizmalara transfer edilerek enzim, hormon, büyüme faktörleri, kan pıhtılaşma faktörleri, viral antijen proteinleri ve antikorlar gibi pek çok protein rekombinant olarak daha güvenilir ve daha ucuz bir şekilde üretilmektedir (Chu ve Robinson, 2001; Sasaki ve ark., 1987; Walsh, 2006; Walsh, 2014).



Şekil 1.2. Rekombinant bir DNA molekülünün elde edilmesi ve çoğaltılması aşamaları.

Klonlama çalışmalarında kullanılacak vektörlerinin ve ekspresyon sistemlerinin seçilmesinde, klonlanacak genin boyutu, gen üzerinden sentez edilecek protein ürünün yapısı ve aktivitesi, ürünün elde edilme maliyeti gibi birçok faktör göz önünde bulundurulur. Prokaryotik ekspresyon sistemler maliyet açışından daha uzuz ve uygulanabilirliği daha kolaydır. Buna karşın kompleks yapıda proteinler için genellikle uygun sistemler değildir. Bu sistemler daha çok aktif olarak sentez edilebilen küçük proteinler için tercih edilir. Daha kompleks enzim, hormon ya da protein faktörlerin rekombinant olarak sentez edilmesinde ökaryotik organizmalar kullanılır. Örneğin *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris* gibi mayalar, kolay ve düşük maliyet gerektirmesi nedeniyle çokça kullanılır. Bir çok durumda, maya hücreleri de sentez sonrası modifikasyon (post translasyonel modifikasyon) gerektiren kompleks proteinlerin aktif olarak sentez edilmesinde yetersiz kalır. Bu gibi durumlarda daha yüksek maliyet gerektiren ökaryotik hücrelerde ekpresyon sistemlerinin kullanılması gerekir (Dawid ve Wahli, 1979; Demain ve Vaishnav, 2009; Gifre ve ark., 2017).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Amonyum persülfat	Merck, Almanya
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Bis-akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Fenilindiamin	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	Merck, Almanya
Formamid	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Glikoz	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Gümüş nitrat	Merck, Almanya
Hidrojen klorür	Merck, Almanya
İzoamil alkol	Sigma Aldrich, ABD
İzopropanol	Sigma Aldrich, ABD
Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
Mangan klorür	Merck, Almanya
Metil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, ABD
Paranitrofenil asetat	Santa Cruz, ABD
Paranitrofenil laurat	Sigma Aldrich, ABD

Paranitrofenil palmitat	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenglikol-4000	Sigma Aldrich, ABD
Pipes	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum asetat	Merck, Almanya
Sodyum asetat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum azid	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum bikarbonat	Carlo Erba, İtalya
Sodyum dodesil sülfat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum fosfat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Sodyum tiyosülfat	Sigma Aldrich, ABD
Tetrametiletilendiamin	Sigma Aldrich, ABD
Tris	Sigma Aldrich, ABD
Tween 20	Sigma Aldrich, ABD
Triton X-100	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	Sigma Aldrich, ABD
2- β -Merkaptoetanol	Sigma Aldrich, ABD
8-hidroksikinolin	Sigma Aldrich, ABD

2.2. Enzimler

Restriksiyon endonükleazları:

BglI, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, MluI, NcoI, NdeI, XhoI (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleazları genlerin klonlanması çalışmalarında ve elde edilen plazmit DNA'ların kontrol edilmesinde kullanıldı.

DNA modifikasyon enzimleri:

Gen kolonlama çalışmalarınının farklı aşamalarında alkalen fosfataz (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase), Klenow enzimi, RNaz, T4 DNA ligaz (MBI Fermentas, Roche veya New England Biolabs) ve polinükleotid kinaz (New England Biolabs) enzimlerinden yararlanıldı.

Termostabil DNA polimerazlar:

PZR ile genlerin çoğaltılması ve oluşturulan plazmit vektörlerin kontrol edilmesinde, Taq

DNA polimeraz (New England Biolabs veya Biotechrabbit), *Phusion* High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) ve KOD-Plus (Toyobo, Japonya) enzimleri kullanıldı.

Lipaz enzimi

Bakterilerden hazırlanan lizatlarda enzim aktivitesinin belirlenmesi çalışmalarında *Candida rugosa'*dan elde edilen lipaz enzimi (Sigma-Aldrich / ≥700 ünite/mg protein) kullanıldı

2.3. Ticari kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, genomik DNA izolasyon kiti (Invitrogen Cat. No. K1820-01) orta-ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen) ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı.

2.4. Antikorlar

Primer antikor fare monoklonal anti-His (Santa Cruz sc-53073) antikoru kullanıldı. Sekonder Antikor olarak keçi anti-fare IgG-biotin (Millipore: AP124B) ve anti-fare IgG-HRP antikorlarından yararlanıldı. IgG-biyotin kullanılan deneylerde görüntüleme de SA-HRP konjugatı kullanıldı.

2.5. Cihazlar

Bakteriyolojik Etüv	Memmert, Almanya
Çalkalayıcı Su Banyosu	GFL, Almanya
Derin dondurucu (-80°C)	Panasonic, Japonya
Dikey Jel Elektroforez Cihazı	Bio-Rad, ABD
Hassas Terazi	Shimadzu, Japonya
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Mikrosantrifüj	Eppendorf, Almanya
Otoklav	Kermanlar, Türkiye
pH metre	Hanna instruments, Portekiz
PZR Cihazı	ABI : ABD / Techne : ABD
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, ABD
Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec-1601, Japonya

Steril Çalışma Kabini	Holten, Danimarka
Sterilizatör	Heraeus, Almanya
Su Banyosu	GFL-Thermolab, Almanya
Tüp karıştıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Yatay Jel Elektroforez Cihazı	Labnet, ABD

2.6. Besiyerleri

2.6.1. Luria bertani (LB) besiyeri

10 g tripton (Bacto), 5 g maya özütü (Bacto) ve 10 g sodyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 1 litreye tamamlandı (Maniatis ve ark., 1982).

2.6.2. Luria bertani agar (LBA) besiyeri

LB sıvı besiyerine % 1.5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı.

LB ve LBA besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 ºC'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Gerektiğinde besiyerlerine 100 µg/ml final konsantrasyonu verecek şekilde stok ampisilin çözeltisinden (100 mg/ml) eklendi .

2.7. Çözeltiler

2.7.1. Akrialmid/bis-akrilamid çözeltisi (% 29 akrilamid / % 1 bis-akrilamid–a/h)

29 g akrilamid ve 1 g bis-akrilamid deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçirildi.

2.7.2. Amonyum persülfat çözeltisi (% 10 – a/h)

1 g amonyum persülfat, deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 10 ml'ye tamamlandı.

2.7.3. Bloklama çözeltisi (% 5 lik yağsız süt tozu)

25 g yağsız süt tozu, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 474 ml'ye

tamamlandı. Çözeltiye 25 ml 20x TBS ve 1 ml % 10 Sodyum Azid (NaN_3) eklendi.

2.7.4. Etidyum bromür (10 mg/ml)

0.1g etidyum bromür, 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

2.7.5. %70 Etil alkol

70 ml saf etil alkol, deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

2.7.6. Etilendiamintetraasetik asit (edta) çözeltisi (0.5 m, ph: 8.0)

186.1 g EDTA, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Pellet halde NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildi (EDTA. Mw = 372.2).

2.7.7. Fenol : kloroform : izoamil alkol (25:24:1)

Kristal halde fenol, 65 ^{o}C'da çözündürüldü ve oksidasyonu önlemek için ortama % 0.1 (a/h) konsantrasyonda 8-hidroksikinolin eklendi. Fenol üzerine eşit hacimde 0.5 M Tris-Cl tamponu (pH:8) eklendi ve 30-60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için, emülsiyon 4 ^{o}C'da bekletildi ve üst faz bir su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0.1 M Tris-Cl tamponu ile fenolün pH değeri >7.8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık % 90'ı uzaklaştırıldı ve 4 ^{o}C'da saklandı. Tris-Cl tamponu ile doyurulmuş fenol, 25:24:1 (F:K:İ) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanıldı (Maniatis ve ark., 1982).

2.7.8. Glikoz çözeltisi (1 M)

90 g glikoz, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi (Glikoz Mw=180.16).

2.7.9. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)

75 ml deiyonize distile suya 29.56 g (25 ml) % 37'lik (w/w) HCl çözeltisi eklenerek hazırlandı (Hidroklorik asit. Mw=36.46; 1.186 g/ml).

2.7.10. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M)

100 g kalsiyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 300 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildi (Kalsiyum klorür. Mw = 110.98).

2.7.11. Mangan klorür çözeltisi (0.55 M)

54.4g $MnCl_2$.4H2O, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı ($MnCl_2$.4H2O. Mw = 197.9).

2.7.12. PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) çözeltisi (1 M)

30.2g PIPES, 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7.5'e ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı (PIPES. Mw = 302.37).

2.7.13. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 – a/h)

40 g PEG-4000, deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 100 ml tamamlandı. Çözelti 0.45 µm filtre ile filtre edildi.

2.7.14. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M)

% 40 PEG-4000 çözeltisi ve 2.5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı.

2.7.15. Potasyum asetat çözeltisi (3 M)

29.44 g potasyum asetat, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı (Potasyum asetat. Mw= 98.14).

2.7.16. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M)

93.2 g potasyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı (Potasyum klorür. Mw= 74.55).

2.7.17. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10 –a/h)

10 g SDS, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2.7.18. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)

8 g sodyum hidroksit, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı (Sodyum hidroksit. Mw=39.99).

2.7.19. Bradford reaktifi

25 mg coomassie brilliant blue G-250 12.5 ml %99.9'luk etanolde çözündürüldü. Üzerine 25 ml % 85'lik H_3PO_4 eklenerek x5 konsantre boya çözeltisi hazaırlandı. Kullanılacağı zaman deiyonize distile su ile 5 kez seyreltildi ve filtre kağıdından geçirildikten sonra kullanıldı.

Gümüş nitrat - formaldehit çözeltisi (%0.1, a/h - %0.075, h/h)

0.1 gr gümüş nitrat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 200 µl %37'lik formaldehit eklendi.

Görüntüleme çözeltisi (%2 sodyum karbonat, a/h - %0.04 formaldehit, h/h - %0,0004 sodyum tiyosülfat, a/h)

2 gr sodyum karbonat deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 200 µl %37'lik formaldehit ve 40 µl %1'lik sodyum tiyosülfat (a/h) eklendi.

Metanol : glasiyel asetik asit çözeltisi (%50 matanol, %10 glasiyel asetik asit)

40 ml deiyonize distile su, 50 ml metanol ve 10 ml glasiyel asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

2.7.20. P-nitrofenil laurat (10 mm)

32.14 mg p-nitrofenil laurat 10 ml formamid içerisinde çözündürüldü, 0.5 ml'lik hacimler halinde -20 °C'da saklandı (PNPL, Mw: 321.41).

2.7.21. P-nitrofenil asetat (10 mm)

18.1 mg p-nitrofenil asetat 10 ml etil alkol içerisinde çözündürüldü ve deneylerde kullanıldı (pNFA, Mw: 181).

2.7.22. P-nitrofenil palmitat (10 mm)

38 mg p-nitrofenil palmitat 10 ml izoprpil alkol içersinde içerisinde çözündürüldü ve deneylerde kullanıldı (pNFP, Mw: 377.52).

2.8. Tamponlar

2.8.1. Bakteri transformasyon tamponu

2 ml 1 M pipes, 2 ml 2.5 M $CaCl_2$, 20 ml 2.5 M KCl ve 150 ml deiyonize distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6.7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 20 ml 0.55 M $MnCl_2$ eklendi, hacmi deiyonize distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0.2 μm fitreden geçirilerek steril edildi.

2.8.2. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0)

5 ml 1 M Tris-Cl, 10 ml 1 M glikoz ve 4 ml 0.5 M EDTA çözeltisi karıştırıldı, deiyonize distile su ile hacmi 200 ml'ye tamamlandı.

2.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu II (0.2 N NaOH, % 1 SDS)

Bir hacim 2 N NaOH, 1 hacim % 10 SDS çözeltisi ve 8 hacim deiyonize distile su karıştırılarak hazırlandı.

2.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum / 5 M Asetat)

60 ml 5 M potasyum asetat ve 11.5 ml glasiyal asetik asit, deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (Potasyum asetat. Mw = 98.14).

2.8.5. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu

25 mg bromofenol mavisi 6.55 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 3.45 ml % 87'lik gliserin eklenerek hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

2.8.6. 4x Konsantre ayırma jel tamponu (1.5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8.8)

91 g Tris ve 2 g SDS, 400 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 8.8'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

2.8.7. 4x Konsantre paketleme jel tamponu (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH :6.8)

6.5 g Tris ve 0.4 g SDS, 80 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 6.8'e ayarlandı ve hacmi deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.8.8. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M Tris; % 8 SDS – a/h; % 0.2 Bromophenol mavisi – a/h ; % 4 2-Merkaptoetanol - h/h; % 40 Gliserin– h/h, pH:6.8)

1.21 g Tris, 4 g SDS ve 0.1 g bromofenol mavisi, 20 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve üzerine 2 ml 2-Merkaptoetanol ile 23 ml % 87'lik gliserin eklendi. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 6.8'e ayarlandıktan sonra deiyonize distile su ile hacim 50 ml'ye tamamlandı.

2.8.9. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0.125 M Tris,1.25 M Glisin, pH:8.3)

15.15 g Tris ve 93.84 g glisin, deiyonize su içinde çözündürüldü, pH'sı 8.3'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı (Glisin. Mw = 75.07).

2.8.10. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 – a/h SDS, pH 8.3)

200 ml 5x tris-glisin tamponu, deiyonize distile su ile 990 ml'ye tamamlandı, üzerine 10 ml % 10 SDS eklendi.

2.8.11. Protein transfer tamponu

200 ml 5x tris-glisin tamponu, 100 ml metanol deiyonize distile su ile 1litreye tamamlanarak hazırlandı.

2.8.12. Sodyum asetat tamponu (3 M)

12.3 g sodyum asetat ($CH_3COONa.3H_2O$), 40 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 5.2'ye ayarlandıktan sonra 50 ml'ye tamamlandı (Soydum asetat. Mw: 82.03).

2.8.13. 50x Konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu

242 g Tris, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0) eklendi. Elektroforez işleminde 1:50 oranında sulandırıldıktan sonra kullanıldı.

2.8.14. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8.0)

121. g Tris, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. 3 N HCl çözeltisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Tris-Cl tamponu otoklavda 121 ^{o}C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi (Tris. Mw = 121.1).

2.8.15. Tris/EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH : 8.0)

10 ml 1 M Tris-Cl tamponu (pH: 8.0) ve 2 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0), deiyonize distile su ile 1litreye tamamlanarak hazırlandı.

2.8.16. 20x Konsantre TBS tamponu

160 g NaCl, 4 g KCl ve 60 g Tris, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH'sı 7.4'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Tampon otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

2.8.17. TBS ve TBS-T tamponu

50 ml 20x TBS tamponu, deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
TBS-T tamponu için ortama 10 ml % 10 Tween-20 eklendi.

2.9. Plazmit vektörler

Escherichia coli hücrelerinde, *Bacillus safensis, Bacillus licheniformis ve Haloarcula hispanica* lipaz genlerini ekspresse edecek vektörlerin oluşturulmasında pET-14b (Novagen), pGFP (Clontech) ve pGEX-6p1 (GE Healthcare) plazmitlerinden yararlanıldı.

2.10. Çalışmada kullanılan oligonukleotid primerler

Bakteri lipaz genlerinin PZR ile çoğaltılmasında ve DNA dizi analizlerinde **Tablo 3.1** verilen

oligonukleotid primerler kullanıldı.

Tablo 2.1. Lipaz genlerinin PZR ile çoğaltılması, vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ve oluşturulan plazmit vektörlerin DNA dizi analizleri ile kontrolünde kullanılan olionukleotid primerler.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi
lcf-LipC-For	5'- ATGAACATACGTTTTATTACAGTC-3'
lcf-LipC-For-minus	5'- ACATACGTTTTATTACAGTCATG-3'
lcf-LipC-Rev	5'- TTATTCTGCTGGGAGGTCTTCG -3'
hh-LipC-For	5'- ATGACAGATACCGCTCCCGAGTCGG-3'
hh-LipC-For-minus	5'- CAGATACCGCTCCCGAGTCGG-3'
hh-LipC-Rev	5'- TCAGAATCCGGGGCCGTCGCGG-3'
sfn-LipC-For	5'- ATGAAGGCTCGTTTGATTGTGATTG-3'
sfn-LipC-For-minus	5'- AGGCTCGTTTGATTGTGATTG-3'
sfn-LipC-Rev	5'- CTATTCCTTCGGCAGTCCTTC-3'
Vector-GFP-For	5'- CATTCGTAGAATTCCAACTG-3'
Vector-GFP-Rev	5'- AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG-3'
Vector-GFP-seq-For	5'- TTATGCTTCCGGCTCGTATG-3'
Vector-GFP-seq-Rev	5'- GACAAGTTGGTAATGGTAGC-3'
pGEX-Vec-For	5'- CTGACGATCTGCCTCGCGC-3'
pET-seq-For	5'- AGGGAGACCACAACGGTTTC-3'

2.11. Agaroz jellerin hazırlanması ve elektroforez

Çalışmada kullanılan DNA moleküllerinin analizinde % 1-1.5'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. Analiz edilecek DNA moleküllerinin boyutuna göre 1 ya da 1.5 g agaroz 100 ml 1x TAE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 55-60 ^{o}C'a düştüğünde 0.1-0.2 µg/ml final konsantrasyonda etidyum bromür eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel, donduktan sonra TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında 6x konsantre DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit direnç altında 20-25 dakikada tamamlandı. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

2.12. Transformasyon için *Escherichia coli* hücrelerinin kompetent hale getirilmesi

Plazmitlerin üretilmesinde konak bakteri olarak *Escherichia coli* Mach1 ırkı kullanıldı. Halofilik bakterilere özgü genlerin eskpresyonunda ise *E. coli* Mach1 ile birlikte TOP10, JM107 ve DH5α suslarından yararlanıldı. Bu nedenle bu bakteri suşları plazmit transformasyonu için kimyasal yöntemle kompetent hale getirldi. Bunun için, -80 ^{o}C'da saklanan bakteri stoklarında LBA katı besiyerine öze ile ekim yapıldı ve 37 ^{o}C'da bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan kültürlerden birer koloni alındı ve ampisilin içermeyen 5 ml LB sıvı besiyerlerine ekim yapıldı. Kültürler 37 ^{o}C'da 150 dev./dk çalkalama hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan bu ön kültürler 150 ml taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 23 ^{o}C'da 150 dev./dk çalkalanma hızında üremeye bırakıldı. Kültürler, OD_{600} ~ 0.25 - 0.3 değerine eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültürler 4 ^{o}C'da 10 dakika, 4000 dev./dk hızda santrifüj edilerek bakteriler çökeltildi. Çökeltiler, 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve 15-20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 4000 dev./dk hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 10 dakika ara ile iki kez 350 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere – 80 ^{o}C'da saklandı (Inoue ve ark., 1990).

