

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

YEREL *BACILLUS* SOYLARININ ÜRETTİĞİ
LİPAZLARIN ÖZELLİKLERİNİN
YÖNLENDİRİLMİŞ EVRİM VE/VEYA
AKILCI PROTEİN TASARIMI
YÖNTEMLERİ İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

Nagihan AKBULUT
DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

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

YEREL *BACILLUS* SOYLARININ ÜRETTİĞİ
LİPAZLARIN ÖZELLİKLERİNİN
YÖNLENDİRİLMİŞ EVRİM VE/VEYA
AKILCI PROTEİN TASARIMI
YÖNTEMLERİ İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

Nagihan AKBULUT
DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
Yrd. Doç.Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK

GEBZE
2013



DOKTORA TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.04.2013.....tarih ve 2013/18 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 07.05/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Nerihan Akbulut.....ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : YRD. DOÇ. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

ÜYE

: PROF. DR. TAMER YAĞCI

ÜYE

: PROF. DR. HAKAN BERMEK

ÜYE

: YRD. DOÇ. DR. F. İNCİ ÖZDEMİR

ÜYE

: YRD. DOÇ. DR. NİL SAYDAN

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

Not: Formdaki boşluklar mutlaka Ms Word ortamında doldurulacak.

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: YEREL *BACILLUS* SOYLARININ ÜRETTİĞİ LİPAZLARIN ÖZELLİKLERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ EVRİM VE/VEYA AKILCI PROTEİN TASARIMI YÖNTEMLERİ İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

YAZARIN ADI: NAGİHAN AKBULUT

Lipazlar (EC 3.1.1.3), gliserol ve uzun zincirli yağ asidi esterlerinin sentez ve hidrolizini kataliz ederler. Mikrobiyal kaynaklı lipazlar, önemli ticari enzimler arasında yer alırlar. *Bacillus pumilus* lipazları, *Bacillus subtilis* lipazları ile % 74-77 dizi benzerliği taşırlar ve I.4 alt ailesine aittirler. Lipazların endüstriyel uygulamalarda biyokatalist olarak kullanılması için, aktivite, sıcaklık kararlılığı, substrat özgüllüğü ve enantiyo seçicilik gibi özelliklerin geliştirilmesi istenir. Yönlendirilmiş evrim, enzim özelliklerinin geliştirilmesi için kullanılan güçlü bir yöntemdir. DNA karıştırma, moleküler çeşitliliğin oluşturulması için kullanılan en iyi yöntemler arasındadır. Gen çeşitliliği, homolog rekombinasyon ile elde edilir ve aktivite, sıcaklık kararlılığı ya da enantiyo seçicilikte oluşan önemli değişikliklerle sonuçlanır.

Bu çalışmada, *Bacillus pumilus* lipazlarının enzimatik aktivitelerinin artırılması amacıyla DNA karıştırma yöntemi, L5 ve L21 yerel izolatlarından elde edilen lipaz genlerine uygulandı. İki “crossover” pozisyonu ve üç nokta mutasyonu taşıyan L3-3 kimerik mutanti “High-throughput” tarama yöntemi kullanılarak seçildi. L3-3 mutanti, ebeveyn enzimlere görece 6.4 ve 8.2 kat daha yüksek spesifik aktivite, farklı deterjanlara ve organik çözücülere de yüksek tolerans gösterdi ve 50 °C’teki yarı ömrünün ebeveyn enzimlere görece 9 kat daha fazla olduğu belirlendi. L3-3 mutantının homoloji modelleme çalışmaları, yüksek homoloji gösteren *B. subtilis* A lipazına dayandırılarak yapıldı. Mutant enzimin artan sıcaklık kararlılığının yapıdaki sağlamlık ve azalan hidrofobiklikten, artan spesifik aktivitenin ise mutasyonların aktif bölgeye yakınlığından kaynaklandığı düşünüldü.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: IMPROVEMENT CHARACTERISTICS OF LOCAL *BACILLUS* LIPASES BY DIRECTED EVOLUTION AND/OR RATIONAL PROTEIN DESIGN METHODS

NAME OF THE AUTHOR: NAGİHAN AKBULUT

Lipases (EC 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis and synthesis of esters of glycerol and long-chain fatty acids. In particular, lipases of microbial origin are among the most important commercial enzymes. *Bacillus pumilus* lipases have been classified as members of subfamily I.4, sharing sequence identities of 74-77%, also the well-characterized *Bacillus subtilis* lipases belong to this family. In order to use lipases as biocatalysts in industrial applications, it is often desirable to improve properties such as activity, thermostability, substrate specificity and enantioselectivity. In this respect, directed evolution is a powerful technique that has been used to improve various properties of enzymes. One of the best methods for creating molecular diversity is DNA shuffling, where gene diversity is rapidly generated by homologous recombination, resulted in remarkable improvements of activity, thermostability or enantioselectivity.

In this work, to improve enzymatic activity of *Bacillus pumilus* lipases, DNA shuffling was applied to two *B. pumilus* lipase genes from local isolates (L5 and L21). Using a high-throughput activity assay, a chimeric mutant (L3-3) was selected, carrying two crossover positions and three point mutations, with a specific activity 6.4 and 8.2 times higher than the parent enzymes. This mutant also is more tolerant to various detergents and organic solvents, and has a 9 times longer half-life at 50°C. Homology modeling of mutant L3-3, based on the highly homologous *B. subtilis* A, shows that the increased thermostability is likely due to structural rigidification and decreased surface hydrophobicity. Increased specific activity may result from the location of the mutations close to the active site.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının bu güne gelmesine en büyük katkıda bulunan

Prof. Dr. Füsün Gümüşel

Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever Öztürk

Merve Tuzlakoğlu Öztürk'e

Deneysel katkılarından dolayı

Lalehan Akbulut Salar

Alp Kibaroglu

Hüseyin Balcı'ya

Yapısal çalışmalardaki desteklerinden dolayı

Tjaard Pijning

Prof. Dr. Bauke Dijkstra'ya

Finansal ve malzeme desteklerinde bulunan

Prof. Dr. Tamer Yağcı

Doç. Dr. Ayhan Çelik

Dr. Yusuf Öztürk'e

Teşekkürlerimi sunarım.