2.13. Bakterilerden genomik DNA izolasyonu

Bacillus safensis, Bacillus licheniformis ve Haloarcula hispanica hücrelerine ait genom DNA'ları ticari DNA izolasyon kiti (Invitrogen Cat No. K1820-01) kullanılarak elde edildi. *B. safensis* ve *B. licheniformis* hücreleri 5 ml Kompleks Besiyeri I (KBI) besiyerine ekildi 37° C'da 24 saat üretildi. *Haloarcula. hispanica* kültürü ise 100 ml Brown besiyerinde (Ozgen ve ark., 2016) 30 °C'da 15 gün süre ile inkübe edilerek hazırlandı ve bu kültürun 5 ml'si DNA izolasyonunda kullanıldı. Kültürler oda sıcaklığında 7500 dev./dk hızda, 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Elde edilen hücrelerden DNA izolasyonunda kit için belirlenen metot izlenerek DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

2.14. Lipaz kodlayan DNA fragmentinin PZR ile çoğaltılması ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılması

Halofilik bakteri lipaz genleri, bu bakterilerden izole edilen genomik DNA üzerinden, Tablo 1'da olignükleotid primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Bunun için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı. *Bacillus safensis* geni için *sfn-LipC-For (sfn-LipC-For-minus) / sfn-LipC-Rev* primer çifti; *Bacillus licheniformis* geni için *lcf-LipC-For (lcf-LipC-For-minus) / lcf-LipC-Rev.* primer çifti *ve Haloarcula hispanica* geni için ise *hh-LipC-For (hh-LipC-For-minus) / hh-LipC-Rev* primer çifti kullanıldı. Primerler kullanılmadan önce T4 polinukleotid kinaz enzimi kullanılarak fosforillendi (Uğurlu, 2016).

PZR için reaksiyon karışımı:

Kalıp DNA (~25 ng/µl)	*: 2.0 µl*
İleri primer (10 pM/µl)	*: 2.0 µl*
Geri Primer (10 pM/ µl)	*: 2.0 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM)	*: 4.0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	*: 2.0 µl*
Reaksiyon tamponu (x10)	*: 4.0 µl*
Deiyonize distile su	*: 24.0 µl*
KOD plus (1U/µl)	*: 0,5 µl*
Toplam hacim	***: 40.0 µl***

Deneylerde enzim olarak KOD plus (Toyobo) ve *Phusion* High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) denendi. KOD plus ile daha iyi sonuç alındığı için bu enzim kullanılarak lipaz genleri PZR ile çoğaltıldı. PZR koşulları her üç bakteri suşına ait jeller için ayrı ayrı belirlendi. PZR koşulları, 95 °C sıcaklıkta 2 dakikalık ön denatürasyon sonrasında, 32 döngü, "95 °C'da 20 saniye, 60 °C (*B. safensis*) / 55 °C (*B. licheniformis*) / 57 °C (*H. hispanica*)'da 20 saniye ve 72 °C 1 dakika" olarak belirlendi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Sonrasında, DNA örnekleri fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. Bunun için, PZR ürünlerinin hacmi 100 µl'ye tamamlandı, üzerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Ortam 14.000 dev./dak. hızda, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0.1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2.5 hacim saf etil alkol eklendi. Örnekler 10 dakika

buz üzerinde bekletildi ve 4 °C'da 15 dakika 14.000 dev./dak. hızda santrifüj edilerek DNA çökeltildi. DNA çökeltisi % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu, 15 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Bunun için örneklerin üzerine 3 µl 6x konsantre DNA yükleme tamponu eklendi ve % 1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içerisinde 100 V sabit direnç altında 20-25 dakikada tamamlandı. Agaroz jel ile ayrıştırılan DNA fragmentleri DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) ile saflaştırıldı. Bunun için üretici firmanın önerdiği yöntem izlendi. 30 µl elüsyon tamponu ile elüe edilen DNA örnekleri ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

2.15. His uzantılı lipaz kodlayan DNA fragmentlerinin plazmitler üzerinden türetilmesi

pGFP ve pGEX-6p-1plazmitlerine klonlanan x6 his uzantılı lipaz genleri, çalışmada oluşturulan pET-14b-his-LipC plazmit vektörlerinden NcoI ve XhoI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek elde edildi. Bunun için 5 µg plazmit DNA'sına deiyonize distile su ile eklenerek 45 µl hacime tamamlandı. Ortama 5 µl x10 reaksiyon tamponu, 10 U (1 µl) NcoI ve XhoI enzimlerinden eklendi. Reaksiyon ortam 37 ºC'da 1-2 saat bekletidi. Kesim işlemi sonrasında reaksiyon hacmi deiyonize distile 100 µl'ye tamamlandı ve 5.14'de verildiği gibi fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi. DNA Etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltileri 15 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve agaroz jele uygulandı. Agaroz jel üzerinde ayrıştırılan lipaz gen fragmentleri DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) ile saflaştırıldı.

2.16. pET-14b, pGEX-6p-1 ve pGFP plazmit DNA'larının ligasyon için hazırlanması

Çalışmada kullanılan plazmitlerden pET-14b plazmiti NcoI ya da NdeI restriksiyon enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirildi ve yapışkan uçlar Klenow enzimi ile küt uçlu hale getirildi. Bu işlemler için 5 µg plazmit DNA'sı, deiyonize distile su ile 45 µl'ye tamamlandı, üzerine 5 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu ve 1 µl (10U) NcoI ya da NdeI restriksiyon endonükleaz enzimi eklendi ve 37 ^{o}C'da 1 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'ların kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Reaksiyon ortamı, restriksiyon enzimlerini inaktive etmek amacıyla 20 dakika 80 ^{o}C'da bekletildi. İnaktivasyon sonrası reaksiyon ortama 2.5 µl 2 mM dNTP ve 1 µl (1U) Klenow enzimi eklendi ve ortam 30 dakika

37 ^{o}C'da inkübe edildi. DNA örneği **5.14**'de belirtildiği şekilde fenol:kloroform.izoamil alkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çökeltildi. Çökelti, 45 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Plazmit DNA'nın defosforilasyonu için örnek üzerine 1:10 oranında 10x konsantre SAP (Shrimp Alkalene Phosphatase) tamponu ve 2 µl (2U) SAP eklendi ve 37 ^{o}C'da 1 saat inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA örneği fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltisi 30 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 ^{o}C'da saklandı.

pGEX-6p-1 ve pGFP plazmitleri, pET-14b'den farklı olarak inverz (ters) PZR tekniği ile doğrusal hale getirildi. Bunun için pGEX-6p1 vektöründe glutatyon-S-transferaz (GST) kodlayıcı DNA dizisi dışında kalan kısım PZR ile çoğaltılmasında Tablo1'de dizisi verilen pGEX-Vec-For ve Vector-GFP-Rev primer çifti; pGFP vektöründe GFP kodlayıcı DNA dizi dışında kalan bölüm ise Vector-GFP-For ve Vector-GFP-Rev primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Ters PZR için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

PZR için reaksiyon karışımı:

pGFP ya da pGEX-6p1 *(10 ng/µl)*	*: 2.0 µl*
pGEX-Vec-For ya da Vector-GFP-For (10 pM/µl)	*: 2.0 µl*
Vector-GFP-Rev (10 pM/µl)	*: 2.0 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM)	*: 3.0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	*: 2.0 µl*
Reaksiyontamponu (x10 konsantre)	*: 4.0 µl*
Deiyonize distile su	*: 24.0 µl*
KOD plus (1U/µl)	*: 1.0 µl*
Toplam hacim	***: 40.0 µl***

PZR koşulları; pGEX-6p1 plazmit vektörü için 95 °C'da 3 dakika ön denatürasyon; 32 döngü, 95 °C'da 20 saniye - 56 °C'da 20 saniye - 68 °C'da 4 dakika; 1 döngü, 68 °C'da 10 dakika; pGFP plazmit vektörü için ise 95 °C'da 3 dakika ön denatürasyon; 32 döngü, 95 °C'da 20 saniye - 52 °C'da 15 saniye - 68 °C'da 3 dakika; 1 döngü, 68 °C'da 10 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Örnekler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltileri 15 µl TE içerisinde çözündürüldü ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) ile

saflaştırıldı. Bunun için üretici firmanın önerdiği yöntem izlendi. 30 µl elüsyon tamponu ile elüe edilen DNA örnekleri ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

2.17. Doğrusal Hale Getirilen pET-14b, pGEX ve pGFP Plazmit Vektörlernin Lipaz Kodlayan DNA Fragmentleri ile ligasyonu ve transformasyon.

3.14, **3.15** ve **3.16'**da belirtildiği şekilde hazırlanan lipaz kodlayıcı DNA fragmentleri ile doğrusal hale getirilen plazmit DNA'larının yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Ligasyon işlemi 10 µl hacim içerinde T4-DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Yaklaşık 20-30 ng plazmit DNA'ları, 40-50 ng lipaz kodlayıcı DNA karıştırıldı ve ortam hacim deiyonize distile su ile 5 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına eşit hacimde ligasyon kiti (TaKaRa) eklendi ve 15 ^{o}C'da 15-16 saat inkübe edildi. Bazı denelerde T4-DNA ligaz enzimi (Invitrogen) kullanıldı. Bu durumlarda DNA karışımı deiyonize distile su ile 8 µl'ye tamamlandı, üzerine 2 µl 5x konsantre tampon ve 1 µl T4-DNA ligaz enzimi eklendi. Ligasyon 15 ^{o}C'da 15-16 saat sürede tamamlandı. Transformasyon için ligasyon ürünleri 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. Üzerine daha önce **5.12**'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kompetent *E. coli* Mach1 hücrelerden 100 µl eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 1 dakika 42 ^{o}C'da su banyosunda, 2 dakika buz üzerinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Transformasyon ortamına 500 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 ^{o}C'da 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücre süspansiyonundan 150 µl, antibiyotikli LBA besiyerine cam baget ile yayılarak ekildi ve 37 ^{o}C'da 1 gece üremeye bırakıldı. Plazmit alan, pozitif transformant koloniler, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi ve bu kolonilerden 5 ml sıvı kültürler hazırlanarak küçük ölçekte plazmit DNA'ları hazırlandı.

2.18. Koloni-PZR yöntemi ile pozitif kolonilerin saptanması

Transformasyon sonrası, her bir ligasyon örneği için katı besiyerlerinde oluşan kolonilerden ortalama 10-15 koloni, steril kürdan ile alınarak 5 µl deiyonize distile su içerinde süspanse edildi. Hücrelerin parçalanmasını sağlamak amacıyla örnekler PZR cihazında 95 ^{o}C'da 5 dk bekletildikten sonra buz üzerine alındı. Örneklerin üzerine 2 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 1 µl (10 pmol/µl) hedef bölgesi vektör içerisinde olan ileri primer, 1 µl (10 pmol/ µl) hedef bölgesi lipaz geni içerisinde olan geri primer, 1 µl dNTP (2 mM), 2 µl $MgCl_2$ (25

mM), 8 µl deiyonize distile su ve 0.2 U Taq DNA polimeraz (5U/µl) (NEB ya da Rabbitbiotech) eklendi (Fazla sayıda örnekle çalışıldığı için örnek sayısıyla orantılı olarak bir karışım hazırlandı ve bu karışımdan her bir PZR tüpüne 15 µl eklendi). PZR koşulları 95 ^{o}C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 32 döngü, 94 ^{o}C-15 sn/ 50-55 ^{o}C-15 sn/ 72 ^{o}C-2 dakika olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

2.19. Rekombinant plazmitleri taşıyan bakterilerden küçük ölçekte DNA izolasyonu.

Koloni-PZR sonucunda pozitif sonuç veren bakteri kolonilerinden 5 ml doygun kültürler hazırlandı. Bu koloniler steril kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine aktarıldı ve 37 °C'da 120 dev./dk çalkalanma hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler 6000 dev./dk hızda 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Hücre çökeltisi, 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 200 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanan hücrelerin üzerine 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 10 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4 ^{o}C'da, 15000 dev./dk hızda 15 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA'sını içeren üst sıvı üzerine 2.5 hacim etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20 ^{o}C'da, 14000 dev./dk hızda 15 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltildi. DNA çökeltisi % 70 etil alkol ile yıkandı ve kurutulduktan sonra 50-100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre uygun restriksiyon endonükleazları ile kesilerek ikinci kez kontrolleri yapıldı. DNA örnekleri PEG/NaCl çözeltisi ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı (Çağlayan, 2014; Pirinçal, 2014) ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

2.20. Küçük ölçekte plazmit DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi

Küçük ölçekte elde edilen pET-14b-LipC ve pET-14b-his-LipC plazmit DNA'ları NcoI ve NdeI restriksiyon enzimleri ile, pGFP-his-LipC ve pGEX-his-LipC plazmit DNA'ları ise NcoI ve XhoI restriksiyon enzimi ile kesilerek kontrol edildi. Bunun için 3-4 µl (~300-400 ng) plazmit DNA örneği deiyonize distile su ile 18 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına 2 µl

10x tampon ve 3-5U (0.3-0.5 µl) enzim eklendikten sonra 37 ^{o}C'da 1-2 saat bekletildi. Sonrasında 4-5 µl 6x konsantre DNA yükleme tanponu ile karıştırıldı ve %1'lik agaroz jele uygulandı. **5.11**'de belirtildiği şekilde elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

2.21. DNA dizi analizleri

PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırılan plazmit örneklerinde lipaz genlerinin nukleotid dizileri DNA dizi analizi tekniği (Sanger tekniği) ile analiz edildi. DNA dizi analizleri için ticari bir firmadan hizmet alımı yapıldı.

2.22. Bradford yöntemi protein bsa standart grafiğinin hazırlanması ve protein miktar tayini

Bakteri kültürlerinden hazırlanan lizatlarda total protein miktarları Bradford metodu ile belirlendi. Bunun için bovin serum albümin (BSA) proteini standart olarak kullanıldı. 100 µl deiyonize distile su içerisinde belirli miktarlarda BSA içeren çözeltiler (1-20 µg) hazırlandı. Hazırlanan BSA çözeltilerine 1 ml Bradford belirteci eklendi ve karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra, 595 nm dalga boyunda optik densiteleri (OD_{595}) ölçüldü. Elde edilen değerler ve BSA miktarları ile standart protein grafiği oluşturuldu. Standart grafiğin eğim formülü, bilinmeyen protein örneklerinin konsantrasyonlarının saptanmasında kullanıldı.

2.23. Halofilik bakteri lipaz enzimlerinin *E. coli* hücrelerinde sentezinin SDS-PAGE ile analiz edilmesi

Lipaz genleri klonlanan plazmit vektörler ile transforme edilen *E. coli* hücrelerinde rekombinant lipaz enzimi sentezi *sodium dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi* (SDS-PAGE) tekniği ile incelendi. Elektroforez sonrası proteinler gümüş boyama tekniği ile görüntülendi. His uzantılı lipaz enzimleri ise Western melezleme tekniği ile de incelendi.

2.23.1. Protein analizi için hücre lizatlarının hazırlanması

Lipaz geni aktarılan *E. coli* hücrelerinin ampisilin içeren 5 ml LB besiyerinde doygun kültürleri hazırlandı. Kültürlerden alınan 1 ml'lik örnekler 7500 dev./dk hızda santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Hücre çökeltileri 100 µl distile su içerisinde süspanse edildi ve

üzerine eşit hacimde 4x konsantre SDS örnek yükleme tamponu eklendi. Örnekler 10-15 kez insulin iğnesinden geçirildi ve 95 ºC'da bekletildi. Daha sonra 15.000 dev./dk hızda santrifüj edildi ve üst sıvı SDS-PAGE ile incelendi.

2.23.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması

Protein elektroforezi için 100x100x0.8 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller % 10'luk ayırma ve % 5'lik paketleme jeli olarak iki kısım halinde hazırlandı. Jellerin % 10'luk akrilamid içeren birinci bölümü (ayırma jeli); 2 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1.5 ml 4x konsantre ayırma jel tamponu, 2.5 ml deiyonize distile su, 60 µl APS (%10 – w/v) ve 30 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı ve jel kasetlerine döküldü. Jel yüzeyine 300-500 µl deiyonize distile su yayılarak yüzeyin düzgün polimerize olması sağlandı. Daha sonra jeller 20-30 dakika oda sıcaklığında polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel yüzeyindeki su alınarak ikinci bölüm jel için hazır hale getirildi. % 5'lik akrilamid içeren jellerin ikinci bölümü (paketleme jeli); 1 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1.25 ml 4x konsantre paketleme jel tamponu, 2.75 ml deiyonize distile su, 60 µl APS (%10 – w/v) ve 30 µl TEMED ile karıştırılarak hazırlandı. Karışım daha önce hazırlanan ayırma jeli üzerine döküldü, jel tarakları yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerizasyonu sağlandı.

2.23.3. Proteinlerin jelde yürütülmesi

5.21.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan örnekler, 1-10 µl (2-20 µl) arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez işlemi, poliakrilamid jel elektroforez tamponu ile dolu tank içerisinde herbir kaset için ilk 20 dakika 40 volt, daha sonra 80 volt gerilim altında yaklaşık 2-3 saatte tamamlandı. Elektroforez sonrası, jeller ya gümüş boyama ile boyandı ya da proteinler nitrosellüloz membranlara transfer edildilerek Western melezleme işlemi gerçekleştirildi.

2.23.4. Jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması

Poliakrilamid jellerde ayrıştırılan daha az miktarlarda proteinlerin analiz edilmesi için gümüş boyama yöntemi uygulandı. Elektroforez işleminden sonra jel gümüş boyama ile boyandı (Hakkıoğlu, 2017; İbişoğlu, 2015). Bunun için jel metanol:glasiyel asetik asit çözeltisi (%50:%10) içerisinde 2 saat, daha sonra %50'lik metanol içerisinde 20 dakika inkübe edildi. Jel 100 ml deiyonize distile su içerisinde hafifçe karıştırılarak 20 dakika süre ile 2 kez

yıkandı. Yıkamanın ardından %0.02'lik sodyum tiyosülfat ile 2 dakika muamele edildi ve 100 ml deiyonize distile su ile 2 kez yıkandı. Jel karanlıkta % 0.1 gümüş nitrat % 0.074 formaldehit çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildi ve deiyonize distile su içerisinde 2-3 dakika süre ile tekrar yıkandı. Jeller görüntüleme çözeltisinde (%0.04 formaldehit, %2 sodyum karbonat, %0.0004 sodyum tiyosülfat) bekletilerek protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlandı. Jel metanol:glasiyel asetik asit çözeltisine alınarak reaksiyon durduruldu ve dijital kamera ile görüntüsü alındı.

2.23.5. Proteinlerin nitrosellüloz membrana transfer edilmesi ve Western melezleme

Elektroforez ile jel üzerinde ayrılan proteinler nitrosellüloz membranlara transfer edildi. Bunun için transfer kasetleri arasında "sünger-filtre kağıdı-nitrosellüloz membran-jel-filtre kağıdı-sünger" sırasına göre transfer sandviçi hazırlandı. Hazırlanan transfer sandviçi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi ve ısınmayı önlemek için buz aküleri ile soğutulan ortamda 45 dk 45 voltta ve 90 dk 90 voltta transfer işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra membranlar, iki saat süre ile bloklama solüsyonu içerisinde 1/500 oranında sulandırılan fare orijinli monoklonal anti-his antikoru etkisinde bırakıldı. Primer antikor uygulaması sonrasında membranlar üç kez 20 dakika TBS-T ile yıkandı ve 30 dakika 1/4000 oranında TBS içerisinde sulandırılan yaban turpu peroksidazı (*İng*. HRP: *horseradish peroxidase*) bağlı keçi anti-fare IgG antikorları (Invitrogen/Thermo; 31420) ile işleme kondu. İşlemin sonrası membranlar üç kez 20 dakika TBS-T ile yıkandı. Proteinler kemilüminesens substrat (GE Healthcare, RPN2235) ile görüntülendi. Görüntülemede kemilüminesens tarayıcı cihaz (C-DiGit Blot Scanner, LI-COR) ya da jel görüntüleme cihazı (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) kullanıldı.

2.24. Ticari olarak temin edilen *Candida rugosa'*ya ait lipaz enziminin spesifik aktivitesinin belirlenmesi

Ticari olarak temin edilen *C. rugosa* lipaz enziminin (Sigma, L1754) spesifik aktivitesi, pNFL kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Bunun için 1 ml 0.2 mM final konsantrasyonda pNFL içeren Tris-$CaCl_2$ tamponuna 10 µl (0.5 µg enzim/protein) lipaz enzim çözeltisi eklenerek bir dizi reaksiyon karışımı hazırlandı. Örneklerin bir serisi 0. dakikada, diğer iki serisi ise 37 °C'da su banyosunda 5 dakika ve 10 dakika inkübe edildikten

sonra, 80 °C'da 5 dakika bekletilerek reaksiyon durduruldu. Örneklerin OD_{405} değerleri belirlendi. Elde edilen değerlerden oluşturulan grafiğin eğim förmülünden 1 dakikada (dT) optik densitede meydana gelen değişim saptandı. Aşağıda verilen formül üzerinden serbestleşen ürün konsantrasyonu hesaplandı. 0.5 µg enzim/protein ile 1 dakikada serbestleşen ürün miktarı üzerinden spesifik aktivite hesaplandı.

$$A = \varepsilon.c.l \rightarrow c = A/\varepsilon..l$$

***A**, (ΔOD_{405}/dak); ε, molar absorbsiyon katsaysı; **c**, konsantrasyon; l,işik yolu (1 cm)*

2.25. *Candida rugosa'*ya ait lipaz enzimi ile standart aktivite grafiğinin hazırlanması

Halofilik bakteri lipaz genleri aktarılan *E. coli* hücrelerinde lipaz aktivitelerinin kantitatif olarak değerlendirilmesinde *C. rugosa* lipaz enziminden (Sigma, L1754) yararlanıldı. Bu nedenle yukarıda belirtildiği şekilde spesifik aktivitesi saptanan *C. rugosa* lipaz enzimi için, substrat olarak pNFL kullanılarak spektrofotometrik yöntemle starndart grafik hazırlandı. Bunun için 0-25 ng arasında değişen miktarlarda enzim (protein) içeren 980 µl Tris-$CaCl_2$ tampon çözelti serileri hazırlandı. Örnekler, 20 µl 10 mM pNFL substrat çözeltisi eklendikten sonra reaksiyon için 37°C'da bekletildi. Örneklerin bir serisi 30 dakika, diğer serisi ise 60 dakika sonra 80 °C'da su banyosunda 5 dakika bekletilerek reaksiyon durduruldu. Örneklerin OD_{405} değerleri belirlendi. Elde edilen değerlerden starndart grafikler oluşturuldu.

2.26. Plazmit aktarılan *E. coli* hücrelerinden enzim aktivite testleri için lizat hazırlanması

Lipaz geni aktarılan *E. coli* hücreleri ampisilin içeren 100 ml LB besiyerlerinde üretilerek doygun kültürler hazırlandı. Negatif kontrol için *E. coli* hücreleri ampisilin içermeyen LB besiyerlerinde üretildi. Kültürler 4 ºC'da 7500 dev./dk hızda santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Hücre çökeltileri 40 ml steril deiyonize distile su içerisinde süspanse edildi ve yeniden santrifüj edilerek besiyerinden arındırıldı. Hücre çökeltileri 5 ml soğuk Tris-$CaCl_2$ tamponunda (pH:7) süspanse edildi. Hücre süspansiyonları gücü % 80'e ayarlı bir sonikatör (Bandalin) ile, buz üzerinde 10 saniye sonikasyon, 10 saniye bekleme döngüleri halinde 10 dakika süre ile sonike edildi. Elde edilen lizatlar küçük hacimler halinden -80 ^{o}C'da muhfaza edildi. Hazırlanan örnekler, Bradford ile protein miktar tayininde, lipaz enzimleri aktivite testlerinde ve SDS-PAGE ile protein analizlerinde kullanıldı.

2.27. *Escherichia coli* hücrelerinden hazırlanan lipaz enzimlerinin aktivitelerinin belirlenmesi

5.25'de belirtildiği şekilde hazırlanan hücre lizatlarında lipaz enzimlerinin aktiviteleri, bilinen standart koşullarla birlikte, sıcaklık, pH ve iyonik kuvvetteki değişikliklerin ve non-iyonik bir deterjan olan Triton X-100'ün enzim aktivitesine etkileri araştırıldı. Buna ek olarak hazırlanan lipaz enzimlerinin farklı substrat tercihleri incelendi.

2.27.1. Bilinen standart koşullarda lipaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Escherichia coli hücrelerinden hazırlanan lipaz enzimlerinin aktiviteleri substrat olarak p-nitrofenil laurat (PNPL) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle (REF) belirlendi. Bunun için aşağıda verilen total hacmi 1 ml olan reaksiyon karışımları hazırlandı. Kontrol olarak hücre lizati yerine Tris-$CaCl_2$ tamponunda çözündürülerek hazırlanan *Candida rugosa'*ya ait lipaz enzimi çözeltisi (*15 ng protein / 30 µl)* kullanıldı.

Reaksiyon Karışımı:

- ✓ *Tris-$CaCl_2$ tamponu (1M, pH:7)* : *950 µl*
- ✓ *Substrat (10 mM pNPL)* : *20 µl*
- ✓ *Hücre Lizatı (1-2 µg protein/ µl)* : *30 µl*

Total hacim ***:1000 µl***

Hücre lizati ve kontrol enzim çözeltisi eklendikten sonra reaksiyon karışımları 37 ^{o}C'a ayarlı su banyosunda 15-30 dakika inkübe edildi. Sonrasında örnekler enzim inaktivasyonu için 5 dakika 90 ^{o}C'da tutuldu ve 14.000 dev./dak hızda 5 dakika santrifüj edildi. Kör (blank) olarak enzim ya da hücre lizatı içermeyen reaksiyon karışımı kullanıldı. Üst sıvıların 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri (OD_{405}) spektroforometre ile belirlendi. Okunan absorbans değerleri üzerinden, aktivitesi bilinen *Candida rugosa'*ya ait lipaz enzimi ile hazırlanan standart grafik yardımıyla ünite olarak enzim aktiviteleri belirlendi.

2.27.2. *Escherichia coli* hücrelerinden hazırlanan lipaz enzimlerinin farklı sıcaklıklarda aktivite ve stabilitelerinin belirlenmesi

Lipaz ekspresyon plazmitleri taşıyan *E. coli* hücrelerinden hazırlanan lizatlarda lipaz enzimlerinin 30 ^{o}C, 37 ^{o}C ve 55 ^{o}C'da aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile belirlendi. Bunu için **5.26.1**'de belirtilen reaksiyon karışımları hazırlandı ve farklı sıcaklıklarda 30 dakika bekletildi. Sıcakta (90 ºC'da 5 dakika) inaktivasyon ve santrifüj (5 dakika, 14.000 dev./dak) aşamalarından sonra üst sıvıların OD_{405} değerleri belirlendi. Lipaz enzimlerinin sıcakta stabilitelerini saptamak için reaksiyon karışımı substrat eklenmeden 30^{o}C ve 60^{o}C'da 30 dakika bekletildi ve daha sonra substrat (PNPL) eklenerek aktiviteleri ölçüldü.

2.27.3. Lipaz enzimlerinin farklı pH değerlerinde aktivitelerinin belirlenmesi

pH değerleri 6 ve 9.5'e ayarlı Tris-$CaCl_2$ tamponları kullanılarak **5.26.1**'de verilen yöntem izlenerek belirlendi.

2.27.4. Farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında lipaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi

Sodyum klorür'ün *E. coli* hücrelerinden hazırlanan lipaz enzimleri aktivitlerine etkileri 100 mM, 500 mM, ve 2500 mM konsantrasyonlarda denendi. Bunun için bu konsantrasyonlarda NaCl içeren 1 M Tris-$CaCl_2$ (pH: 7) tamponları hazırlandı. Sodyum klorür içeren Tris-$CaCl_2$ tamponlar kullanılarak **5.26.1**'de verilen reaksiyon karışımları hazırlandı. Enzim aktivitelerinin ölçülmesinde de kısım **5.26.1**'de izlenen yöntem izlendi.

2.27.5. Trixton X-100'ün lipaz enizmi aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Non-iyonik bir deterjan olan Triton X-100 ve diğer birçok deterjanlar enzim aktiviteleri üzerinde önemli etkileri vardır. Lipaz enzimleri özellikle deterjan sanayiinde de kullanım alanına sahip olduğu için (Garcia-Silvera ve ark., 2017; Tang ve ark., 2017) bu çalışmada rekombinant olarak üretilen lipaz enzimlerine Triton X-100'ün etkileri araştırıldı. **5.26.1**'de verilen reaksiyon ortamına 0.01mM, 0.2 mM ve 0.5 mM final konsantrasyonlarda Triton X-100 eklenerek, aynı yöntem ile enzim aktiviteleri belirlendi.

2.27.6. *Escherichia coli* hücrelerinden hazırlanan lipaz enzimlerinin substrat tercihinin belirlenmesi

Escherichia coli hücrelerinden elde edilen lipaz enzimlerinin substrat tercihlerini belirlemek için p-nitrofenil laurat (PNPL), p-nitrofenil palmitat (PNPP) ve p-nitrofenil asetat (PNPA) denendi. Her üç substratında 10 mM konsatrasyonlarında çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu substrat çözeltiler kullanılarak **5.26.1**'de verildiği şekilde standart reaksiyon koşullarında enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile belirlendi.

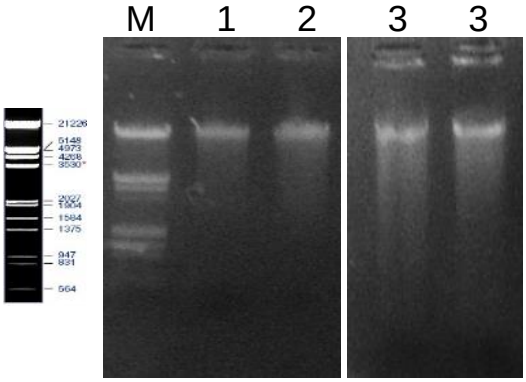
3. BULGULAR

3.1. *Escherichia coli*'de Halofilik Lipaz Ekspresyonu için Plazmit Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler

Bu tez çalışmasında halofilik bir arkebakteri olan *Haloarcula hispanica* ve ılımlı halofilik bakteriler olan *Bacillus safensis* ve *Bacillus licheniformis* ait hipotetik lipaz enzimlerini kodlayan genler, bu mikroorganizmalardan izole edilen genomic DNA üzerinden PZR ile çoğaltıldı ve *E. coli* ekspresyon vektörlerine klonlandı. Oluşturulan lipaz ekpresyon vektörleri farklı E. coli suşlarına transforme edildi ve bu hücrelerin halofilik lipaz enzimlerini sentez etme kapasiteleri ve sentez edilen lipaz enzimlerinin farklı koşullarda aktiviteleri analiz edildi.

3.1.1. Halofilik bakteri ve arke hücrelerinden genom DNA'ların izolasyonu ile ilgili veriler

Küçük ölçeklerde hazırlanan *Bacillus safensis, Bacillus licheniformis ve Haloarcula hispanica* kültürlerden izole edilen genomik DNA'ları agaroz jel elektroforezi ile incelendi (**Şekil 3.1**). Elektroforez soncuçları, kısmen kırılmalar olmakla birlikte DNA'ların kalitatif ve kantitatif olarak PZR ile lipaz genlerinin çoğaltılması için uygun olduğunu gösterdi.



Şekil 3.1. Halofilik bakterilerden izole edilen genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **1.** *Bacillus safensis,* **2**. *Bacillus licheniformis* **3**. *Haloarcula hispanica* hücrelerinden izole edilen DNA örneklerini göstermektedir. **M**. HindIII ve EcoRI restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilmiş Lambda bakteriyofaj DNA'sı. Elektroforez işlemi, %1'lik agaroz jel kullanılarak, TAE tamponunda, 25 dakikada 100 V sabit gerilim altında

gerçekleştirildi.

3.1.2. Halofilik bakteri lipaz genlerinin PZR ile çoğaltılmasıyla iligili veriler

Haloarcula hispanica lipaz C geni ve *Bacillus* türlerine ait hipotetik lipaz genleri, genomik DNA'lar üzerinde PZR ile çoğaltılarak izole edildi. PZR için kullanılan gen spesifik oligonukleotid primerlerin nuleotid dizilerinin belirlenmesinde aşağıda verilen bakterilere ait referans nükleotid dizilerinden yararlanıldı.

Haloarcula hispanica -ATCC 33960 (Ref. no: CP002921.1)

ATGACAGATACCGCTCCCGAGTCGGTAACCGTCCAGCGGGATATCCCGTTCCACGAGATGGA
CGGCGTGACGCTGACGCTTGACCTGTACGACTCGCCAGCGGCCAGCGGCCCGAAACCGGTTG
CCGTGCTTGTCCGCGGTGGCGCGTTCAGGTCCGGCGACAAGGGCGAGTTCGCACGGCACGCA
CTCGACCTCGCGGCGGACGGCTTCCTCGTCATTGAGCCCCAGTACCGCCTCGCGCCGGAGTG
GACGTTCCCGGCGGCGTTGGTCGACGTGAAAGCCGCTATCGAGTGGGCCAGAACGGAGGGCG
AGAGCTACGGCGCGGACACTGACCACATCGTCGGCGTTGGCCACTCGGCGGGCGCGAATCTC
GTTGTCTTGGCAGCTCTGACGGCGGATGAACCCGGTTTTGAACCCGAGCTGTACCCCGGCGC
GTCCTCGGGACTGTCGGCTGTCGTCGGCTACGCCGGCATCTACGACTTCCACGCACTCGATA
ACGCCGCTGACGACGAAGCCGACGCGCCCCACCGCGCGTATCTCACCGGCGGACCCGACGAC
GAACCCGCGGCCTACGACCTCGCCTCGCCGGTCGGGCAGGTGAACACCGACGCCCCGCCGAC
GCTGTTGCTCCACGGGACCAACGACGACGTCGTCCCGCCAGCCCAGTCCGAGCTACTGGCCG
ACGCGCTCGGGCCGATGACCGATGTCGTCCACGAGACGGTGCCGTCGGATCACGGCTTCCCC
TTCCACGGGGCGAACTACGATGACGTGTACGAACGGACCGTCGAGTTCATCCGGCGGGTCGG
AGTCGGCGGTCCGGATACCGGTGACGCGGCCGGTGCAGGCGAGAGAACCGGCTTGCCCGGCG
GCAACCTGCCGGGACCGGCCGACCGTATCGATGATCTCGGACCGGGGGACACTCGGGGCCCG
GATCG**CCGCGACGGCCCCGGATTCTGA**

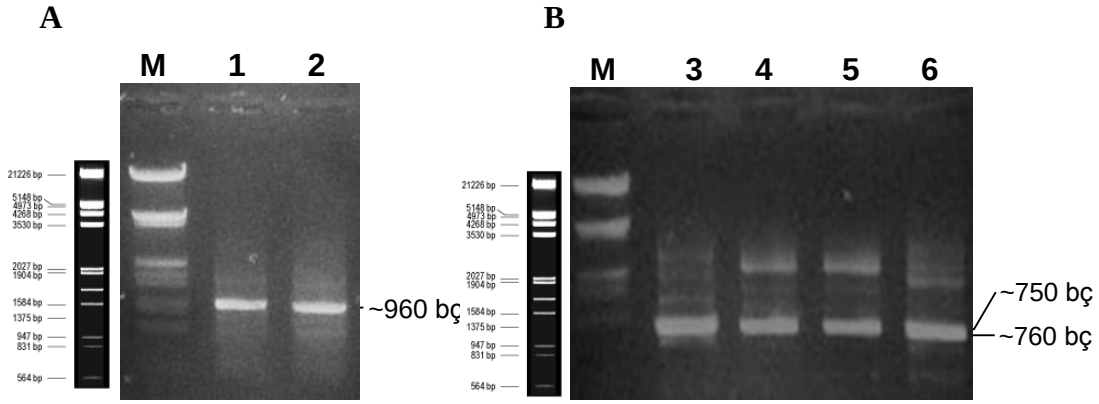
Bacillus safensis strain CFA06 (Ref. No: NZ_JNBO01000041.1)

ATGAAGGCTCGTTTGATTGTGATTGTGATGTCTCTAGCTTTTGTTCTTTCTGCATGTTCCGC
GCAAGAGGCTGGCATAAAGGATAAACTAGAAGACACACCAAAAGTAAAAGAACATATTACCA
TCGCAGCGGTTGGAGATTCCTTAACAGAAGGAATCGGAGATCAAGATAAAAAAGGCTATGCA
GGCATGACCCGTGACAAGATAGAAGCAGTGGACGGCGTGCAGTCTGTCACATTAAAAAACTA
TGCCATTAAAGGCAGTAGAACAGTAGATTTATTAAAAAGATTAAAAGAAAAAAAGGTGCAGG
ACGGACTGAAAGACGCTGACTATATTTTCTTTACGATCGGCGGGAATGATCTCATGCATGTT
GTCCGTCAAAATGTGCTTAATTTGACGTTTGCTCCTTTTCAAAAAGAGCAGGGTCCTTTTGA
AGAGCGCTTTAAAACCATTCTTGCTCAACTGAGAGAACAGAATGATCATGCGAAAATCATGT
ATGTCAGCATGTACAATCCTTTTAAATTCAGTTTGTCTGAGCTGCGAGATATTGATGAAGTC
GTTCAAGACTGGAATGCCGCTGCCAAAAAGGAACTCAAAAAAGACGGCAATGCGGATATGGT
CAATGTAGCAGATTTATTTGAAGAAGGTTCTGATGAAAAATTACTGGCAGAAGATGATTTCC
ACCCAAACCAAAAGGGGTACTCTCTTATGGCAAATCGTTTATTCTCCGAAGTGAAAAAA***GAA***
GGACTGCCGAAGGAATAG

Bacillus licheniformis 10-1-A (Ref. no: NZ_AJLV01000022.1)

ATGAACATACGTTTTATTACAGTCATGATGGCCCTCGTCTGTCTGCTTTCAGCCTGTACGGA
GTGGAATGCGGGTGTTGAAAAAACATCGGTCTCCCCTAAGCGCGATATCGTGATTGCAGCGG
TGGGCGATTCTCTGACAGAGGGGGTAGGCGATCAAGAAAAGAAAGGCTATGTCGGCATGGTG
GCCGATGAGCTTGAAAGCCGGAGCGATGTGAAGTCCGTAACGGTCAAAAATTATGCCGTTAA
AGGCTCCCGGACTGATCAGCTGCTTGAAAGATTAAAAGACAAAGAAGTACAAGAGGGCCTGA
AAGATGCAGACTACATTTTGTTTACAATCGGGGGCAACGACCTGATGAAAGTCGTCCGCCAA
AACTTCGCGCACTTAACGCTCACACCTTTCCGTGCTGAACAAAAACTGTTTGAAAAGCGGTT
TTCGAATATTTTAGCGGAAATCAGAGAGCAAAACGCCAGCGCTGAATTGATTTATGTCAGCA
TGTATAATCCGTTTAAGTTTACGCTGTCTGAACTGCGGGAAGTTGACCAAGTCGTAGACGAA
TGGAATGAAGGCGCGGAAAAAAGGCTGAAGAAGGTCTCCAACACGAAAATGGCGGATATCGC
TGATATTTTTGAGGAATACAGCGATGAAAAGAAGATTGCAGAAGACGAGTTTCATCCTAATC
AATACGGGTATTCTTTAATAGCGAAACGCGTTTACGAACAAATTAAAAA***CGAAGACCTCCCA***
GCAGAATAA

Metot kısmında (**2.4.**) belirtilen koşullarda, fosforillenmiş primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılan lipaz kodlayıcı DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi (**Şelkil 3.2**). *Haloarcula hispanica* lipaz geni için ~960 b.ç. (**Şekil 3.2A**), *B. safensis* hipotetik lipaz geni için ~760 b.ç., *B. licheniformis* hipotetik lipaz geni için ise ~750 b.ç. boyutlarında DNA fragmentleri (**Şekil 3.2B**) elde edildi.