En büyük destekçim, canım ANNEME şükranlarımı sunarım.

Bu tezi en değerli varlığım, BABAMA ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Lipolitik Enzimler	1
1.2. Lipazlar	2
1.2.1. Lipazların Üç Boyutlu Yapısı ve Katalitik Rezidüleri	4
1.2.2. Lipazların Salgılanması	6
1.2.3. Lipaz Kaynakları	7
1.3. <i>Bacillus</i> Soyu ve Biyoteknolojik Uygulamalar	8
1.4. Bakteriyel Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması	8
1.4.1. Aile I (Gerçek Lipazlar)	9
1.4.1.1. Pseudomonas Lipazları	9
1.4.1.2. Gram Pozitif Organizmalar Tarafından Üretilen Lipazlar	11
1.4.1.3. Diğer Lipazlar	12
1.5. Lipazların Uygulama Alanları	12
1.6. Lipazların Moleküler Uygulamaları	13
1.6.1. Rekombinant DNA Teknolojisi	13
1.6.2. Protein Mühendisliği	13
1.6.3. Proteinlerin Akılcı Tasarımı	14
1.6.4. Yönlendirilmiş Evrim	14
1.7. Rastgele Kütüphane Oluşturma Yöntemleri	15
1.7.1. Mutant Kütüphanelerin Taranması ve Geliştirilen Mutantların Seçilmesi	19
1.8. Protein Saflaştırma Çalışmaları	23

1.9.	Dizi Analizi Çalışmaları	24
1.10.	Modelleme Çalışmaları	25
1.11.	Tezin Amacı ve Bilime Katkısı	26
2.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
2.1.	Gereçler	28
2.1.1.	Kullanılan Sarf Malzemesi	28
2.1.2.	Kullanılan Cihazlar	31
2.2.	Yöntem	32
2.2.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Biyolojik Materyal	32
2.2.2.	Yerel <i>Bacillus</i> Soylarından Genomik DNA İzolasyonu	34
2.2.2.1.	Promega Wizard Genomik Dna İzolasyon Kiti Protokolü	35
2.2.3.	Seçilmiş <i>Bacillus</i> Soylarından Lipaz Genlerinin PCR ile Çoğaltılmasına Yönelik Çalışmalar	36
2.2.4.	Klonlanacak PCR Ürünlerinin Agaroza Jelden İzole Edilmesi	37
2.2.4.1.	“Promega Wizard SV Gel PCR Clean-Up And Gel Isolation Kit” Protokolü	38
2.2.5.	Çoğaltılan Lipaz Genlerinin Klonlanmasına Yönelik Çalışmalar	39
2.2.5.1.	TSS ile Transformasyon Yöntemi	40
2.2.5.2.	Klon Adaylarından STET Yöntemi ile Plazmit İzolasyon Çalışmaları	43
2.2.6.	Dizi Analizi Çalışmaları	44
2.2.7.	Ekspresyon Çalışması ile Klon Adaylarının Doğrulanması	47
2.2.8.	Lipaz Genlerinin pUC19 Vektörüne Alt Klonlanması ve Ekspresyon Çalışmaları	47
2.2.8.1.	pUC19 Vektörüne Yapılan Alt Klonlama Sonucunda Elde Edilen Klonlarda Ekspresyon Çalışması	49
2.2.9.	Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi	50
2.2.9.1.	Aktivite Testi	50
2.2.10.	Yönlendirilmiş Evrim Çalışmaları	53
2.2.10.1.	DNA Karıştırma Kütüphane Hazırlığı	53
2.2.10.2.	Plazmit İzolasyonu ve Plazmit Üzerinden Gen Çoğaltımı	54
2.2.10.3.	DNase I ile Kesim	55

2.2.10.4.	DNA Karıştırma I. PCR (Primersiz PCR)	56
2.2.10.5.	DNA Karıştırma II. PCR (Primerli PCR)	57
2.2.10.6.	RE ile Kesim ve Örneklerin “Clean-Up” Kitinden Geçirilmesi	58
2.2.10.7.	Klonlama Vektörünün Hazırlanması, Ligasyon ve Transformasyon	58
2.2.10.8.	Mutant Kütüphanelerin Taranması ve Enzim Ekspresyonu	59
2.2.10.9.	Dizi Analizi Çalışmalarıyla Varyant Dizilerinin Belirlenmesi	61
2.2.11.	Enzim Saflaştırma Çalışmaları	61
2.2.11.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	61
2.2.11.2.	Kromatografi Çalışmaları	62
2.2.11.3.	SDS-Poliakrilamit Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	62
2.2.11.4.	Bradford Testi ile Protein Miktarının Belirlenmesi	64
2.2.11.5.	Enzim Nitelendirme Çalışmaları	64
2.2.12.	<i>Bacillus</i> Lipazlarının Modelleme Çalışmaları	67
3.	BULGULAR	68
3.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Biyolojik Materyal	68
3.2.	Seçilmiş <i>Bacillus</i> Soylarında Lipaz Genlerinin PCR ile Çoğaltma Çalışmaları	68
3.3.	<i>Bacillus</i> sp. Soylarının Klonlama, Dizileme ve Ekspresyon Çalışmaları	72
3.4.	DNA Karıştırma ve Kütüphane Taranması	76
3.5.	Ebeveyn ve Mutant Lipazların Saflaştırma Çalışmaları	81
3.6.	Ebeveyn ve Mutant Lipazların Nitelendirilmesi	83
3.6.1.	Optimum Reaksiyon Sıcaklığı	83
3.6.2.	Optimal pH ve pH Kararlılığı	84
3.6.3.	Sıcaklık Kararlılığı	86
3.6.4.	Metal İyonlarının ve Çeşitli İnhibitörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	87
3.6.5.	Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	88
3.6.6.	Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	89
3.6.7.	Enzimlerin Substrat Özgüllüğünün Belirlenmesi	90
3.7.	Modelleme Çalışmalarından Elde Edilen Yapısal Bulgular	91