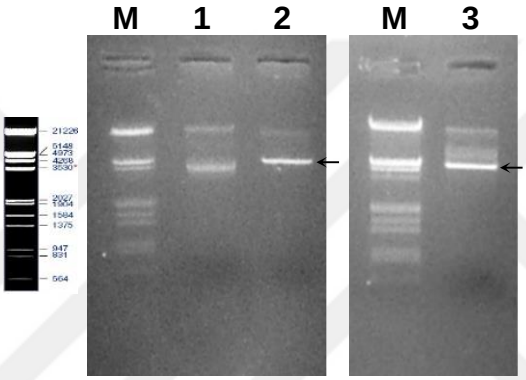


Şekil 3.2. PZR ile çoğaltılan lipaz kodlayıcı DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi profilleri. **A.** *Haloarcula hispanica* genom DNA'sı üzerinden *hh-LipC-For / hh-LipC-Rev* (**1**) ve *hh-LipC-For-minus / hh-LipC-Rev* primer (**2**) çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA fragmentleri. **B**. *Bacillu safensis ve B. licheniformis* genom DNA'sı üzerinden PZR ile çoğaltılan DNA fragmentleri: PZR'da *sfn-LipC-For / sfn-LipC-Rev* (**3**); *sfn-LipC-For-minus / sfn-LipC-Rev* (**4**); *lcf-LipC-For / lcf-LipC-Rev* (**5**) ve *lcf-LipC-For-minus / lcf-LipC-Rev* (**6**)

primer çiftleri kullanıldı. **M.** Lambda DNA /HindIII+EcoRI. Elektroforez **Şekil 3.1**'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

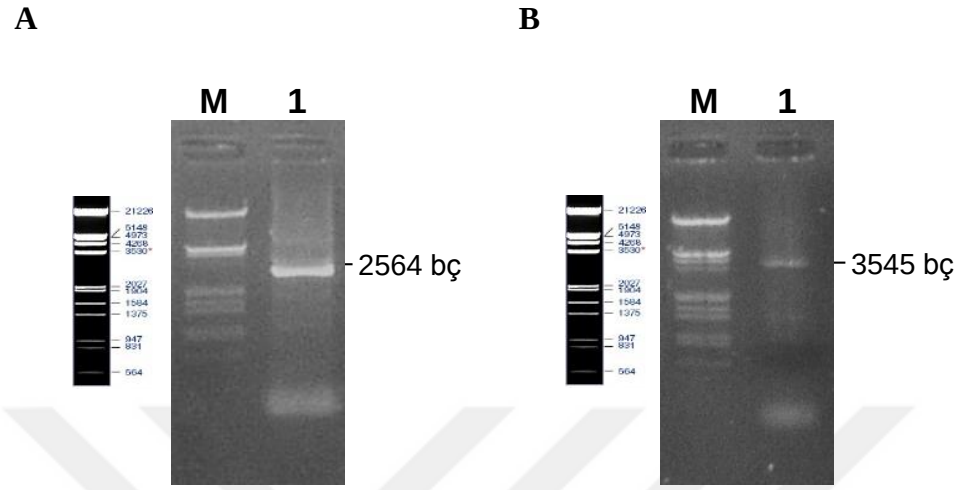
3.1.3. pET-14b, pGFP ve pGEX-6p-1 plazmitlerinin ligasyon için hazırlanması ile ilgili veriler.

Halofilik lipaz genleri faklı promotör dizileri kontrolünde klonlanarak farklı *E. coli* ekspresyon vektörleri elde edildi. Bu genler ilk aşamada bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi için promatör taşıyan pET-14b plazmitine klonlandı. pET-14b plazmiti NcoI ya da NdeI restriksiyon enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirildi (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.3. Restriksiyon endonukleaz enzimleri ile doğrusal hale getirilen pET-14b plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforez profilleri. **1**. Kesilmemiş DNA örneği, **2.** NcoI ve **3**. NdeI enzimleri ile kesilmiş plazmit DNA'sı. **M**. Lambda DNA /HindIII+EcoRI. Elektroforez **Şekil 3.1**'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

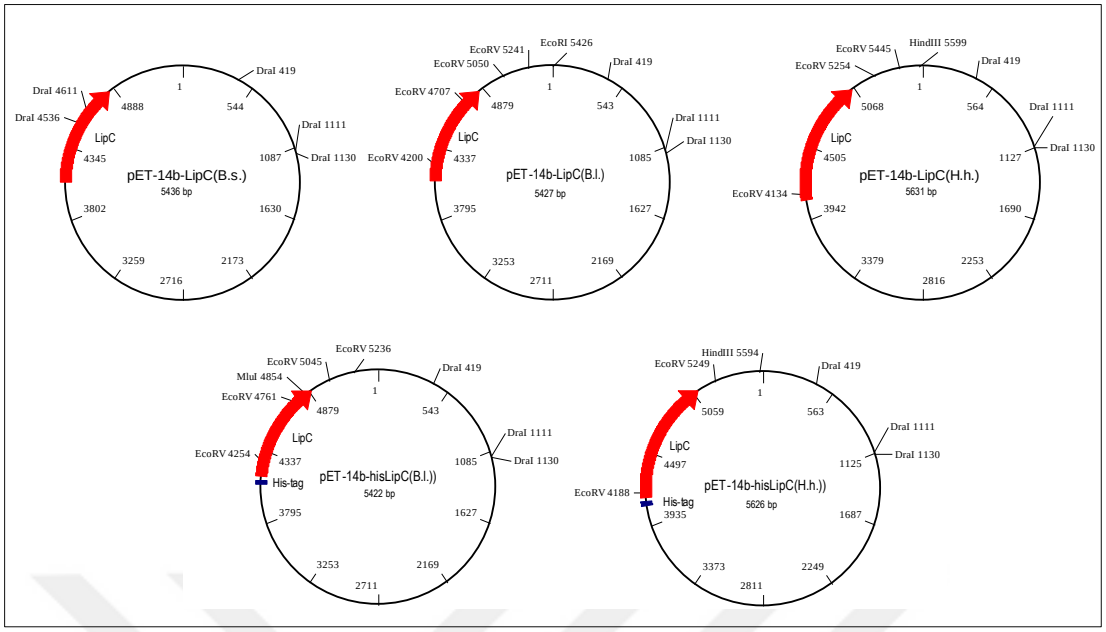
pGEX-6p-1 ve pGFP plazmitleri ise ters PZR tekniği ile doğrusal hale getirildi ve PZR ürünleri sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile incelendi ve pGFP için 2565 bç (**Şekil 3.4A**), pGEX için 3545 bç (**Şekil 3.4B**) boyutlarında beklenen DNA fragmentleri elde edildi.



Şekil 3.4. Ters PZR ile doğrusal şekle dönüştürülen pGFP (**A**) ve pGEX-6p-1 (**B**) plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez profilleri. **M**. Lambda DNA /HindIII+EcoRI. Elektroforez **Şekil 3.1**'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

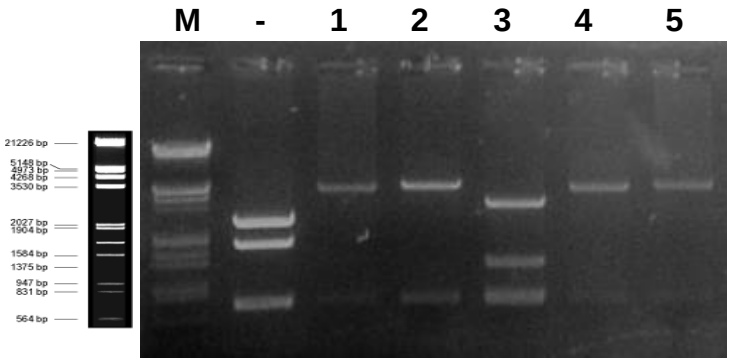
3.1.4. Lipaz genlerinin T7 RNA polimeraz promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen vektörler ve kontrolleri ile ilgili veriler

Lipaz genleri T7 RNA polimeraz promotör dizisi taşıyan pET-14b plamit vektöründe, x6 his uzantısı taşımayan lipaz kodlayan genler için NcoI kesim noktasına; hiz uzantısı taşımayan lipaz enzimi kodlayan genler için ise NdeI enzimi kesim noktasına klonlandı. NcoI ile kesilerek doğrusal hale getirilen pET-14b plazmit DNA'sı, başlangıç kodonu (ATG) taşıyan lipaz geni primerleri (*sfn-LipC-For, lcf-LipC-For* ya da *hh-LipC-For*) kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA fragmentleri ligasyona uğratıldı ve **Şekil 3.5**'de haritaları verilen pET-14b-LipC (B.s.), pET-14b-LipC (B.l.) ve pET-14b-LipC (H.h) vektörleri elde edildi. Buna karşın NdeI ile kesilerek doğrusal hale getirilen plazmit DNA'sı başlangıç kodonu taşımayan primerler (*lcf-LipC-For-minus* ya da *hh-LipC-For-minus*) kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA fragmentleri ile ligasyona uğratıldı. Bu şekilde x6 his uzantışı taşıyan pET-14b-hisLipC (B.l.) ve pET-14b-hisLipC (H.h.) plazmitleri elde edildi (**Şekil 3.5**)



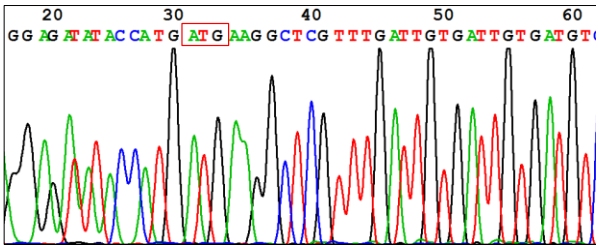
Şekil 3.5. Lipaz genlerinin pET-14b plazmit vektöründe T7 RNA polimeraz promotör dizisi kontrolünde klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörleri.

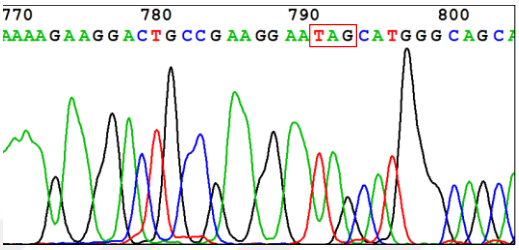
Lipaz genlerinin T7 promotör dizisi kontrolünde klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörleri hem restriksyon enzimleri ile kesilerek (**Şekil 3.6**) hem de DNA dizi analizleri (**Şekil 3.7 ve Şekil 3.8**) ile kontrol edildi. Elde edilen sonuçlar, teorik olarak tasarlanan plazmit vektör yapıları ile aynen uygunluk gösterdiği saptandı.



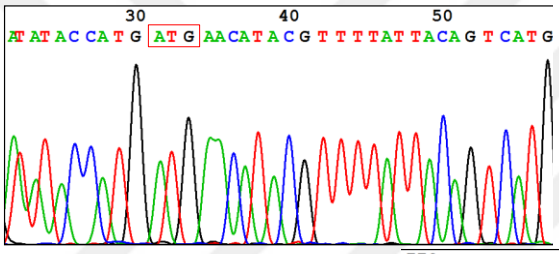
Şekil 3.6. Dra I restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen plazmit vektörlerin elektroforez profilleri. **1**. pET-14b-LipC (B.l.), **2**. pET-14b-LipC (H.h), **3**. pET-14b-LipC (B.s.), **4**. pET-14b-hisLipC (B.l.), **5**. pET-14b-hisLipC (H.h). **M**. Lambda DNA /HindIII+EcoRI. Elektroforez **Şekil 3.1**'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

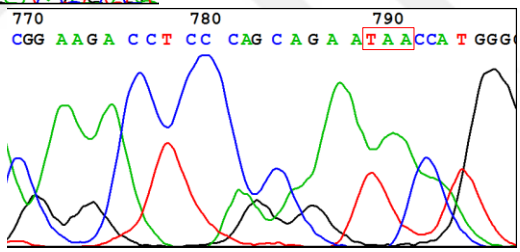
A



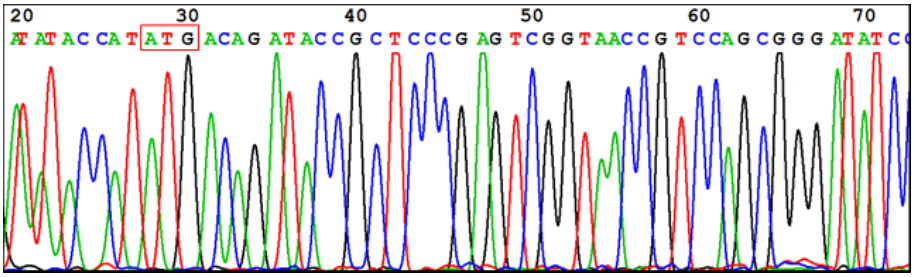


B



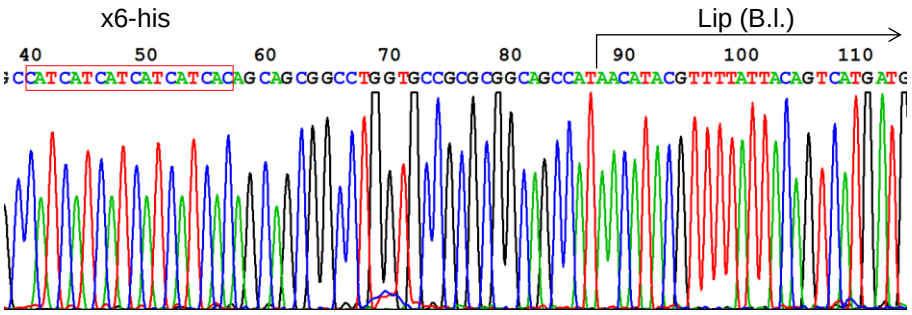


C

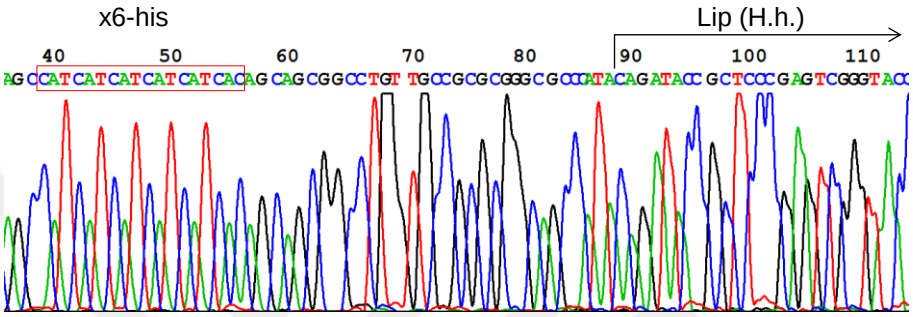


Şekil 3.7. x6 His kodlayıcı dizi taşmayan lipaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. **A**. pET-14b-LipC(B.s.), **B**. pET-14b-LipC(B.l.), **C**. pET-14b-LipC(H.h).

A



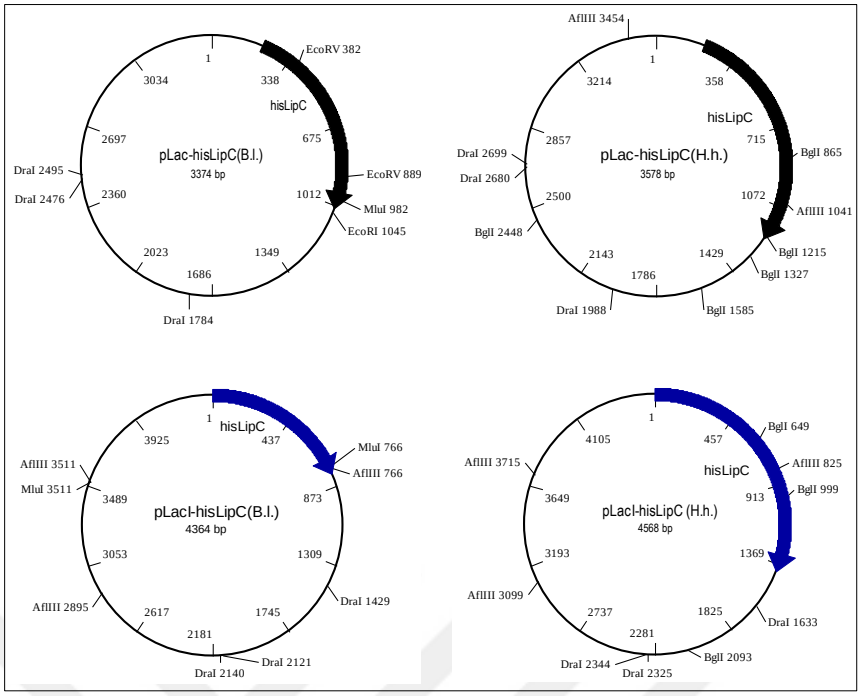
B



Şekil 3.8. x6 His kodlayıcı dizi taşıyan lipaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. **B**. pET-14b-hisLipC(B.l.), **C**. pET-14b-hisLipC(H.h).

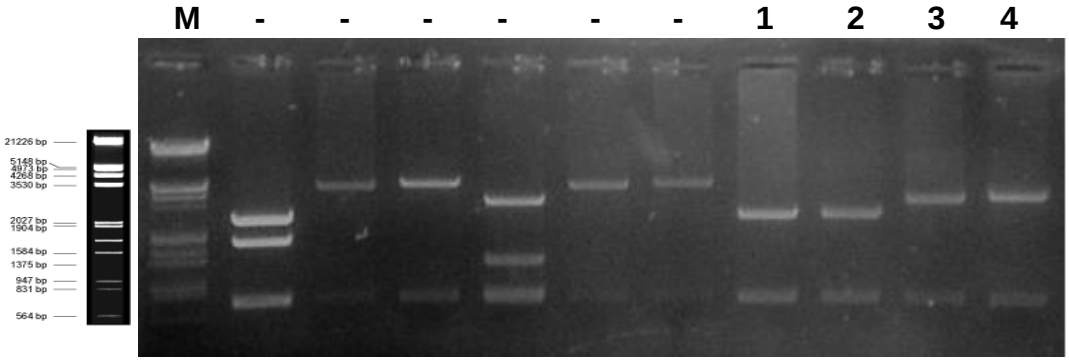
3.1.5. Lipaz genlerinin P_{lac} promotörü kontrolünde klonlanması ile elde edilen vektörler ve kontrolleri ile ilgili veriler

Laktoz promotörü, T7 RNA polimeraz promötürünün aksine baskılanmadığı sürece, tüm *E. coli* suşlarında aktif olan bir promotödür. T7 RNA polimeraz promotörü ise sadece *E. coli* BL21 gibi, T7 faji RNA polimeraz enzimi sentez edebilin suşlarda aktiftir. Bu nedenle çalışlan lipaz genleri Lac promotörü taşıyan iki farklı plazmite klonlandı. **2.15**'de belirtildiği şekilde elde edilen x6 histidin uzantılı lipaz kodlayan DNA'lar ile Lac promotör dizisi taşıyan plazmit vektörlerinde ligasyonu sonucunda **Şekil 3.9**'da restriksiyon haritaları verilen pLac-hisLipC(B.l.), pLac-hisLipC(H.h.), pLacI-hisLipC(B.l.), ve pLacI-hisLipC(H.h.) plazmit vektörleri elde edildi.



Şekil 3.9. Lipaz genlerinin pGFP ve pGEX plazmit vektöründe lac promotör dizisi kontrolünde klonlanması ile elde edilen *E. coli* ekspresyon vektörleri.

Elde edilen plazmit vektörleri hem restriksiyon enzimleri ile kesilerek (**Şekil 3.10**) hem de DNA dizi analizleri (**Şekil 3.11)** ile kontrol edildi.