4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	97
	KAYNAKLAR	125
	ÖZGEÇMİŞ	139
	EK-1 Improved activity and thermostability of <i>Bacillus pumilus</i> lipase by directed evolution	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ala (A)	Alanin
α	Alfa
Asp (D)	Aspartik Asit
β	Beta
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
γ	Gamma
μ g	Mikrogram
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
APS	Amonyum Persülfat
ATP	Adenozin Trifosfat
BaCl ₂	Baryum Klorür
bç	Baz Çifti
BSA	Sığır Serum Albumin
CoCl ₂	Kobalt Klorür
CuCl ₂	Bakır Klorür
dk	Dakika
DNA	Deksiribonükleik Asit
ddNTP	Dideoksiribonükleotit Trifosfat
dNTP	Deoksiribonükleotit Trifosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTCS	Dye Terminator Cycle Sequencing
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EtOH	Etanol
FeCl ₂	Demir II Klorür
FeCl ₃	Demir III Klorür
FeSO ₄	Demir Sülfat
g	Gram
Gly (G)	Glisin
GC	Gaz Kromatografi
Glu (E)	Glutamik Asit

HCl	Hidroklorik Asit
His (H)	Histidin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IPTG	İzopropil Thio-B-D-Galaktozid
(k)b	(Kilo) Baz
(k)Da	(Kilo) Dalton
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
LiCl ₂	Lityum Klorür
M	Molar
Met (M)	Metiyonin
Mg ⁺²	Magnezyum İyonu
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mg	Miligram
ml	Mililitre
Mn ⁺²	Mangan İyonu
MnCl ₂	Mangan Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaAc	Sodyum Asetat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NH ₄ Ac	Amonyum Asetat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
NiCl ₂	Nikel Klorür
°C	Derece Santigrat
OD	Optik Yoğunluk
ORF	Açık Okuma Çerçevesi (open reading frame)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG8000	Polietilen Glikol 8000
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florid

pmol	Pikomol
rDNA	Ribozomal DNA
rpm	Dakika Başına Rotasyon
Ser (S)	Serin
SDS	Sodyumdodesilsülfat
sn	Saniye
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
U	Ünite
UV	Ultraviyole
V	Volt
V	Valin
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-İndolyl-B-D Galactopyranoside
ZnCl ₂	Çinko Klorür
ZnSO ₄	Çinko Sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1.1.	<i>B. subtilis</i> lipazı yapısal gösterimi	5
1.2.	α/β hidrolaz katlanması	5
3.1.	21F-22R primerlerinin kullanıldığı PCR'lar sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel profili	70
3.2.	L8, L10, L14, L15, L16, L21 soylarından, 20F-22R ve 20F-23R primer çiftleriyle elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel profili	72
3.3.	<i>Bacillus subtilis</i> (LipA)'nın, iki <i>Bacillus pumilus</i> ebeveyn (L5, L21) ve L3-3 mutanıt ile ESPript kullanılarak yapılmış dizi "alignmenti"	76
3.4.	<i>Bacillus pumilus</i> L5 ve L21 klonlarının <70 bç fragmanlarından 648 bç'lik genin yeniden eldesi	77
3.5.	Mutant kütüphane tarama basamakları	79
3.6.	<i>Bacillus pumilus</i> ebeveynleri ve L3-3 mutanıt dizilerinin şematik gösterimi	80
3.7.	<i>B. pumilus</i> ebeveyn ve mutant lipazlarının kısmi saflaştırma sonrası SDS-PAGE profili	83
3.8.	Ebeveyn ve mutant lipazlarının farklı sıcaklıklardaki, pH 8.0 değerinde ölçülen kalan aktivite değerleri	84
3.9.	pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi	85
3.10.	pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkisi	85
3.11.	Ebeveyn ve mutant lipazlarının farklı sıcaklıklarda 30 dakika ön inkübasyon sonrası, ölçülen kalan aktivite değerleri	86
3.12.	Farklı metal ve tuz, EDTA ve PMSF varlığında elde edilen kalan aktivite değerleri	88
3.13.	Çeşitli deterjanlar varlığında, ebeveyn ve mutant lipazlarından elde edilen kalan aktivite değerleri	89
3.14.	Çeşitli organik çözücüler varlığında, ebeveyn ve mutant lipazlarından elde edilen kalan aktivite değerleri	90
3.15.	Ebeveyn ve mutant enzimlerin farklı zincir uzunluğundaki pNP	91

	yağ açıl esterlerine karşı substrat özgüllüğü	
3.16.	<i>B. pumilus</i> L3-3 mutant enziminin Phyre ile oluşturulan üç boyutlu modeli	92
3.17.	L3-3 mutant modelin stereo figürleri	94
3.18.	L3-3 mutant modelin stereo figürleri	96
4.1.	α/β hidrolaz katlanmasının şematik gösterimi	100
4.2.	<i>B. subtilis</i> Lip A ve <i>B. pumilus</i> L3-3 mutant arasında farklılık gösteren rezidülerin konumları	119
4.3.	<i>B. pumilus</i> L3-3 mutant enziminin pNP-oktanoat substratı ile bağlanmış modelinin stereo figürü	121

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
1.1. Lipolitik enzim aileleri	10
2.1. Lipaz üreticisi yerel soyların izole edildikleri kaynak yeri ve özellikleri	33
2.2. <i>Bacillus</i> yerel izolatlarının klasik ve moleküler tiplendirme yöntemleri sonucunda belirlenen tür adları	34
2.3. Lipaz genlerinin çoğaltıldığı PCR'larda kullanılan primerler	36
2.4. Lipaz genlerinin çoğaltıldığı PCR'ların koşulları	37
2.5. Lipaz genlerinin çoğaltılması için kullanılan PCR programları	37
2.6. Lipaz genlerinin klonlama amacıyla üretildiği optimize edilmiş PCR koşulları	39
2.7. Dizi analizi için PCR koşulları	46
2.8. Alt klonlama çalışmalarında kullanılan RE kesim protokolü	48
2.9. Plazmit DNA üzerinden gen çoğaltım koşulları	54
2.10. DNA karıştırma I. PCR koşulları	57
2.11. DNA karıştırma II. PCR koşulları	57
2.12. SDS-PAGE jel içeriği	63
3.1. Yerel <i>Bacillus</i> soylarından lipaz genlerinin çoğaltılması için kullanılan primer çiftleri ve elde edilen PCR ürün boyları	69
3.2. L5, L21 ve mutant L3-3 lipazlarının saflaştırma tablosu	81
3.3. Saflaştırılan L5, L21 ve L3-3 mutantı lipaz enzimlerinin spesifik aktivite değerleri	82
3.4. Saflaştırılan L5, L21 ve L3-3 lipaz enzimlerinin yarılanma ömrü değerleri	87