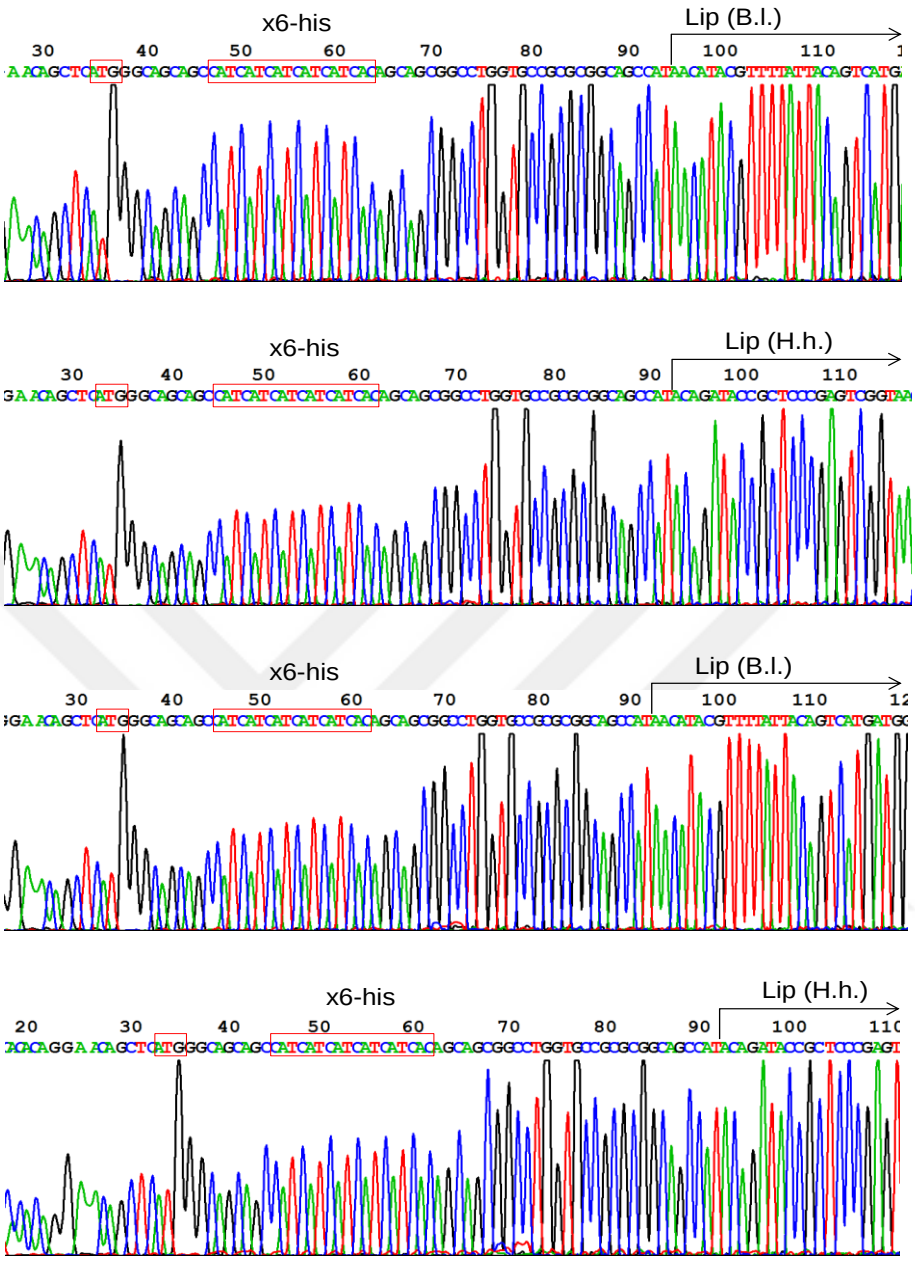
Şekil 3.10. Dra I restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen plazmit vektörlerin elektroforez profilleri. **1**. pLac-hisLipC(B.l.), **2**. pLac-hisLipC(H.h), **3**. pLacI-hisLipC(B.l.), **4**. pLacI-hisLipC(H.h). **M**. Lambda DNA /HindIII+EcoRI. Elektroforez **Şekil 3.1**'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

A

B

C

D

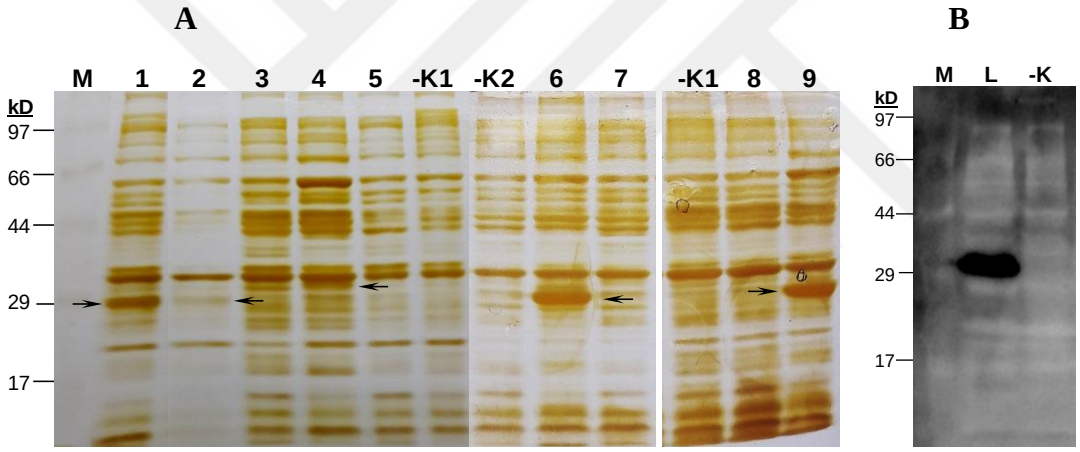


Şekil 3.11. Lac promotör dizisi kontrolünde klonlanan lipaz genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. **A**. pLac-hisLipC(B.l.), **B**. pLac-hisLipC(H.h.), **C**. pLacI-hisLipC(B.l.), **D**. pLacI-hisLipC(H.h.).

3.2. *Escherichia coli*'de halofilik lipaz ekspresyonu ile ilgili veriler

Halofilik bakterilere ait lipaz genleri klonlanan plazmit vektörlerin *E. coli* hücrlerinde ekspresyon yapıp yapmadıkları SDS-PAGE ile incelendi. Elektroforez sonrasında his uzantılı ya da his uzantısı taşımayan lipaz enzimleri ve diğer hücre proteinleri gümüş boyama tekniği

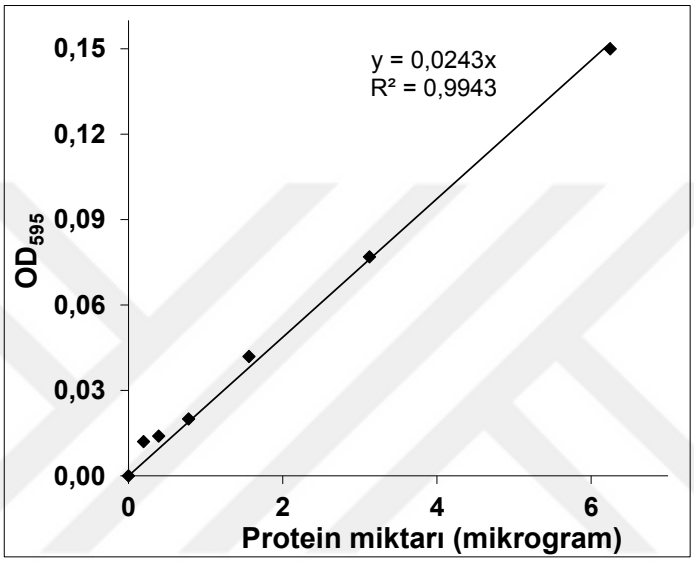
ile görüntülendi. Elde edilen sonuçlar pET-14b plazmitinde T7 promotöz dizisi kontrolünde klonlanan *B. safensis* ve *B. licheniformis* lipaz enzimlerinin *E. coli* hücrelerinde etkin bir şekilde sentez edildiğini gösterdi (**Şekil 3.12A**, **1** ve **6** nolu örnekler). pET-14b-hisLipC(H.h) ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrelerinde düşük düzeyde *H. hispanica* lipaz enzim saptandı (**Şekil 3.12A**, **3** ve **4** nolu örnekler). pGEX-6p1 plazmiti üzerinden oluşturulan ve lacI regülatör geni taşıyan plazmitlerin [pLacI-hisLipC (H.h.) ve pLacI-hisLipC (B.l.)] *E. coli* hücrelerinde lipaz ekspresyonu yapmadığı saptandı. Western melezleme deneylerinde sadece his uzantılı lipaz kodlayan plazmitlerin *E. coli* hücrelerinde ekspresyon yapıp yapmadıkları araştırıldı. pLac-hisLipC (B.l.) plazmitini *E. coli* hücrelerinde ekspresyon yaptığı görüldü (**Şekil 3.12B**). Buna karşın pLac-hisLipC (H.h.) ile yapılan deneylerde olumlu sonuç alınamadı. Bu sonucun, *H. hispanica* lipaz enziminde anti-his antikorlarının x6 his epitopuna bağlanamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3.12. *Escherichia coli* hücrelerinde halofilik bakteri lipaz enzimlerinin SDS-PAGE ile analizi. **A**. SDS-PAGE sonrası gümüş boyama tekniği ile görüntülenen proteinler. **1**. pET-LipC(B.s.) / *E. coli* BL21, **2**. pET-LipC(B.l.) / *E. coli* BL21, **3**. pET-hisLipC(H.h.) / *E. coli* BL21, **4**. pET-hisLipC(H.h.) / *E. coli* BL21, **5**. pLacI-hisLipC(H.h.) / *E. coli* BL21, **6**. pLac-hisLipC(B.l.) / *E. coli* Mach1, **7**. pLacI-hisLipC(B.l.) / *E. coli* Mach1, **8**. pLacI-hisLipC(B.l.) / *E. coli* BL21, **9**. pLac-hisLipC(B.l.) / *E. coli* BL21, **-K1**. pET-14b / *E. coli* BL21, **-K1**. pET-14b / *E. coli* Mach1. **B**. SDS-PAGE/Western melezleme **L**. pLac-hisLipC (B.l.) / *E. coli* Mach1, **-K**. pET-14b / *E. coli* Mach1. **M**. Protein standardı (Santa cruz, sc-2361).

3.3. Protein miktar tayini ile ilgili veriler

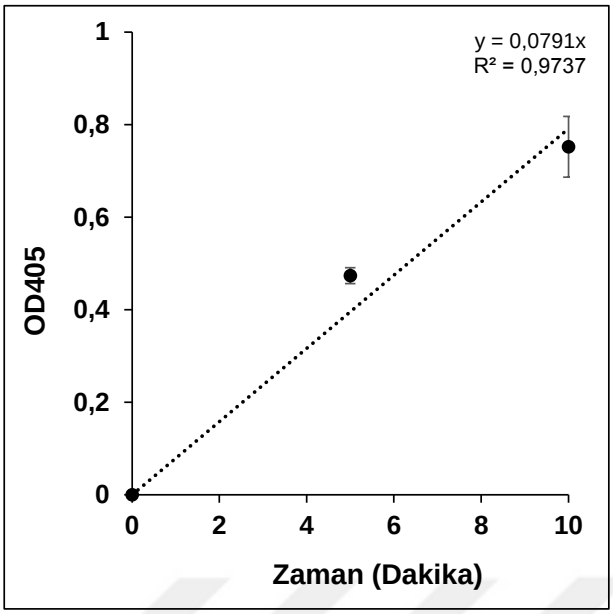
Plazmit aktarılan *E. coli* hücrelerinden hazırlanan lizatlarda total protein miktarları bovin serum albümin kullanılarak hazırlan standart protein grafiği üzerinden belirlendi. Belirli miktarlarda BSA örneklerinin Bradford reaktifi ile verdikleri reaksıyonun 595 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine (OD_{595}) göre hazırlanan standart grafik **Şekil 3.13**'de verildi.



Şekil 3.13. Bovin serum albümin kullanılarak Bradford metodu ile hazırlanan protein standart grafiği.

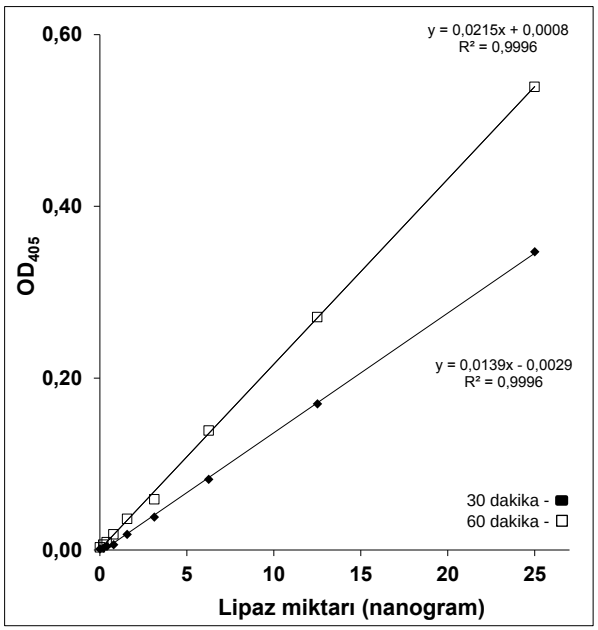
3.4. *Candida rugosa* lipaz enziminin aktivitesinin saptanması ile ilgili veriler

Ticari olarak temin edilen *C. rugosa* lipaz enziminin yaklaşık aktivite değeri (> 700 U/mg protein) verildiği için, çalışmada pNFL kullanılarak spektrofotometrik olarak aktivitesi yeniden belirlendi. Bunun için belirli miktarda enzimin (protein) 37°C'da belirli zaman aralığında hidroliz ettiği substrat miktarı belirlendi**. Şekil 3.14'**de verilen grafik üzerinden belirli zaman aralığında absorbansta meydana gelen değişme (ΔOD_{405}) ve metod kısmında verilen formül üzerinden (**3.24**.) hidroliz olan substrat konsantrasyonu hesaplandı. Enzim preparatının spesifik aktivitesinin yaklaşık 880 U/mg protein değerine sahip olduğu saptandı.



Şekil 3.14. Zaman bağlı olarak 0.5 µg *C. rugosa* lipaz enzimi ile hidroliz olan pNFL'ın spektrofotometrik olarak ölçülmesi.

Spesifik aktivitesi belirlendikten sonra, farklı miktarlarda *C. rugosa* lipaz enzimi kullanılarak starndart bir grafik hazırlandı (**Şekil 3.15**.). Elde edilen sonuçlar, 37 °C'da 30 ve 60 dakikalik reaksiyon süresince, enzim miktari ile aktivitenin paralel artış seyrettiğini gösterdi.



Şekil 3.15. *Candida rugosa* lipaz enzimi için, PNFL ile hazırlanan standart aktivite grafiği. Reaksiyon karışımı **2.25**'de verildiği şeklide hazırlandı. Ortama grafik üzerinde belirtilen

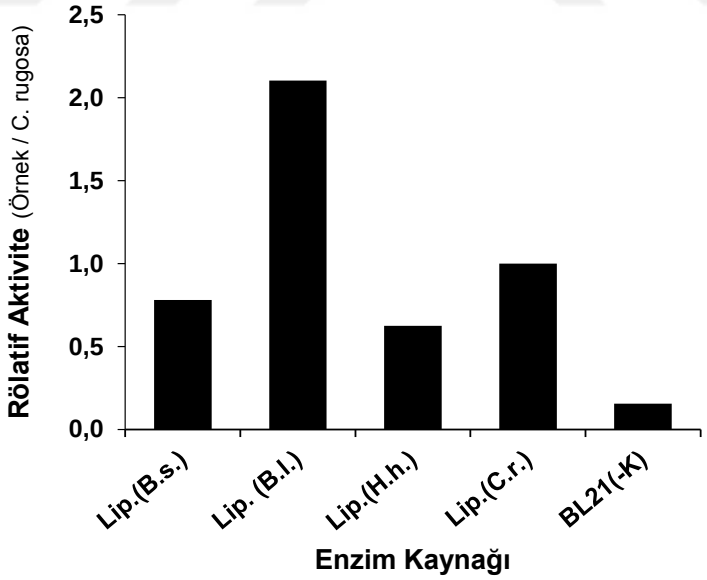
miktarlarda enzim eklendi ve reaksiyon 37ºC'da 30. ve 60. dakikada sonlandırıldı.

3.5. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen lipaz aktivitesi ile ilgili veriler

Çalışma kapsamında olşuturulan lipaz ekspresyon vektörleri *E. coli* hücrelerine transforme edildi ve bu hücrelerden hazırlanan lizatlarda enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak saptandı.

3.5.1. pET-14b plazmitine klonlanan lipaz genlerinin *E. coli* BL21'de ekspresyonu ve lipaz aktiviteleri ile ilgili veriler

Çalışmanın ilk aşamasında farklı kaynaklı lipaz genleri pET-14b plazmitine T7 RNA polimeraz enzimi kontrolunde klonlandı ve pET-14b-LipC(B.s), pET-14b-LipC(B.l) ve pET-14b-LipC(H.h) vektörleri oluşturuldu. Bu plazmit vektörler ile transforme edilen *E. coli* BL21 hücrelerinden hazırlanan lizatlarda lipaz enzimi aktiviteleri pNFL kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (**Şekil 3.16**). Elde edilen veriler, *B. licheniformis* kaynaklı hipotetil lipaz enziminin 37ºC'da, Tris-CaCl tamponunda (pH 7) en yüksek aktiviteye sahip olduğunu ortaya koydu.



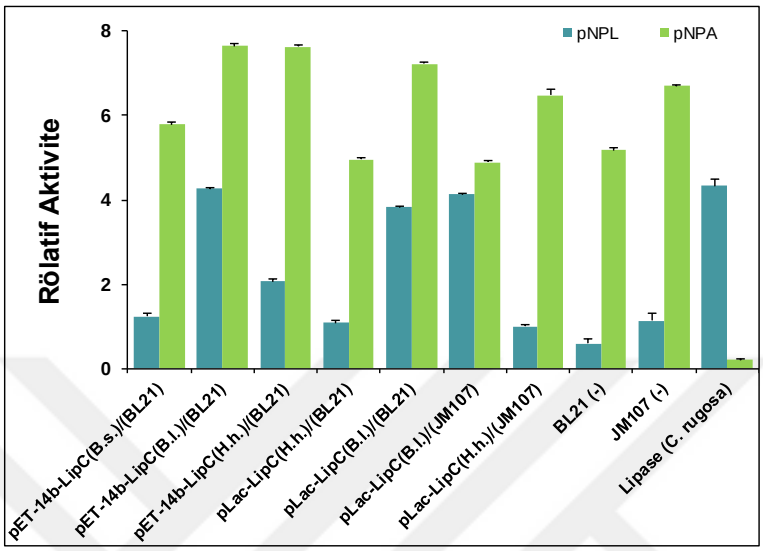
Şekil 3.16. *Escherichia coli* BL21 hücrelerinde recombinant olarak sentez edilen halofilik lipaz enzimlerinin rölatif aktiviteleri. Aktiviteler **2.27**'de belirtilen koşullarda pNFL kullanılarak belirlendi. Deneyde 15 ng (30 µl) *Candida rugosa* lipaz enzimi referans olarak

kullanıldı. **B.s.,** *B. safensis*; **B.l.**, *B. licheniformis* ; **H. h.**, *H. hispanica*; **C.r**., *C. rugosa*.

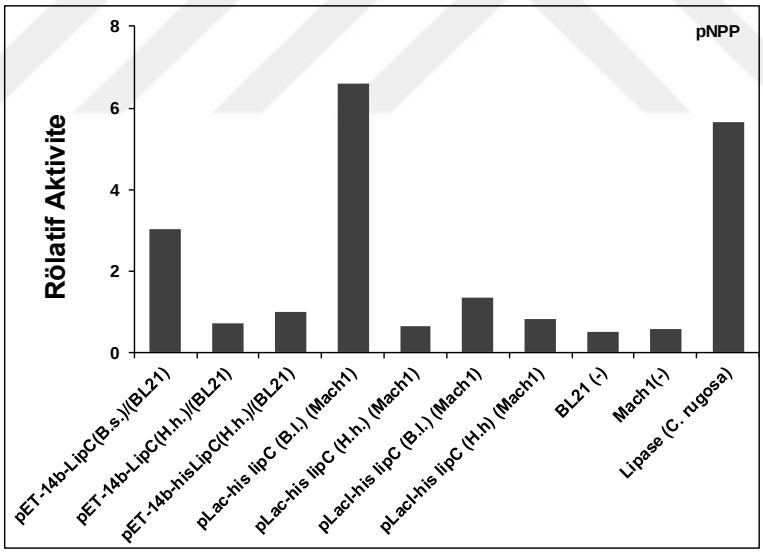
3.5.2. Farklı *E. coli* suşlarında sentez edilen lipaz enzimlerinin farklı substratlar için aktivitelerinin saptanması ile ilgili veriler

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında lipaz genleri faklı *E. coli* suşlarında aktif olan Lac promotörü kontrolünde klonlanarak yeni plazmit vektörleri oluşturuldu. Dolayısıyla *E. coli* BL21 dışında Mach1, TOP10, JM107 ve DH5α suşları recombinant lipaz ekspresyonu için denendir. En iyi sonuç *B. licheniformis* lipaz enzimi kodlayan plazmitler ile JM107 suşunda elde edildi. Bu nedenle çalışmanın sonraki aşamalarında ağırlıklı olarak *E. coli* JM107 suşundan yararlanıldı. Diğer taraftan substrat olarak pNFL ile birlikte pNFA ve pNFP kullanılarak lipaz aktiviteleri belirlendi**. Şekil 3.17'**de *E. coli* BL21 ve JM107 bakteri suşlarında sentez edilen lipaz enzimlerine ait farklı substratlar için saptanan aktiviteleri verilmektedir. Elde edilen sonuçlar, referans olarak kullanılan saflaştırılmış *C. rugosa* lipaz enzimi dışında, pNFA kullanılan tüm örneklerde yüksek düzeyde hidroliz gerçekleştiğini gösterdi. Lipaz ekspresyon plazmitleri ile transforme olmamış *E. coli* BL21 ve JM107 suşlarından hazırlanan lizatlarda da yüksek düzeyde hidroliz gerçekleşmesi, bu aktivitelerin plazmitler üzerinden kodlanan lipaz enzimlerinden kaynaklanmadığı sonucunu verdi (**Şekil 3.17A**). Özellikle farklı esteraz enzimleri için de substrat olarak kullanılan pNPA'ın (Wang ve ark., 2016) lipaz enzimleri dışında hücre içi diğer esterazlar tarafından hidroliz edilme olasılığı çok yüksektir. Buna karşın pNFL ile yapılan ölçümlerde beklenen sonuçlar alındı. pNPL ile yapılan lipaz aktivite testlerinde negatif kontrol olarak kullanılan transforme olmamış bakteri lizatlarında daha düşük düzeyde hidroliz saptandı. **Şekil 3.17**'de verilen sonuçlara parelel olarak en yüksek aktivite *B. licheniformis* hipotetik lipaz enzimi ile elde edildi. Farklı lipaz örnekleri ile pNFP kullanılarak yapılan testlerde de pNFL ile elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edildi (**Şekil 3.17B**) .

A



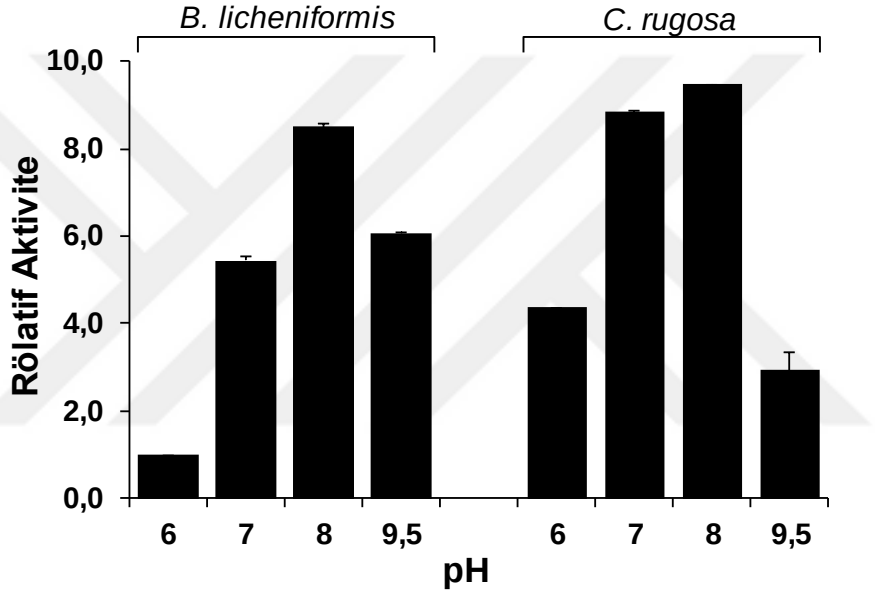
B



Şekil 3.17. *Escherichia coli* BL21 ve JM107 bakteri suşlarında recombinant olarak sentez edilen halofilik lipaz enzimlerinin farklı substratlara karşı gösterdikleri rölatif aktiviteleri. Aktiviteler **2.27**'de belirtilen koşullarda pNFL, pNFA ve pNFP kullanılarak belirlendi. Deneylerde 15 ng (30 µl) *Candida rugosa* lipaz enzimi referans olarak kullanıldı.

3.5.3. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı pH değerlerinde gösterdiği aktiviteler ile ilgili veriler

Escherichia coli JM107 suşunda sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin dört farklı pH ortamında pNFL üzerinde gösterdiği aktivite spektrofotometrik belirlendi (**Şekil 3.18**). Enzimin pH 6'da oldukça düşük düzeyde aktivte göstediği, pH 7-9.5 arasında aktivitesinin yüksek olduğu saptandı. *Enzimlerin* pH 8'de maksimum aktiviteye sahip olduğu ortaya kondu. *Candida rugosa* lipaz enzimi ile karşılaştırıldığında, *B. licheniformis* lipaz eziminin pH 9.5'de çok daha aktif olduğu görüldü.

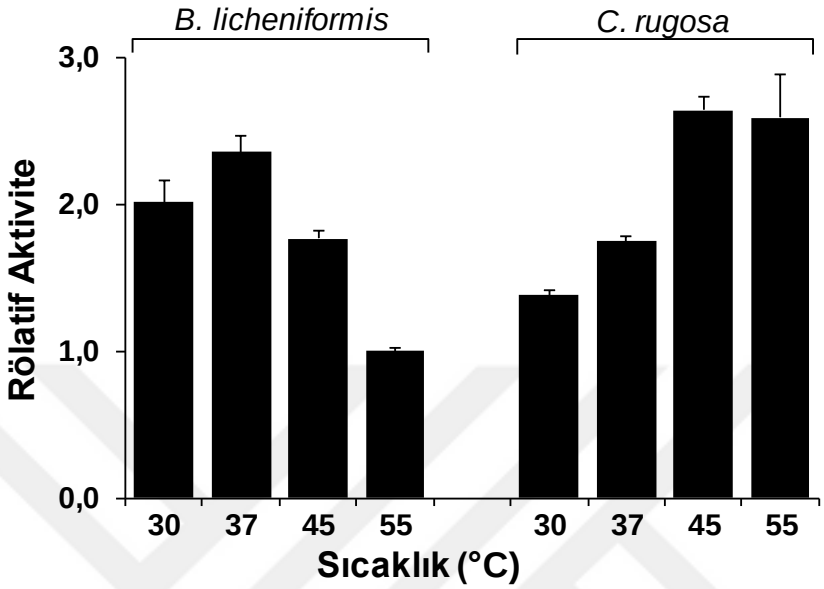


Şekil 3.18. *Escherichia coli* JM107 bakteri suşlarında sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enzimi ve *Candida rugosa* lipaz enziminin farklı pH değerlerinde pNFL üzerinde gösterdikleri kataliz aktivitesi. Aktivite değerleri en düşük aktivite değerine oranlanarak verildi. Aktiviteler **2.27**'de belirtilen koşullarda pNFL kullanılarak belirlendi. Deneyde 15 ng (30 µl) *Candida rugosa* lipaz enzimi referans olarak kullanıldı.

3.5.4. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerinde gösterdiği aktiviteler ile ilgili veriler

Bacillus licheniformis lipaz enziminin aktivitesi 30^{o}C, 37^{o}C, 45^{o}C ve 55 ^{o}C'larda denendi. *Escherichia coli* JM107 hücrelerinde üretilen enzimin belirtilen sıcaklıklarda pNFL üzerinde göstediği kataliz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi (**Şekil 3.19**). Enzim

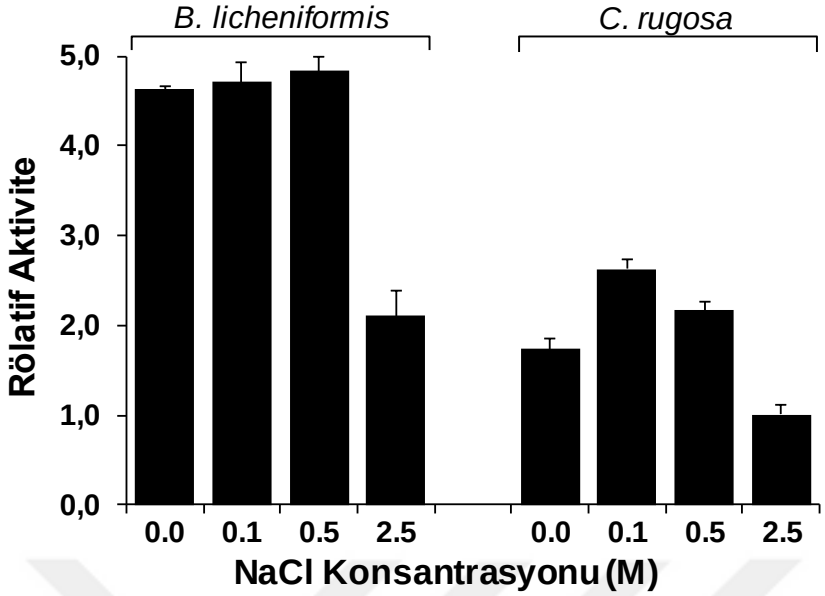
30°C, 37°C ve 45°C'larda yüksek aktivite gösterdi. 55°C'ta ise enzim aktivitesinde % 50'ye yakın değerlede düşüş saptandı.



Şekil 3.19. *Escherichia coli* JM107 bakteri suşlarında sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enzimi ve *Candida rugosa* lipaz enziminin farklı sıcaklıklarda pNFL üzerinde gösterdiği kataliz aktivitesi. Aktiviteler **2.27**'de belirtilen koşullarda pNFL kullanılarak belirlendi. Deneyde 15 ng (30 µl) *Candida rugosa* lipaz enzimi referans olarak kullanıldı.

3.5.5. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında gösterdiği aktiviteler ile ilgili veriler

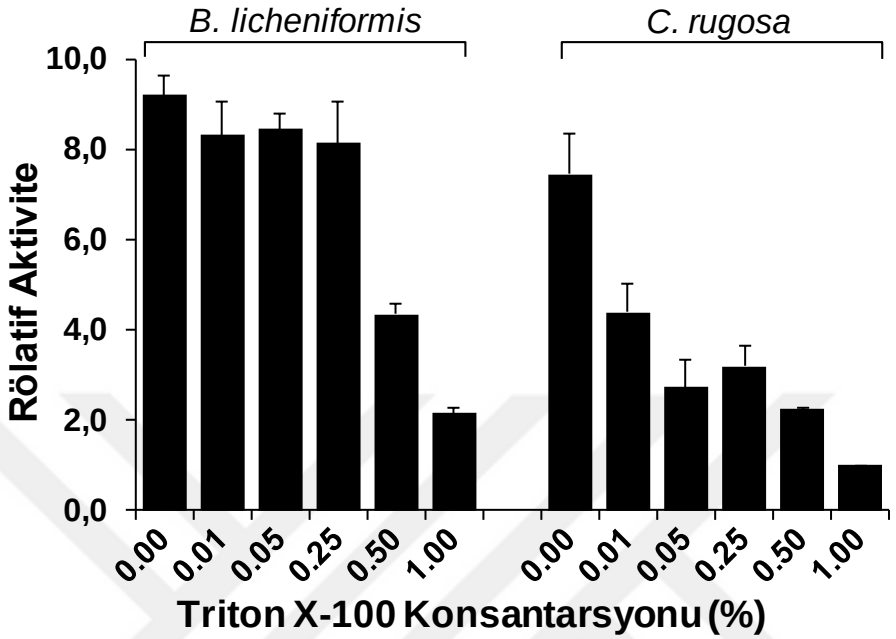
Bu tez çalışmasında yüksek tuz konsantrasyonlarında canlılığını sürdürebilen halpfilik organizmalara ait lipaz enzimleri üserinde çalışıldı. Dolayısıyla rekombinant olarak *E. coli* hücrelerinde sentez edilen bu enzimlerin yüksek tuz konsantrasyonlarında aktif olabileceği ilk akla gelen düşüncedir. Bu bakımdan *E. coli* JM107 hücrelerinde üretilen *B. licheniformis* lipaz enziminin aktivitesi 0.1 M, 0.5 M ve 2.5 M konsantrasyonlarda NaCl varlığında pNPL kullanılarak test edildi. Enzimin, 0.5 M NaCl varlığında maksimum aktivite gösterdiği saptandı. 2.5 M NaCl konsantrasyonda enzimin yaklaşık %50 aktivite kaybettiği görüldü (**Şekil 3.20**).



Şekil 3.20. *Escherichia coli* JM107 bakteri suşlarında sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enzimi ve *Candida rugosa* lipaz enziminin farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında pNFL üzerinde gösterdiği kataliz aktiviteleri. Aktiviteler **2.27**'de belirtilen koşullarda pNFL kullanılarak belirlendi. Deneyde 15 ng (30 µl) *Candida rugosa* lipaz enzimi referans olarak kullanıldı.

3.5.6. *Escherichia coli* hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı non-iyonik deterjan (Triton X-100) konsantrasyonlarında gösterdiği aktiviteler ile ilgili veriler

Lipaz enzimlerinin endüstriyel kullanım alanlarından biri deterjan sanayiidir. Bu bakımdan lipaz enzimlerinin deterjan varlığında aktif olması önemlidir. *Escherichia coli* JM107 hücrelerinde üretilen ve pNFL üzerinde en yüksek aktivite gösteren *B. licheniformis* lipaz enziminin belirli konsantrasyonlarda non-ionic deterjan olan Triton X-100 varlığında aktivitesi test edildi. *Bacillus licheniformis* lipaz enziminin % 0.01-1 konsantrasyonlarda Triton X-100 içeren ortamlarda pNFL'ı hidroliz etme aktivitesi spektrofotometrik olarak saptandı. Enzimim % 0.25 Triton X-100 varlığında % 100 aktivite gösterdiği belirlendi. Lipaz enzimini % 0.5 Triton X-100 konsantrasyonda yaklaşık % 50 aktivitesini koruduğu, % 1 Triton X-100 konsantrasyonda ise aktivitenin % 25'e gerilediği ortaya kondu (**Şekil 3.21**).



Şekil 3.21. *Candida rugosa* lipaz enzimi ve *Escherichia coli* JM107 bakteri suşlarında sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin farklı konsantrasyonlarında Triton X-100 içeren ortamlarda pNFL üzerinde gösterdiği kataliz aktiviteleri. Aktiviteler **2.27**'de belirtilen koşullarda pNFL kullanılarak belirlendi. Deneyde 15 ng (30 µl) *Candida rugosa* lipaz enzimi referans olarak kullanıldı.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lipazlar biyokimyasal özellik bakımından gerçek lipazlar (EC 3.1.1.3) ve karboksilestearzlar (EC 3.1.1.1) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Arpigny ve Jaeger, 1999; Schmid ve Verger, 1998). Bu enzimler mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde yaygın olarak bulunan trigliseridleri hidroliz eden enzimlerdir. Lipazlar gıda sektörü, deterjan sanayii ve alternatif enerji üretimi gibi endüstriyel alanlarında biyokatalist olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bu bakımdan, özellikle aşırı koşullarda aktivite gösteren lipaz enzimleri büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışması kapsamında da, aşırı halofilik bir mikroorganizma olan *H. hispanica*'ya ait lipaz geni ve ılımlı halofilik bakteriler *B. safensis* ve *B. licheniformis*'e ait hipotetik lipaz genleri, *E. coli* hücrelerinde ekspresyon için geliştirilen plazmit vektörlere klonlandı ve bu hücrelere aktarıldı. Lipaz genleri klonlanan plazmitler *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Transformant hücrelerden hazırlanan lizatlar rekombinant lipaz enzimlerinin sentezi ve enzim aktiviteleri için analiz edildi.

Çalışmaya halofilik bakteri genlerinin izole edilmesi ile başlandı. İntron yapısı içermeyen bu mikroorganizma genleri, direkt olarak genom DNA üzerinden PZR ile çoğaltılarak elde edildi (**Şekil 3.1** ve **3.2**). Elde edilen lipaz genleri, sadece T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli* hücrelerinde (*E. coli* BL21-DE3) aktif olan (Studier ve Moffatt, 1986) T7 promotör dizisi kontrolünde klonlanarak, histidin uzantısı (x6 his uzantısı) taşıyan ve uzantı taşımayan doğal lipaz enzimleri kodlayan *E. coli* ekspresyon vektörleri oluşturuldu (**Şekil 3.5**). Histidin uzantısı özellikle bakterilerde rekombinant olarak üretilen proteinlerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Hochuli ve ark., 1988; Park ve ark., 2017). Bu tez kapsamında *E. coli* hücrelerinde sentez edilen lipaz enzimlerinin saflaştırılmasına yönelik bir çalışma yapılmamakla birlikte, enzimlerin amino-terminalinde yer alan histidin uzantıları SDS-PAGE / Western melezleme tekniği ile protein analizlerinde primer antikor (fare anti-his antikoru) için epitop olarak kullanıldı (**Şekil 3.12B**). Halofilik bakteri lipaz genleri, farklı *E. coli* suşlarında, uygun indüksiyon koşullarında aktif olan laktoz operonu promotör dizisi (Lac) kontrolünde de klonlanarak ekspresyon vektörleri çeşitlendirildi (**Şekil 3.6**). *Escherichia coli* hücrelerinde halofilik lipaz enzimi sentez etmek için oluşturulan tüm ekspresyon vektörleri, restriksiyon haritaları göz önüne alınarak uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edildi (**Şekil 3.6** ve **3.10**). Ekspresyon vektörlerine klonlanan lipaz genlerinin nihai kontrolleri DNA dizi analizleri ile yapıldı ve elde

edilen vektörlerin teorik olarak tasarlanan ekspresyon vektörleri ile birebir aynı olduğu ortaya kondu.