1. GİRİŞ

Enzimler tüm canlı hücrelerde reaksiyonları yöneten, organizmaların yaşamasını ve çoğalmasını sağlayan katalizörlerdir. Genel olarak oda sıcaklığı, sulu ortam, atmosferik basınç ve nötral pH gibi ılımlı koşullar altında çalışırlar. Sahip oldukları özelliklere bağlı olarak enzimler hücrelerdeki özgül biyokimyasal reaksiyonlardaki görevlerinin yanı sıra kimyasal katalistler olarak da görev alırlar. Enzimler; gıda, deterjan, ecza, tekstil, kağıt, deri ve kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Çeşitli endüstriyel uygulamalarda giderek daha büyük önem kazanan enzimler ticari olarak üretilmektedir. Endüstriyel enzim pazarında en önemli yeri, proteaz, lipaz, amilaz ve esteraz gibi çeşitli hidrolitik enzimler tutmaktadır. Kimyasal proseslere göreceli olarak, enzim kullanılan süreçlere olan ilginin artmasının nedenleri arasında, enzimatik reaksiyonların yüksek özgülüğü ve kullanılan ılımlı reaksiyon koşulları sayılabilir. Enzimlerin etkili katalitik özellikleri, birçok endüstriyel ürün ve prosesler için büyük önem taşımaktadır. Uygun biyokatalizörlerin geliştirilip izole edilmesi ve reaksiyon koşullarının verimli uygulamalar için optimize edilmesi oldukça zor basamaklardır. Son zamanlarda yönlendirilmiş evrim yaklaşımı kararlılık, bölge seçiciliği ve özellikle enantiyo seçicilik gibi farklı enzim özelliklerinin optimizasyonunda ve enzim üretiminin etkinleştirilmesinde yaygın şekilde kullanılmaya başlanmış olup, laboratuvar koşullarındaki evrim yöntemleri ile doğal evrimin taklit edilmesi ve farklı uyum mekanizmalarının belirlenmesi temelinde çalışır (Houde ve ark., 2003; Jaeger ve ark., 2002; Kaur ve Sharma, 2006; Kirk ve ark., 2002; Pandey ve ark., 1999; Sharma ve ark., 2001).

1.1. Lipolitik Enzimler

Lipolitik enzimler hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bakteriler, kısa zincirli karboksilik asitlerin ($C \leq 12$) ester bağlarının hidrolizini katalizleyen karboksiptidazlar [EC 3.1.1.1] ve suda çözünmeyen uzun zincirli ($C \geq 12$) açıl-gliseridlere karşı maksimum aktivite sergileyen lipazlar [EC 3.1.1.3] gibi enzimleri üretebilmektedirler. Lipolitik enzimlerin üçüncü grubunu ise polar fosfolipidlere etkiyen fosfolipazlar [EC 3.1.4.3] oluşturmaktadır. Günümüzde

lipolitik enzimler ve özellikle lipazlar, yüksek regio ve enantiyo seçicilikte hidroliz ve sentez reaksiyonları katalizleyebilmeleri gibi biyoteknolojik potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi çekmektedirler ve bu özelliklerinden dolayı lipolitik enzimler, sentetik organik kimyada en geniş çapta kullanılan enzim sınıfını teşkil ederler. Söz konusu enzimlere olan ilginin bir getirisi olarak, lipolitik enzimleri kodlayan genler belirlenmiş, klonlama ve ekspresyon çalışmaları ile bu enzimlerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve elliden fazla bakteriyel esteraz ve lipaz, sekiz aile içerisinde sınıflandırılabilmiştir. Bu enzimlerden bazılarının kristallografik yöntemler ile üç-boyutlu yapıları aydınlatılmış ve α/β hidrolaz katlanması adı verilen korunmuş katlanma motifleri içerdikleri ortaya çıkarılmıştır. Enzimlerin aktif bölgelerini, nükleofilik serin rezidüsü, bir histidin ve bir asidik rezidüden (aspartat veya glutamat) oluşan bir katalitik üçlünün oluşturduğu, katalitik serin rezidüsünün, nükleofilik dönüş olarak tanımlanan ve bir α -sarmal ve bir β -iplik arasında bulunan keskin dönüş üzerinde yerleşik olduğu bilinmektedir. Pek çok lipazda bulunan bir diğer özgün yapısal birim ise kapak adı verilen ve bir α -sarmaldan oluşan yapıdır; bu yapı substrat yokluğunda aktif bölgeyi örtmektedir. Bu kapak bir lipit-su arayüzeyi ile temas halinde açılarak, enzimin açık konformasyona geçmesini sağlamaktadır. Bu bulgular ışığında, substrat moleküllerinin agregat oluşturmaya başlaması ile enzim aktivitesinde görülen belirgin artış “yüzeylerarası aktivasyon” ile açıklanabilmiştir (Sharma ve ark., 2001; Jaeger ve Eggert, 2002; Houde ve ark., 2003; Eggert ve ark., 2002).

1.2. Lipazlar

Günümüzde enzimlerin kullanıldığı pek çok alanda lipazların önemi giderek artmaktadır. Lipazların sahip olduğu enantiyo seçicilik, bölge seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikler, bu enzimlerin pazardaki payının büyümesinde etkili olmaktadır. Lipazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmekle birlikte, endüstriyel anlamda en yaygın kullanım mikrobiyal kökenli lipazlara aittir. Lipazların üç boyutlu yapılarının belirlenmesine yönelik çalışmalar, yapı-işlev ilişkilerinin irdelendiği araştırmalarda oldukça yararlı olmaktadır (Saxena ve ark., 1999; Jaeger ve Eggert, 2002; Houde ve ark., 2003).

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar E.C.3.1.1.3) fizyolojik öneme ve endüstriyel potansiyele sahip enzimler olup, gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden şekillenen esterlerin, sentez ve hidrolizini kataliz ederler. Esterazların tersine, yalnızca yağ-su ara yüzeylerine adsorbe oldukları zaman aktive olurlar ve çözünmüş substratlar üzerinde etkin değildirler. Lipazlar serin hidrolazlardır ve trigliseritler üzerindeki hidrolitik aktivitelerinin yanı sıra, esterifikasyon, interesterifikasyon, açidolizis, alkolizis ve aminolizis gibi reaksiyonları da kataliz etme yeteneğine sahiptirler (Sharma ve ark., 2001; Jaeger ve Eggert, 2002; Houde ve ark., 2003).

Lipolitik reaksiyonlar, genellikle substratların; monomer, misel ve emülsiyon halinde dengede olduğu yağ-su ara yüzeylerinde gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmalara göre son dönemlerde lipolitik enzimleri “gerçek lipaz” (EC 3.1.1.3) olarak sınıflandırabilmek üzere iki ölçüt tanımlanmıştır.

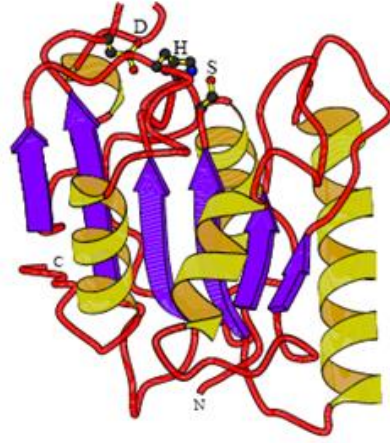
1. Enzimlerin ara yüzeyde aktive olmaları ve emülsifiye haldeki trigliserit substratların varlığında, aktivitelerinin büyük ölçüde artması. Bu olgu yüzeylerarası aktivasyon “interfacial activation” olarak isimlendirilir.
2. Yüzey lupunda yer alan, enzimin aktif bölgesini saran ve ara yüzeyle temas ettiğinde açılabilen bir kapağa sahip olmaları.

Ancak birkaç istisnai durum dışında enzimlerin genelde kapak yapısına sahip olmalarına rağmen, yüzeylerarası aktivasyon göstermemeleri, öne sürülen bu ölçütlerin sınıflandırma için uygun olmayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle lipazlar, uzun zincirli açilgliserollerin hidroliz ve sentezini katalize eden karboksilesterazlar olarak tanımlanmaktadır. “Uzun zincir” terimi için katı bir tanımlama yapılmamakla birlikte, açil zincir uzunluğu on karbon atomundan uzun olan gliserolesterler, lipaz substratları olarak kabul edilmektedir. Açil zincir uzunluğu on karbon atomundan daha kısa olan gliserolesterlerin hidrolizi, esteraz aktivitesini düşündürmektedir. Ancak birçok lipazın, esteraz substratlarını hidroliz etme yeteneğine sahip olduğu da ayrıca vurgulanmalıdır (Jaeger ve ark., 1999).

Öte yandan yüzeylerarası aktivasyon ve kapak yapısı lipazları esterazlardan ayıran en belirgin özelliklerdir. Lipazların büyük bir çoğunluğu aktif bölgelerini örten bir helikal segmente (kapak) sahiptir. Lipit kümelerinin varlığında bu kapak açılır ve yüzeylerarası aktivasyon gerçekleşir. Yüzeylerarası aktivasyon göstermeyen lipazlarda, kapağın olmadığı ya da kapak “domain”inde delesyon bulunduğu gözlemlenmiştir. Ancak *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* B ve *Burkholderia glumae* lipazları kapak yapısına sahip olmalarına rağmen, yüzeylerarası aktivasyon göstermezler. Lipazlar için sulu ortamdaki baskın konformasyon kapalı formdur. Aktif bölge, kapak yapısını oluşturan bir ya da daha fazla lup tarafından çözücüden korunmuştur. Kapağın dış parçası hidrofiliktir. Bu konformasyon elektrostatik etkileşimler aracılığıyla kararlı kılınmıştır. Bir su-yağ emülsiyonunda kapağın açılması, substratların aktif bölgeye girişine izin verir (açık konformasyon). Kapağın açılmasıyla, nükleofilik serin rezidüsü büyük hidrofobik yüzeyler ile etkileşir ve lipaz enziminin aktif forma geçmesi sağlanır (Verger, 1997; Schmid ve Verger, 1998; Jaeger ve Reetz, 1998; Pouderoyen ve ark., 2001; Houde ve ark., 2003).

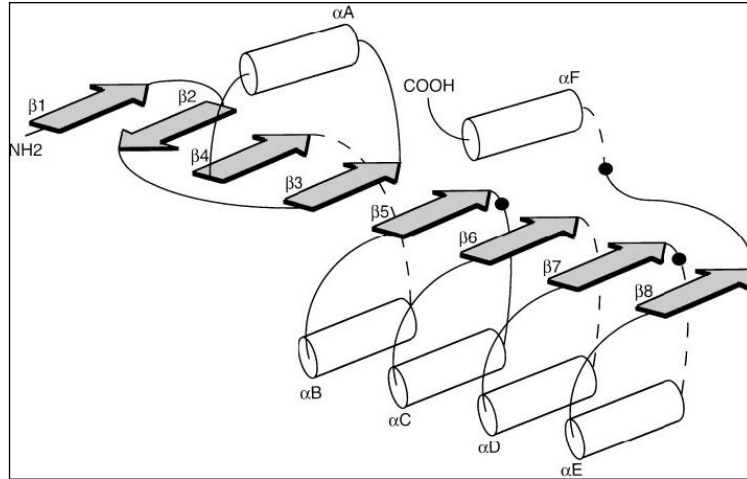
1.2.1. Lipazların Üç Boyutlu Yapısı ve Katalitik Rezidüleri