Escherichia coli hücrelerinde rekombinant protein sentezinde değişik stratejiler izlenmektedir. Bunlardan biri ilgili genlerin T7 bakteriyofaj promotörü kontrolünde klonlanması ve T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli* hücrelerine aktarılmasıdır. T7 bakteriyofaj promotör dizisi *E. coli* RNA polimeraz enzimi tarafından tanınmaz. Dolaysıyla bu promotör kontrolünde klonlanan genlerin transkripisyonu için T7 fajina özgü RNA polimeraz enzimine gereksinim vardır. Normal koşullarda T7 RNA polimeraz enzimi *E. coli* hücrelerinde sentez edilen bir enzim değildir. Bunun için T7 RNA polimeraz geninin konak hücrelere aktarılması zorunludur. Bakteriyofaj T7 promotörü ve T7 RNA polimeraz enzimine bağlı işleyen ekspresyon sistemi ilk kez Studier ve arkadaşları (Dubendorff ve Studier, 1991; Rosenberg ve ark., 1987; Studier ve Moffatt, 1986) tarafından geliştirilmiştir. Bu araştırmacılar T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan pET plazmit vektörleri oluşturmuşlardır. Bu vektörlerin ekspresyon yapabilmesi için gerekli T7 RNA polimeraz enzimini bu enzimi kodlayan Lambda faji ile konak hücreleri enfekte ederek sağlamışlar ya da bakteriyofaj T7 RNA polimeraz enzimi sentez eden *E. coli* suşları (BL21-DE3) geliştirmişlerdir. *Escherichia coli* genomuna entegre olmuş halde taşınan T7 RNA polimeraz geni, IPTG ile indüklenen *lacUV5* promotör kontrolünde klonlanmıştır. Dolayısıyla, bu *E. coli* hücrelerinde T7 RNA polimeraz enziminin sentez IPTG varlığında artmaktadır. Bu çalışmada da ilk aşamada halofilik bakteri lipaz genleri T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan pET vektörlerine klonlandı ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarıldı. Bu vektörlerinin *E. coli* hücrelerinde lipaz enzimi sentez edip etmedikleri SDS-PAGE teknikleri ile incelendi (**Şekil 3.12**). Poliakrilamid jelde ayrıştırılan proteinlerin gümüş boyama ile görüntülenmesi sonucunda pET plazmitine klonlanan halofilik lipaz enzimlerinin sentez edildiği görüldü. *Escherichia coli* BL21 hücrelerinde en yüksek ekspresyon düzeyi *B. safensis* geni taşıyan pET-14b-lipC (B.s.) plazmit vektöründe saptandı. Buna karşın *B. licheniformis ve H. hispanica* lipaz enzim düzeylerinin düşük olduğu gözlendi. Özellikle *B. licheniformis'*e ait lipaz enziminin düşük düzeyde olması daha sonra yapılan aktivite testleri ile çelişki oluşturmaktadır. Bunun deneysel bir hatadan kaynaklanma olasılığı vardır. *Escherichia coli* BL21 (DE3) hücrelerinde pET ekspresyon vektörleri ile yapılan testlerde, konak hücrelerde T7 RNA polimeraz enzim sentezini indüklemek için ortama 0.4 mM final konsantrasyonlarda IPTG eklenmiştir. SDS-PAGE ile yapılan incelemelerde, lipaz enzimi sentezinde önemli bir değişme

saptanamamıştır. Dolayısıyla tezde bununla ilgili sonuçlara yer verilmemiştir. *Escherichia coli* BL21 (DE3) hücrelerinde T7 RNA polimeraz enzimini kodlayan gen IPTG ile indüklenen *lacUV5* promotör kontrolünde klonlanmış olsa da, ortama IPTG eklenmeden de hücrelerde yeteri kadar T7 RNA polimeraz enzimin sentez edildiği anlaşılmaktadır. Yapılan çalışmalarda da *lacUV5* promotörünün çok sıkı bir kontrol mekanizmasına sahip olmadığını göstermektedir (Mertens ve ark., 1995; Studier, 1991).

Escherichia coli hücrelerinde rekombinant protein sentezinde izlenen diğer bir yol tac, lac ve trc gibi *E. coli* promotör dizilerinden yararlanmaktır. Bu çalışmada da T7 RNA polimeraz promotörü dışında, *E. coli* RNA polimeraz enzimi tarafından tanınan laktoz operonuna ait Lac promotör dizisinden yararlanıldı. Doğal koşullarda Lac promotörü, LacI düzenleyici (regülatör) genin kontrolünde çalışan *Cis* etkili bir bölgedir. Lac promotörü LacI geni tarafından kodlanan protein tarafından baskılanır (Balaeff ve ark., 2004; Villa ve ark., 2005). Promotör üzerindeki bu baskı laktoz ya da IPTG gibi laktoz analoğu moleküllerin varlığında ortadan kalkar. pGFP plazmit vektörü üzerinden türetilen pLac-hisLipC(B.l.) plazmitinin IPTG olmaksızın hem *E. coli* BL21 hem de Mach1 suşunda etkin bir şekilde lipaz enzimi sentez etmesi (**Şekil 3.12**), bu hücrelerde LacI genin aktif olmadığını düşündürmektedir. Diğer taraftan aynı promotör dizisi taşıyan pLacI-hisLipC(B.l.) plazmit vektörü her iki bakteri suşunda da anlatım yapmamıştır. Bu plazmitin pLac-hisLipC(B.l.)'den farkı, LacI genini taşımasıdır. Plazmit üzerinden kodlanan düzenleyici proteinin Lac promotörünü baskılanmış olma olasılığı yüksektir. Bu çalışmanın amacı, lac promotörünün regülasyonu ile ilgili olmadığı için, pLac-hisLipC(B.l) plazmitinin IPTG varlığında lipaz ekspresyonu yapıp yapmadığı konusu üzerinde durulmadı. pLac-hisLipC(B.l.) plazmiti üzerinden sentez edilen his uzantılı lipaz enzimi Western melezleme tekniği ile de incelendi. **Şekil 3.12B**'de verilen sonuç gümüş boyamada tespit edilen protein bandının his-uzantısı taşıyan lipaz enzimine ait olduğunu ortaya koydu.

Lipaz enzimleri yukarıda da değinildiği gibi trigliseridleri substrat olarak kullanan ve yağ asitleri ile gliserol oluşumunu kataliz eden hidrolaz grubu enzimlerdir. Bilimsel çalışmalarda bu enzimleri aktivitelerinin saptanmasında farklı yöntemler izlenmektedir (Hasan ve ark., 2009; Stoytcheva ve ark., 2012). Bunlar arasında volumetrik ve spektrometrik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipaz enzim aktivitelerinin volumetrik ölçümü, reaksiyon sonucu serbestleşen yağ asitlerinin titrasyonla ölçülmesi temeline dayanır. Metodun ilk uygulanması 1930'lu yıllara kadar gider (Voegtlin ve ark., 1932). Uzun zaman alması ve

duyarlılığnın düşük olması bu yöntemin önemli dezavantajlarıdır. Spektrometrik yöntemlerde farklı substratlar kullanılarak kolorimetrik (Duncombe, 1964), spektrofotometrik (Beisson ve ark., 2000), IR spektrofotometrik (Snabe ve Petersen, 2002) ve florometrik (Wolf ve ark., 1981) ölçümler ile lipaz aktivitesi saptanabilmektedir. Bu tez çalışmasında lipaz ekspresyon vektörleri aktarılan *E. coli* hücrelerinden hazırlanan lizatlarda enzim aktivitelerinin incelenmesinde spektrofotometrik yöntemden yararlanıldı. Spektrofotometrik yöntemin en önemli avantajı, hızlı ve kantitatif sonuç vermesidir. Çalışmada özellikle ılımlı halofilik *Bacillus* türlerine ait hipotetik lipaz enzimlerinin nitelikleri ve gerçek lipaz olup olmadıkları bilinmediği için farklı uzunluklarda yağ asidi zinciri bağlı p-nitrofenil bileşiklerinden, pNFL, pNFP ve pNFA denendi. Çalışmanın ilk aşamasında pET-14b plazmitine klonlanarak oluşturulan ekspresyon vektörleri, sadece *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde aktif oldukları için, bu hücrelere aktarıldı ve hazırlanan lizatlarda lipaz enzim aktivitesi pNFL kullanılarak spektrofotometrik olarak incelendi. Deneylerde ticari olarak temin edilen *Candida rugosa* lipaz enzimi standart olarak kullanıldı. En yüksek lipaz aktivitesi *B. licheniformis* lipaz enzimini kodlayan plazmit aktarılan *E. coli* BL21 (DE3) hücreleride saptandı. En düşük aktivite ise *H. hispanica* lipaz geni aktarılan bakteri lizatlarında ölçüldü (**Şekil 3.16**). *Escherichi coli* BL21 (DE3) hücreleri ile yapılan lipaz aktivite testlerinden sonra, hem farklı *E. coli* suşlar hem de farklı substratlar kullanılarak deneyler tekrar edildi. Özellikle esteraz grubu enzimlerin aktivitelerinin saptanmasında kullanılan pNFA (De Yan ve ark., 2013; Fu ve ark., 2011; Jiang ve ark., 2012b; Riedel ve ark., 2003) ile yapılan denemelerde, hem plazmit taşıyan hem de plazmit taşımayan kontrol bakteri lizatlarında yüksek düzeylerde aktiviteler saptandı. Standart kontrol olarak kullanılan *C. rugosa* lipazının pNFA üzerinde etkili olmaması, hücre lizatlarında saptanan yüksek aktivitenin, büyük olasılıkla endojen esterazlardan kaynakladığı sonucunu verdi (**Şekil 3.17A**). pNFL ve pNFP'ın subtrat olarak kullanıldığı deneylerde en yüksek aktiviteler *E. coli* JM107 ve *E. coli* Mach1 bakteri suşlarında *B. licheniformis* lipaz enzimi ile elde edildi. *Haloarcula hispanica* lipaz enzimi kodlayan plazmitleri taşıyan tüm *E. coli* suşlarında enzim aktivitesi çok düşük bulundu **(Şekil 3.17)**. Aşırı halofilik bir arke olan *H. hispanica'*ya ait lipaz geni de *B. licheniformis* ve *B. safensis* ait lipaz genleri gibi gen üzerinden kodlanacak protein homolojileri gözönünde bulundurularak tanımlanmış bir gendir (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP010529.1?from=2401516&to=2402471&sat=4&sat_key=133189822&report=gbwithparts* – Erişim tarihi 01.106.2017). Bu gen üzerinden sentez edilen enzimin lipaz aktivitesi ile ilgili veriye

rastlanmamıştır. Dolayısıyla *H. hispanica'*ya ait lipaz geni aktarılan *E. coli* hücreleri lizatlarında pNFL ve pNFP subtratları için çok düşük düzeylerde aktivitenin görülmesi değişik nedenlere bağlı olabilir. Bunlardan biri, bu gen üzerinden kodlanan proteinin gerçek lipaz enzim aktivitesine sahip olmaması, bir diğeri ise bu enzimin *E. coli* hücrelerinde yeteri kadar sentez edilememesi olabilir. *Escherichia coli* lizatlarının SDS-PAGE analizleri sonuçları da *H. hispanica* lipaz enzimi düzeyinin çok düşük olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında ele alınan lipaz enzimleri arasında en yüksek aktivite *B. licheniformis*'e ait hipotetik gen üzerinden kodlanan enzim ile elde edilmiştir. Farklı *E. coli* suşları ile yapılan denemelerde ise en yüksek aktiviteler pLac-lipC(B.l.) yada pLac-his-lipC(B.l.) plazmitleri akatarılan JM107 ve Mach1'de hücre lizatlarında ölçülmüştür. Söz konusu plazmitlerden kodlanan histidin uzantısı taşımayan lipaz ve histidin uzantılı lipaz enzimlerinin her ikisinin de aktif olması, enzimin amino-terminalinde yer alan bu uzantısının aktiviteyi olumsuz yönde etkilemediğini göstermiştir. Dolayısıyla *B. licheniformis*'e ait lipaz enziminin farklı ortam koşullarında aktivitesini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda pLac-his-lipC(B.l.) ile transforme edilen *E. coli JM107* bakteri suşundan yararlanılmıştır.

Escherichia coli JM107 hücrelerinde rekombinant olarak sentez edilen *B. licheniformis*'e ait lipaz enziminin farklı pH değerlerinde, farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında, farklı sıcaklıklarda ve non-iyonik bir deterjan olan Triton X-100 varlığında aktivitesi test edildi. Farklı ortam koşullarında yapısal özelliklerini ve aktivitelerini korumaları enzimlerin özellikle endüstriyel açıdan önemini arttırmaktadır. Yapılan testler sonucunda *E. coli* JM107 hücrelerinden sentez edilen *B. licheniformis*'e ait lipaz enziminin en iyi aktivite göstediği pH aralığı 7.0 - 9.5 olarak belirlendi. pH 6'da enzim aktivitesinde % 70-80 oranında azalma olduğu görüldü. *Candida rugosa* lipaz enzimi ile karşılaştırıldığında, maksimum aktivitenin biraz daha bazik yöne kaydığı sonucuna varıldı (**Şekil 3.18**). Bu yönüyle *B. licheniformis* lipaz enzimi endüstriyel uygulamalar için bira daha avantajlı görülebilir.

Genel olarak enzimlerin aktivitelerini etkileyen en önemli faktörlerden biri ortam sıcaklığıdır. Ortam sıcaklığının değişmesi sadece enzim aktivitesini etkilemez, artışın belirli değerlerin üzerine çıkması, aynı zamanda enzimin yapısında geri dönüşümsüz olarak bozulmaya (denatürasyon) neden olur. Sıcak su kaynaklarında yaşayan termofil bakterilere ait protein ve enzimler bu yönüyle çok daha stabil yapıya sahiptirler (Fitter ve Haber-Pohlmeier,

2004; Parvaresh ve ark., 1990; Ward ve Moo-Young, 1988). Örneğin *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen Taq DNA polimeraz enzimi 90-95 ^{o}C'da saatlerce aktivitesini kaybetmez (Chien ve ark., 1976). Bu özelliğinden dolayı termostabil DNA polimeraz enzimleri bu çalışmada da olduğu gibi, yüksek sıcaklık uygulamaları gerektiren *in vitro* DNA sentezi (PZR) deneylerinde kullanılır. Fakat halofilik bakterilere ait enzimlerin çok yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması beklenmez. Bu tez kapsamından da *B. licheniformis*'e ait lipaz enziminin 30°C-55°C aralığında pNFL üzerinde gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak incelendi. Elde edilen sonuçlar, bu enzimin 30-45°C aralığında yüksek aktivite gösterdiğini, 55°C'da ise aktivitesinde ortalama %50 oranında azalma olduğunu ortaya koydu. Oysa standart kontrol olarak kullanılan *C. rugoza* enziminin 45-55°C aralığında en yüksek aktivite değerine sahip olduğu görüldü (**Şekil 3.19**). Bu sonuç ılımlı halofilik bir organizma olan *B. licheniformis* lipaz enzimi aktivitesinde belirli değerin üzerindeki sıcaklıklarda rolatif olarak daha fazla düşüş olduğunu gösterdi.

Enzimlerin yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivitelerini korumaları endüstriyel kullanın açısında önemlidir. Bu nedenle farklı türden bir çok halofilik organizmaya ait lipaz enzimleri üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Birçok halofilik bakterilerden izole edilen lipaz enzimlerinin daha yüksek tuz konsantarsyonlarını tolere ettiği yapılan bu çalışmada gösterilmiştir. Örneğin, yüksek konsantrasyonda tuz içeren fermente besi ortamlarından izole edilen *Lactobacillus plantarum*'a ait lipaz enziminin % 2.5 (~0.43 M) ve % 5 (~0.85 M) oranında NaCl içeren ortamlarda maksimum aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Esteban-Torres ve ark., 2015). Li ve Yu (Li ve Yu, 2012) tuzlu su kaynağından izole ettikleri *Chromohalobacter sp.* LY7-8'e ait lipaz enziminin % 0-20 aralığında NaCl konsantrasyonlarında aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada, Özgen ve arkadaşları (Ozgen ve ark., 2016) *Haloarcula hispanica* lipaz enzimi ile gerçekleştirilmiş, bu enzimin 0-5 M aralığında NaCl konsantrasyonlarında aktivitesin anlamlı bir değişme olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, *Bacillus licheniformis*'e ait lipaz enziminin farklı iyonik kuvvetlerde aktivitesinin belirlenmesinde NaCl kullanıldı. Reaksiyon ortamına 0.1, 0.5 ve 2.5 M final konsantrasyonarda NaCl eklendi. *Escherichia coli* JM107 hücrlerinde sentez edilen *B. licheniformis* lipaz enziminin 0.5 M NaCl varlığında pNFL üzerinde maksimum aktivite gösterdiğini ortaya koydu. *Candida rugosa* lipaz enzimi ile karşılaştırıldığında *B. licheniformis* lipaz enziminin daha yüksek tuz konsantrasyonlarına aktif olduğu görüldü (**Şekil 3.20**).

Lipaz enzimlerinin endüstride en önemli kullanım alanlarından biri deterjanlardır. Bir çok deterjan formasyonunda anyonik ve non-iyonik yüzey aktif maddelerin (sürfaktanlar) yanı sıra lipaz enzimleri de içerir (Hasan ve ark., 2010; Hemachander ve Puvanakrishnan, 2000; Thom ve ark., 1990). Bu nedenle, özellikle mikroorganizmalardan izole edilen lipazların farklı ortam koşullarında aktiviteleri değerlendirilir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmada. *E. coli* JM107 hücrelerinde sentez edilen *B. licheniformis*'e ait lipaz enziminin, belirli konsantrasyonlarda non-iyonik bir deterjan olan Triton X-100 içeren ortamlarda pNFL üzerinde gösterdiği aktivite belirlendi. Triton X-100 % 0.01-1 konsantrasyon aralığında denendi. Elde edilen sonuçlar *B. licheniformis*'e ait lipaz enziminin, % 0.01-0.25 aralığında Triton X-100 içeren ortamlarda aktivitesini koruduğunu ortaya koydu. Kontrol için kullanılan *C. rugosa* lipaz enziminin aktivtesinde ise % 0.05 gibi çok düşük konsantrasyonlarda, ortalama %60-70 oranında düşüş gözlendi (**Şekil 3.21**). Bu veriler *B. licheniformis*'e ait lipaz enziminin deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucunu verdi.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında aşırı halofilik arke, *H. hispanica* ve ılımlı halofilik bakteriler, *B. safensis* ve *B. licheniformis*'e ait hipotetik lipaz genleri bu organizmaların genom DNA'ları üzerinde PZR ile çoğaltıldı ve *E. coli* ekspresyon vektörlerine başarılı bir şekilde kolonlandı. Oluşturulan plazmit vektörler farklı *E. coli* suşlarına aktarıldı ve bu hücrelerde rekombinant olarak sentez edilen lipaz enzimleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. *Haloarcula hispanica* lipaz enziminin *E. coli* hücrelerinde yeteri kadar sentez edilmediği ve istenilen düzeyde aktif olmadığı saptandı. *Escherichia coli* hücrelrinde etkin olarak sentez edilen ılımlı halofilik bakterilerden *B. licheniformis*'e ait lipaz enzimin çok daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ortaya koydu. *Bacillus licheniformis*'e ait lipaz enziminin pNFL subatratını hidroliz aktivitesi faklı ortam koşullarında test edildi. Bu enzimin NaCl ve Triton X-100 konsantrasyonlarındakı artışı daha iyi tolere ettiği gözlendi.

KAYNAKLAR

Adham N.Z., Ahmed E.M. (2009) Extracellular lipase of Aspergillus niger NRRL3; production, partial purification and properties. Indian J Microbiol 49:77-83. DOI: 10.1007/s12088-009-0004-2.

Adrio J.L., Demain A.L. (2014) Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. Biomolecules 4:117-39. DOI: 10.3390/biom4010117.

Alberton D., Mitchell D.A., Cordova J., Peralta-Zamora P., Krieger N. (2010) Production of a fermented solid containing lipases of Rhizopus microsporus and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. Food Technology and Biotechnology, 48:28–35.

Andualema B., Gessesse A. (2012) Microbial Lipase and Their Industrial Applications: Review. Biotechnology 11:100-118.

Angkawidjaja C., Paul A., Koga Y., Takano K., Kanaya S. (2005) Importance of a repetitive nine-residue sequence motif for intracellular stability and functional structure of a family I.3 lipase. FEBS Lett 579:4707-12. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.07.041.

Anobom C.D., Pinheiro A.S., De-Andrade R.A., Aguieiras E.C., Andrade G.C., Moura M.V., Almeida R.V., Freire D.M. (2014) From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. Biomed Res Int 2014:684506. DOI: 10.1155/2014/684506.

Aravindan R.A., P. iruthagiri, T. (2007) Lipase applications in food industry Indian Journal of Biotechnology 6:141-158

Arpigny J.L., Jaeger K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem J 343 Pt 1:177-83.

Balaeff A., Mahadevan L., Schulten K. (2004) Structural basis for cooperative DNA binding by CAP and lac repressor. Structure 12:123-32.