Lipazlar, α/β hidrolaz katlanması gösterirler. α/β hidrolaz katlanması gösteren enzimlerin aktif bölgelerinde nükleofilik bir rezidünün (serin, sistein, ya da aspartat) yanı sıra bir asidik rezidü (aspartat ya da glutamat) ve bir histidin rezidüsü yer almaktadır (Jaeger ve ark., 1999). Literatürde üç boyutlu yapısı aydınlatılmış birçok lipaz yer alırken, *B. subtilis* LipA özellikle sahip olduğu moleküler kütlenin (19.348 Da, 181 amino asit) diğer lipazlardan daha küçük olması nedeniyle ilgi görmektedir. Pouderoyen ve arkadaşları tarafından 2001 yılında 3D yapısı çözülen *Bacillus subtilis* LipA lipazının yapısı Şekil 1.1’de gösterilmektedir (Pouderoyen ve ark., 2001).



Şekil 1.1. *B. subtilis* lipazı yapısal gösterimi. Ser77, His156 ve Asp133 rezidülerinden oluşan aktif bölge sırasıyla S, H, ve D ile gösterilmiştir. N ve C harfleri ise, N ve C terminallerini işaret etmektedir (Pouderoyen ve ark., 2001).

Lipazlar aktif bölgelerinde Ser, Asp/Glu ve His rezidüleri taşırlar. Katalitik serin rezidüsü iyi korunmuş Gly-X-Ser-X-Gly motifindedir. Burada X'ler histidin ya da tirozin olabilir. Korunmuş motif bir β -iplik ile bir α -sarmal arasında konumlanmıştır ve γ şeklinde keskin bir dönüş oluşturur (Jaeger ve ark., 1999) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. α/β hidrolaz katlanması. α sarmallar silindir, β iplikler gölgeli oklarla işaret edilmiştir. Aktif-bölge rezidüleri (Serin-Asp/Glu-His) içi dolu dairelerle gösterilmiştir. Serin rezidüsü $\beta 5$ 'den, Asp/Glu $\beta 7$ 'den sonra gelmektedir. Histidin rezidüsü ise $\beta 8$ ile αF arasında yerleşmiştir (Jaeger ve ark., 1999).

B5, γ -dönüşü ve onu takip eden α -sarmal, α/β hidrolaz katlanmasının en çok korunmuş yapısal özelliğidir. Rezidüler arasında yakın etkileşimler olduğu için nükleofilden iki rezidü önceki ve iki sonraki konumlarda Gly yer alır. Glisinler bazen alanin, valin, serin ya da treonin gibi diğer küçük rezidülerle yer değiştirebilirler. Bu “iplik-nükleofil-sarmal” düzenlenmesi “nükleofil dirsek” olarak isimlendirilir. Bu pozisyon nükleofilik rezidüyü, aktif bölge yüzeyinin dışında serbest tutarak, aktif bölge histidin rezidüsüne ve substrata kolayca ulaşmasına olanak sağlar. Ayrıca bu keskin dönüş, nükleofilin kendisini takip eden sarmalın N-terminal ucuna yerleşmesine ve böylece nükleofilin iyonize formunun kararlı kılınmasına yardımcı olur (Jaeger ve ark., 1999).

Prototipik katlanmada Aspartik asit veya Glutamik asit olan katalitik asit rezidü, merkezi β tabakalarının 7. sinden sonraki ters dönüşte bulunur. Bu rezidü, aktif bölgedeki histidin’e hidrojen bağı ile bağlıdır. Ancak, katalitik asidin topolojik konumunun değişken olduğu ve pankreatik lipazda 6. β tabakasından sonra konumlandığı saptanmıştır. Lipazların üçüncü katalitik rezidüsü katalitik histidindir. Bu rezidü α/β hidrolaz katlanmasının 8. β ipliğinden sonraki lup içinde konumlanmıştır. Bu kıvrımın uzunluğu ve konformasyonu değişkendir (Jaeger ve ark., 1999).

1.2.2. Lipazların Salgılanması

Lipazlar hücre dışına salgılanan enzimler olup, hedeflenen yerlere ulaşmak üzere bakteriyel membranlara taşınırlar. Lipazların salgılanmasında üç temel yol tanımlanmıştır. Enzimlerin bu 3 temel kısa yolun en az iki tanesini kullandıkları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarla, lipazların salgılanabilmeleri için doğru şekilde katlanmalarının gerekliliği kanıtlanmıştır. Periplazmik katlanmada molekül-içi “Lif” şaperonları görev almaktadır. Lif “Lipaza özgün foldaz” enzimatik olarak aktif lipazın elde edilmesi için gereklidir. Amino asit homolojisine dayalı ayrıntılı analizlerle, Lif proteinleri dört farklı ailede sınıflandırılmıştır (Jaeger ve ark., 1999; Rosenau ve ark., 2004).

Pseudomonas fluorescens ve *Serratia marcescens* lipazları N-terminal sinyal peptidine sahip değildir. Bu nedenle salgılanmaları; üç farklı proteinin işlevsel olduğu “ABC taşıyıcı” olarak da isimlendirilen, tip 1 salgılama kısa yolu ile gerçekleşmektedir. *S. marcescens* lipazında, ATP-bağlanma kaseti (ABC protein) içeren ve bir iç membran proteini olan LipB, sisteme bir substrat özgülüğü kazandırmaktadır. Membran füzyon proteini (MFP) olan ve ek bileşikler içeren LipC, iç ve dış membran arasında ilişki kurmaktadır. LipD ise dış membran proteini (OMP) olarak anılmaktadır. Lipazlar ve metalloproteazlar bu ABC taşıyıcı sistemi yardımıyla salgılanmaktadırlar (Jaeger ve ark., 1999).

Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde ise enzimlerin sitoplazmik zardan salgılanmasına aracılık eden ve “Sec translokaz” olarak isimlendirilen bir sistem bulunmaktadır. Bu sistem ile taşınan lipazlar bir N-terminal sinyal dizisine sahiptirler. Çok alt birimli bir protein kompleksi olan Sec translokaz *E.coli*’de, çözünebilir dimerik Sec A ve SecY ile E, D, G alt birimlerinden oluşur ve membran içine yerleşmiştir. Benzer bir Sec-translokaz sistemi *Bacillus* türlerinde de görülmektedir (Jaeger ve ark., 1999).

Gram-negatif bakterilerde sitoplazmik zardan salgılanan lipazlar periplazmada enzimatik olarak aktif konformasyonlarına katlanırlar. Daha sonra tip 2 ya da genel salgılama kısa yollarından şekillenen on dört kadar farklı proteinden meydana gelen karmaşık bir sistem aracılığı ile dış zara taşınırlar (Jaeger ve ark., 1999).

1.2.3. Lipaz Kaynakları

Lipazlar, yeryüzü flora ve faunasında geniş bir yere sahip olmakla birlikte, daha çok bakteri, mantar ve mayadan oluşan mikrobiyal florada yer almaktadırlar. Ayrıca memeliler ve yüksek bitkilerde de bulunurlar. Mikrobiyal lipazlar biyoteknolojik olarak daha ilgi çekicidir. Enzim üretiminde birçok mikrobiyal soy kullanılmaktadır. Gram-negatif organizmaların bu anlamda en çok ilgi çeken üyesi *Pseudomonas* cinsidir. Lipaz üreticisi *Pseudomonas* cinsinin en önemli türleri

arasında *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. cepacia* ve *P. glumae* yer alır. Gram-pozitif mikroorganizmalar arasında en büyük ilginin odaklandığı cins *Bacillus* olup, biyoteknolojide en çok kullanılan ve lipaz üreten *Bacillus* türleri arasında; *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus* ve *B. licheniformis* sayılabilir. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri lipazları, saflaştırılarak nitelendirilmekte, ayrıca gen klonlama ve dizileme çalışmaları yapılmaktadır (Pandey ve ark., 1999; Jaeger ve ark., 1994; Sharma ve ark., 2001).

1.3. *Bacillus* Soyu ve Biyoteknolojik Uygulamalar

Bacillus cinsi bakteriler; Gram-pozitif, ancak yaşlı kültürlerde Gram-negatif de gözlenebilen, aerobik ve çubuk şeklinde bakterilerdir. *Bacillus* cinsinin en önemli özelliği endospor oluşturmalarıdır. Endosporların elverişsiz koşullara dayanıklı olmaları ve uzun süre hayatta kalabilme yeteneklerinden dolayı, spor oluşturan *Bacillus* soyları çok farklı habitatlarda bulunabilirler. *Bacillus* cinsinin sahip olduğu metabolik çeşitlilik bu organizmaları enzim, antibiyotik, çeşitli biyokimyasal maddeler ve insektisitlerin üretiminde tercihli kılmaktadır. Endüstriyel enzim üretiminde önemli biyolojik kaynakları oluştururlar. *Bacillus* soyu, kolay ve hızlı üreme, farklı karbon, nitrojen kaynaklarını ve çok çeşitli substratları kullanabilme, yüksek verimde ürün oluşturma ve ekonomik üretim kapasitesine sahip olma gibi yetenekleri sayesinde birçok alanda tercih edilmektedir (Sneath, 1986; Harwood, 1992).

1.4. Bakteriyel Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması

Bakteriler farklı sınıflarda yer alan karboksilesterazlar, gerçek lipazlar ve fosfolipazlar gibi birçok lipolitik enzimi üretirler. Lipolitik enzimler sahip oldukları biyoteknolojik potansiyelden ötürü oldukça dikkat çekici enzimlerdir. Endüstride kullanılan lipazların birçoğu genellikle fungal ve bakteriyel kökenli mikrobiyal enzimlerdir. Lipolitik enzimler Aile I (Gerçek Lipazlar), Aile II (GDSL), Aile III, Aile IV (HSL), Aile V, Aile VI, Aile VII ve Aile VIII olmak üzere sekiz aileye ayrılmıştır. Gerçek lipazlar olarak tanımlanan Aile I ayrıca altı alt aileye ayrılır.

Biyoteknolojik yönden büyük öneme sahip olan, *Pseudomonas* ve *Bacillus* lipazları, Aile I altında yer almaktadır (Arpigny ve Jaeger, 1999).

1.4.1. Aile I (Gerçek Lipazlar)

1.4.1.1 *Pseudomonas* Lipazları

Gerçek lipazların en önemli grubu olan *Pseudomonas* lipazları, çalışılan ilk lipazlar olup, endüstride en çok tercih edilenlerdir. Lipazlar gruplandırılırken I. aile içindeki altı alt aileye bağlı olanlar, gerçek lipazlar olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 1.1).

Burkholderia glumae lipazı uzun bir süre bu gruptaki üç boyutlu yapısı bilinen tek enzim özelliğini taşımıştır, daha sonra yapılan çalışmalarla *Chromobacterium viscosum* ve *Burkholderia cepacia* lipazlarının kristal yapıları da aydınlatılmıştır (Arpigny ve Jaeger, 1999). Bu enzimler I.2 alt ailesine ait gerçek lipazlardır. Lipaz I.1 alt ailesi içinde yer alan *Pseudomonas aeruginosa* lipazının kristal yapısı da yakın geçmişte açıklanmıştır (Nardini ve ark., 2000).

Pseudomonas lipazları üzerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalara paralel olarak farklı bakteri cinslerinden çeşitli lipaz dizilimleri de belirlenmiş ve bu enzimler amino asit dizilimleri temelinde I.1 ve I.2 alt aileleri ile ilişkilendirilmiştir. *Vibrio cholerae*, *Acinobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas wisconsinensis* ve *Proteus vulgaris* gibi lipazların moleküler ağırlıkları 30-32 kDa olarak tayin edilmiş ve *Pseudomonas aeruginosa* lipazı ile yüksek oranda dizi benzerliği taşıdıkları belirlenmiştir. Alt aile I.2'de yer alan lipazların molekül yüzeyinde taşıdıkları ve paralel olmayan bir çift β -ipliğinden oluşan yapı (insersiyon) nedeniyle bu enzimler, orta büyüklükte molekül ağırlığına sahip lipazlar olarak tanımlanmıştır (Arpigny ve Jaeger, 1999).