Bassegoda A., Cesarini S., Diaz P. (2012) Lipase improvement: goals and strategies. Comput Struct Biotechnol J 2:e201209005. DOI: 10.5936/csbj.201209005.

Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R. (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2: 133–153.

Borrelli G.M., Trono D. (2015) Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. Int J Mol Sci 16:20774-840. DOI: 10.3390/ijms160920774.

Bowers K.J., Mesbah N.M., Wiegel J. (2009) Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? Saline Systems 5:9. DOI: 10.1186/1746-1448-5-9.

Casas-Godoy L., Duquesne S., Bordes F., Sandoval G., Marty A. (2012) Lipases: an overview. Methods Mol Biol 861:3-30. DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5_1.

Cherif S., Aloui F., Carriere F., Sayadi S. (2014) Lipase pre-hydrolysis enhance anaerobic biodigestion of soap stock from an oil refining industry. J Oleo Sci 63:109-14.

Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme

thermophile Thermus aquaticus. J Bacteriol 127:1550-7.
Choo W.S., Birch E.J., Stewart I. (2009) Radical scavenging activity of lipophilized products from transesterification of flaxseed oil with cinnamic acid or ferulic acid. Lipids 44:807-15. DOI: 10.1007/s11745-009-3334-2.
Chu L., Robinson D.K. (2001) Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. Curr Opin Biotechnol 12:180-7.
Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W., Helling R.B. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 70:3240-4.
Çağlayan E. (2014) DNA Metil Transferaz Enzimlerinin Yaşlanma ile İlgili İnsan Klotho Geni Anlatımı Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisan Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye:59.
Dawid I.B., Wahli W. (1979) Application of recombinant DNA technology to questions of developmental biology: a review. Dev Biol 69:305-28.
De Yan H., Zhang Y.J., Liu H.C., Zheng J.Y., Wang Z. (2013) Influence of ammonium salts on the lipase/esterase activity assay using p-nitrophenyl esters as substrates. Biotechnol Appl Biochem 60:343-7. DOI: 10.1002/bab.1095.
Demain A.L., Vaishnav P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 27:297-306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
Donio M.B., Ronica S.F., Viji V.T., Velmurugan S., Jenifer J.A., Michaelbabu M., Citarasu T. (2013) Isolation and characterization of halophilic Bacillus sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. Asian Pac J Trop Med 6:876-83. DOI: 10.1016/S1995-7645(13)60156-X.
Dubendorff J.W., Studier F.W. (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. J Mol Biol 219:45-59.
Duncombe W.G. (1964) The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. Clin Chim Acta 9:122-5.
Esteban-Torres M., Manche J.M., Rivas B., Munoz R. (2015) Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria Lactobacillus plantarum useful in food fermentations. LWT - Food Sci Technol 60:246–252.
Fitter J., Haber-Pohlmeier S. (2004) Structural stability and unfolding properties of thermostable bacterial alpha-amylases: a comparative study of homologous enzymes. Biochemistry 43:9589-99. DOI: 10.1021/bi0493362.
Fonseca R.B., Kasuya A.V., Favarao I.N., Naves L.Z., Hoeppner M.G. (2015) The influence of polymerization type and reinforcement method on flexural strength of acrylic resin. ScientificWorldJournal 2015:919142. DOI: 10.1155/2015/919142.
Freedonia. (2015) World Enzymes: Market Environmen:316.
Fu C., Hu Y., Xie F., Guo H., Ashforth E.J., Polyak S.W., Zhu B., Zhang L. (2011) Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. Appl Microbiol Biotechnol 90:961-70. DOI: 10.1007/s00253-010-3079-0.
Fukuda H., Kondo A., Tamalampudi S. (2009) Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by

yeast and fungal whole-cell biocatalysts. Biochemical Engineering Journal 44:2-12.

Garabito M.J., Arahal D.R., Mellado E., Marquez M.C., Ventosa A. (1997) Bacillus salexigens sp. nov., a new moderately halophilic Bacillus species. Int J Syst Bacteriol 47:735-41. DOI: 10.1099/00207713-47-3-735.

Garcia-Silvera E.E., Martinez-Morales F., Bertrand B., Morales-Guzman D., Rosas-Galvan N.S., Leon-Rodriguez R., Trejo-Hernandez M.D.R. (2017) Production and application of a thermostable lipase from Serratia marcescens in detergent formulation and biodiesel production. Biotechnol Appl Biochem. DOI: 10.1002/bab.1565.

Ghasemi Y., Rasoul-Amini S., Kazemi A., Zarrinic G., Morowvat M.H., Kargar M. (2011) Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. Mikrobiologiia 80:477-81.

Ghori M.I., Iqbal M.J., Hameed A. (2011) Characterization of a novel lipase from Bacillus sp. isolated from tannery wastes. Braz J Microbiol 42:22-9. DOI: 10.1590/S1517-83822011000100003.

Ghosh P.K., Saxena R.K., Gupta R., Yadav R.P., Davidson S. (1996) Microbial lipases: production and applications. Sci Prog 79 (Pt 2):119-57.

Gifre L., Aris A., Bach A., Garcia-Fruitos E. (2017) Trends in recombinant protein use in animal production. Microb Cell Fact 16:40. DOI: 10.1186/s12934-017-0654-4.

Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Appl Microbiol Biotechnol 64:763-81. DOI: 10.1007/s00253-004-1568-8.

Hakkıoğlu E. (2017) Mikroorganizmalarda İnsan Proinsülin Proteininin Üretilmesi ve Analizi Yüksek Lisan Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye:61.

Hasan F., Shah A.A., Hameed A. (2006b) Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology 39:235–251.

Hasan F., Shah A.A., Hameed A. (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. Biotechnol Adv 27:782-98. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.001.

Hasan F., Shah A.A., Javed S., Hameed A. (2010) Enzymes used in detergents: Lipases. African Journal of Biotechnology 9:4836-4844.

Hemachander C., Puvanakrishnan R. (2000) Lipase from Ralstonia pickettii as an additive in laundry detergent formulations. Process Biochemistry 35:809-814.

Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. (1988) Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. Bio/Technology 6:1321–1325.

Hwang H.T., Qi F., Yuan C., Zhao X., Ramkrishna D., Liu D., Varma A. (2014) Lipase-catalyzed process for biodiesel production: protein engineering and lipase production. Biotechnol Bioeng 111:639-53. DOI: 10.1002/bit.25162.

İbişoğlu Ş. (2015) Rekombinant Olarak Üretilecek Çözünür Halde Glukagon Reseptör Proteininin Glukagona Olan İlgisinin Araştırılması. Yüksek Lisan Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye:66.

Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli

with plasmids. Gene 96:23-8.
Jaeger K.E., Eggert T. (2002) Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol 13:390-7.
Jiang X., Huo Y., Cheng H., Zhang X., Zhu X., Wu M. (2012a) Cloning, expression and characterization of a halotolerant esterase from a marine bacterium Pelagibacterium halotolerans B2T. Extremophiles 16:427-35. DOI: 10.1007/s00792-012-0442-3.
Jiang X., Xu X., Huo Y., Wu Y., Zhu X., Zhang X., Wu M. (2012b) Identification and characterization of novel esterases from a deep-sea sediment metagenome. Arch Microbiol 194:207-14. DOI: 10.1007/s00203-011-0745-2.
Kakde R.B. (2011) Extracellular Lipase Enzyme Production by Seed-Borne Fungi under the Influence of Physical Factors. Journal of Biology 3:94–100.
Kalishwaralal K., Deepak V., Ram Kumar Pandian S., Gurunathan S. (2009) Biological synthesis of gold nanocubes from Bacillus licheniformis. Bioresour Technol 100:5356-8. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.05.051.
Kotogán A., Németh B., Vágvölgyi C., Papp T., Takó M. (2014) Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in Mucoromycotina strains. Food Technology and Biotechnology, 52:73–82.
Kumar A., Dhar K., Kanwar S.S., Arora P.K. (2016a) Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. Biol Proced Online 18:2. DOI: 10.1186/s12575-016-0033-2.
Kumar A., Khan A., Malhotra S., Mosurkal R., Dhawan A., Pandey M.K., Singh B.K., Kumar R., Prasad A.K., Sharma S.K., Samuelson L.A., Cholli A.L., Len C., Richards N.G., Kumar J., Haag R., Watterson A.C., Parmar V.S. (2016b) Synthesis of macromolecular systems via lipase catalyzed biocatalytic reactions: applications and future perspectives. Chem Soc Rev 45:6855-6887. DOI: 10.1039/c6cs00147e.
Kumar A., Kundu S., Debnath Das M. (2017) Expression, purification and evaluation of recombinant lipoprotein of Salmonella typhi as a vaccine candidate. Biologicals 46:108-113. DOI: 10.1016/j.biologicals.2017.01.008.
Kumar D., Parshad R., Gupta V.K. (2014) Application of a statistically enhanced, novel, organic solvent stable lipase from Bacillus safensis DVL-43. Int J Biol Macromol 66:97-107. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.015.
Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., Kanwar S.S., Gupta R. (2005) Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic Bacillus coagulans BTS-3. Protein Expr Purif 41:38-44. DOI: 10.1016/j.pep.2004.12.010.
Latorre J.D., Hernandez-Velasco X., Wolfenden R.E., Vicente J.L., Wolfenden A.D., Menconi A., Bielke L.R., Hargis B.M., Tellez G. (2016) Evaluation and Selection of Bacillus Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. Front Vet Sci 3:95. DOI: 10.3389/fvets.2016.00095.
Li X., Yu H.-Y. (2012) Characterization of a novel extracellular lipase from a halophilic isolate, Chromohalobacter sp. LY7-8. African Journal of Microbiology Research 6: 3516-3522.
Loli H., Narwal S.K., Saun N.K., Gupta R. (2015) Lipases in Medicine: An Overview. Mini

Rev Med Chem 15:1209-16.
Lopez-Iglesias M., Gotor-Fernandez V. (2015) Recent Advances in Biocatalytic Promiscuity: Hydrolase-Catalyzed Reactions for Nonconventional Transformations. Chem Rec 15:743-59. DOI: 10.1002/tcr.201500008.
Lü Y., Lu H., S. W., J. H., H. X., C. J. (2017) An Acidic Exopolysaccharide from Haloarcula hispanica ATCC33960 and Two Genes Responsible for Its Synthesis. Hindawi Archaea 2017:1-12.
Mahmoud G.A., Koutb M.M.M., Morsy F.M., Bagy M.M.K. (2015) Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus Aspergillus terreus. European Journal of Biological Research 5:70–77.
Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982) Molecular cloning : a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
Margesin R., Labbe D., Schinner F., Greer C.W., Whyte L.G. (2003) Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. Appl Environ Microbiol 69:3085-92.
Mello Bueno P.R., de Oliveira T.F., Castiglioni G.L., Soares Junior M.S., Ulhoa C.J. (2015) Application of lipase from Burkholderia cepacia in the degradation of agro-industrial effluent. Water Sci Technol 71:957-64. DOI: 10.2166/wst.2015.037.
Mertens N., Remaut E., Fiers W. (1995) Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. Biotechnology (N Y) 13:175-9.
Mondino L.J., Asao M., Madigan M.T. (2009) Cold-active halophilic bacteria from the ice-sealed Lake Vida, Antarctica. Arch Microbiol 191:785-90. DOI: 10.1007/s00203-009-0503-x.
Morrow J.F., Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W., Goodman H.M., Helling R.B. (1974) Replication and transcription of eukaryotic DNA in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 71:1743-7.
Munson M.A., Nedwell D.B., Embley T.M. (1997) Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. Appl Environ Microbiol 63:4729-33.
Nagarajan S. (2012) New tools for exploring "old friends-microbial lipases". Appl Biochem Biotechnol 168:1163-96. DOI: 10.1007/s12010-012-9849-7.
Noureddini H., Gao X., Philkana R.S. (2005) Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresour Technol 96:769-77. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.05.029.
Ozgen M., Attar A., Elalmis Y., Birbir M., Yucel S. (2016) Enzymatic activity of a novel halotolerant lipase from Haloarcula hispanica 2TK2. Polish Journal of Chemical Technology 18:20–25.
Padmapriya B., Rajeswari T., Noushida E., Sethupalan D.G., Venil C.K. (2011) Production of lipase enzyme from Lactobacillus spp. and its application in the degradation of meat. World Applied Sciences Journal 12: 1798–1802.
Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem 29 (Pt 2):119-31.

Park H.G., Lim Y.R., Han S., Jeong D., Kim D. (2017) Enhanced Purification of Recombinant Rat NADPH-P450 Reductase by Using a Hexahistidine-Tag. J Microbiol Biotechnol 27:983-989. DOI: 10.4014/jmb.1701.01028.

Parvaresh F., Vic G., Thomas D., Legoy M.D. (1990) Uses and potentialities of thermostable enzymes. Ann N Y Acad Sci 613:303-12.

Pirinçal A. (2014) İnfluenza Virüsü NS1 Proteini ile İlişkili Hücresel Faktörlerin Maya İkili-Hibrid Metodu ile Saptanması. Yüksek Lisan Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye:69.

Rai A.K., Sanjukta S., Chourasia R., Bhat I., Bhardwaj P.K., Sahoo D. (2017) Production of bioactive hydrolysate using protease, beta-glucosidase and alpha-amylase of Bacillus spp. isolated from kinema. Bioresour Technol 235:358-365. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.03.139.

Ramnath L., Sithole B., Govinden R. (2017) Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. Can J Microbiol 63:179-192. DOI: 10.1139/cjm-2016-0447.

Reetz M.T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. Curr Opin Chem Biol 6:145-50.

Rezaei S., Shahverdi A.R., Faramarzi M.A. (2017) Isolation, one-step affinity purification, and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium Aquisalibacillus elongatus and its application in the delignification of sugar beet pulp. Bioresour Technol 230:67-75. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.01.036.

Riedel K., Talker-Huiber D., Givskov M., Schwab H., Eberl L. (2003) Identification and characterization of a GDSL esterase gene located proximal to the swr quorum-sensing system of Serratia liquefaciens MG1. Appl Environ Microbiol 69:3901-10.

Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D.S., Lin S.W., Dunn J.J., Studier F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene 56:125-35.

Sanchez-Porro C., Martin S., Mellado E., Ventosa A. (2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J Appl Microbiol 94:295-300.

Sangeetha R., Geetha A., Arulpandi I. (2011) Pongamia pinnata seed cake: a promising and inexpensive substrate for production of protease and lipase from Bacillus pumilus SG2 on solid-state fermentation. Indian J Biochem Biophys 48:435-9.

Sasaki H., Bothner B., Dell A., Fukuda M. (1987) Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. J Biol Chem 262:12059-76.

Schmid R.D., Verger R. (1998) Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. Angew. Angew Chem. Int. Ed. Engl. 37:1608–1633.

Schmidt-Dannert C. (1999) Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. Bioorg Med Chem 7:2123-30.

Schreck S.D., Grunden A.M. (2014) Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. Appl Microbiol Biotechnol 98:1011-21. DOI: 10.1007/s00253-013-5417-5.

Seitz E.W. (1974) Industrial application of microbial lipases: a review. J Am Oil Chem Soc

51:12-6.
Setlow P. (2006) Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. J Appl Microbiol 101:514-25. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x.
Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. (2008) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. Biotechnol Adv 26:246-65. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnol Adv 19:627-62.
Shirazian P., Asad S., Amoozegar M.A. (2016) The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase. EXCLI J 15:268-79. DOI: 10.17179/excli2016-146.
Singh A.K., Mukhopadhyay M. (2012) Overview of fungal lipase: a review. Appl Biochem Biotechnol 166:486-520. DOI: 10.1007/s12010-011-9444-3.
Snabe T., Petersen S.B. (2002) Application of infrared spectroscopy (attenuated total reflection) for monitoring enzymatic activity on substrate films. J Biotechnol 95:145-55.
Stoytcheva M., Montero G., Zlatev R., A. Leon J., Gochev V. (2012) Analytical methods for lipases activity determination: A review. Current Analytical Chemistry 8:400-407.
Studier F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J Mol Biol 219:37-44.
Studier F.W., Moffatt B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol 189:113-30.
Tang L., Xia Y., Wu X., Chen X., Zhang X., Li H. (2017) Screening and characterization of a novel thermostable lipase with detergent-additive potential from the metagenomic library of a mangrove soil. Gene 625:64-71. DOI: 10.1016/j.gene.2017.04.046.
Teh S.S., Voon P.T., Hock Ong A.S., Choo Y.M. (2016) Incorporation of Palmitic Acid or Stearic Acid into Soybean Oils Using Enzymatic Interesterification. J Oleo Sci 65:797-802. DOI: 10.5650/jos.ess16097.
Thom D., Swarthoff T., Maat J. (1990) Detergent formulations containing alkaline lipase derived from Pseudominas plantarii. Int. J. Syst. Bacteriol Rev 87:144-152.
Treichel H., de Oliveira D., Mazutti M.A., Di Luccio M., Oliveira J.V. (2010) A review on microbial lipases production. Food and Bioprocess Technology 3:182–196.
Uğurlu H. (2016) Hax-1 Geni Susturulan Hücrelerde İnfluenza Virüsü Replikasyonunun Araştırılması. Yüksek Lisan Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye:39.
Valladao A.B., Sartore P.E., Freire D.M., Cammarota M.C. (2009) Evaluation of different pre-hydrolysis times and enzyme pool concentrations on the biodegradability of poultry slaughterhouse wastewater with a high fat content. Water Sci Technol 60:243-9. DOI: 10.2166/wst.2009.341.
Ventosa A., Nieto J.J. (1995) Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. World J Microbiol Biotechnol 11:85-94. DOI: 10.1007/BF00339138.
Villa E., Balaeff A., Schulten K. (2005) Structural dynamics of the lac repressor-DNA

complex revealed by a multiscale simulation. Proc Natl Acad Sci U S A 102:6783-8. DOI: 10.1073/pnas.0409387102.

Voegtlin W.L., Greengard H., Ivy A.C. (1932) The Response of the Canine and Human Pancreas to Secretin Am. J. Physiol. 100:266-273.

Walsh G. (2006) Biopharmaceutical benchmarks 2006. Nat Biotechnol 24:769-76. DOI: 10.1038/nbt0706-769.

Walsh G. (2014) Biopharmaceutical benchmarks 2014. Nat Biotechnol 32:992-1000. DOI: 10.1038/nbt.3040.

Wang B., Wang A., Cao Z., Zhu G. (2016) Characterization of a novel highly thermostable esterase from the Gram-positive soil bacterium Streptomyces lividans TK64. Biotechnol Appl Biochem 63:334-43. DOI: 10.1002/bab.1465.

Ward O.P., Moo-Young M. (1988) Thermostable enzymes. Biotechnol Adv 6:39-69.

Westers L., Westers H., Quax W.J. (2004) Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. Biochim Biophys Acta 1694:299-310. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.02.011.

Wolf C., Sagaert L., Bereziat G. (1981) A sensitive assay of phospholipase using the fluorescent probe 2-parinaroyllecithin. Biochem Biophys Res Commun 99:275-83.

Xu D., Cote J.C. (2003) Phylogenetic relationships between Bacillus species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. Int J Syst Evol Microbiol 53:695-704. DOI: 10.1099/ijs.0.02346-0.

Yun J., Ryu S. (2005) Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. Microb Cell Fact 4:8. DOI: 10.1186/1475-2859-4-8.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: ABDOULIE O. TOURAY

Doğum Tarihi: 08. 06. 1988./GAMBIYA

Eğitim Bilgileri:

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Biyokimya - Yüksek lisans (2015-2017)

İstanbul Üniversitesi Dil Merkezi (2014-2015) -Türkçe hazırlık programı

Gambiya Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü-Biyokimya-Kimya (2009-2013) (Gambiya)

Poster Bildiri: Abdoulie O. Touray, Ayşe Oğan, Pınar Çağlayan, Meral Birbir, Kadir Turan.

Production and Analysis of Lipase Enzymes of Halophilic Microorganisms in *Escherichia coli*. Poster session presented at: P-0830 Biotechnology. IVEK 2017 – 03rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, April, 26-29, 2017 - Istanbul /Turkey