Pseudomonas fluorescens ve *Serratia marcescens* lipazları I.3 alt ailesi altında gruplanır. Bu lipazların moleküler ağırlığı, I.1 ve I.2 alt ailelerindeki

lipazlarınkine görece daha büyüktür (*Pseudomonas fluorescens* lipazı 50 kDa ve *Serratia marcescens* lipazı 65 kDa), ancak N-terminal sinyal peptidi ve sistein rezidüsü içermezler. Bu enzimlerin salgılanması, üç parçalı ABC (ATP-binding-casette) taşıyıcı sistemi üzerinden tek basamakta gerçekleşir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

Tablo 1.1. Lipolitik enzim aileleri (Arpigny ve Jaeger, 1999).

Family	Subfamily	Enzyme-producing strain	Accession no.	Similarity (%)		Properties
				Family	Subfamily	
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	D50587	100		True lipases
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95		
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39		
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
		<i>Burkholderia glumae</i> *	X70354	35	100	
		<i>Chromobacterium viscosum</i> *	Q05489	35	100	
		<i>Burkholderia cepacia</i> *	M58494	33	78	
	2	<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	D11455	14	100	
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51	
	3	<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16	100	Phospholipase
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80	
	4	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	100	
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94	
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	29	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	28	
	5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	26	
		<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100	
		<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	U80063	14	50	
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100		Secreted acyltransferase
	6	<i>Streptomyces scabies</i> *	M57297	36		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35		
		<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28		
		<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379	28		
II (GDSL)		<i>Streptomyces exfoliatus</i> *	M86351	100		Secreted esterase
		<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82		
		<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33		
III		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100		Extracellular lipase
		<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	54		
		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48		
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40		
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36		
		<i>Moraxella</i> sp.	X53868	25		
		<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100		
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		
		<i>Moraxella</i> sp.	X53869	34		
IV (HSL)		<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32		Extracellular esterase 1
		<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	20		
		<i>Synechocystis</i> sp.	D90904	100		
		<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50		
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> *	S79600	24		
		<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20		
		<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16		
		<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100		
		<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48		
		<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45		
V		<i>Arthrobacter globiformis</i>	AA899492	100		Extracellular esterase 2
		<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43		
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	AA60471	40		
VI						Extracellular esterase 3
VII						Esterase
VIII						Esterase III

* Lipolytic enzyme with known 3D structure.

1.4.1.2. Gram Pozitif Organizmalar Tarafından Üretilen Lipazlar

Bacillus türüne ait altı hücre dışı lipaz ve iki esteraz tanımlanmıştır. *Bacillus cinsi* üyelerinin ürettiği bazı lipazlarda, Gly – X – Ser – X – Gly geleneksel lipaz motifinde bulunmakta olan glisin rezidüsünün yerini bir alanin rezidüsü almıştır. Alt aile IV, ortalama % 75 oranında benzerlik gösteren *B. subtilis*, *B. pumilus* ve *B. licheniformis* kökenli dört yakın akraba lipolitik enzimden oluşmaktadır ve bu enzimlerin Ser, His ve Asp aktif bölge rezidüleri korunmuş pozisyonlarda bulunmaktadır. Bu proteinler 19 kDa moleküler ağırlığa sahip olmaları nedeniyle bilinen en küçük lipazlar olarak anılmakta ve minimal α/β hidrolaz katlanmalı enzimler grubunu meydana getirmektedirler. Bununla beraber, alkali pH koşullarında sergiledikleri maksimum aktivite ve kararlılık gibi biyokimyasal özellikleri de benzerlik göstermektedir. Mezofilik *Bacillus subtilis* ve *Bacillus pumilus* lipazları gerçek lipazların bilinen en küçük örnekleridir, bu nedenle ayrı bir grup halinde sınıflandırılmıştır. Bu grup içinde yer alan lipazlar diğer *Bacillus* ve *Staphylococcus* lipazlarıyla % 15 gibi düşük bir oranda dizi benzerliği taşımaktadırlar (Pouderoyen ve ark., 2001; Arpigny ve Jaeger, 1999).

Bacillus thermocatenulatus ve *Bacillus stearothermophilus* soyları benzer özellikleri olan lipazları üretirler. Bu lipazlar yaklaşık 45 kDa moleküler ağırlığa sahiptirler ve optimal aktivitelerini 65 °C'ta, pH 9.0'da gösterirler (Arpigny ve Jaeger, 1999).

Staphylococcus lipazları ise daha büyük (~ 75 kDa) moleküler ağırlığa sahip enzimlerdir. Bu lipazlar, öncül moleküller halinde salgılanırlar ve hücre dışında özel bir proteaz tarafından kesilirler. Öncül peptitteki 207-267 konumundaki rezidülerin moleküller arası şaperon gibi davrandığı ve molekülün hücre zarının bir tarafından öbür tarafına geçişini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Gerçek lipazlar içinde yer alan *Staphylococcus hyicus* lipazı, eşsiz bir fosfolipaz aktivitesine sahiptir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

1.4.1.3. Diğer Lipazlar

339 amino asitten oluşan *Propionibacterium acnes* ve 275 amino asitten oluşan *Streptomyces cinnamoneus* lipazları birbirleriyle % 39 oranında özdeşlik, % 50 oranında benzerlik göstermektedirler. Bu proteinlerin 50-150. rezidülerini içeren merkez bölgesi I.2 alt ailesi ile ve *Bacillus subtilis* 'ten elde edilen lipazlarla yaklaşık % 50 oranında benzerlik göstermektedir. *Streptococcus cinnamoneus* lipazı ile şu ana kadar bilinen diğer *Streptomyces* lipazları arasında herhangi bir benzerlik bulunamamıştır (Arpigny ve Jaeger, 1999).

1.5. Lipazların Uygulama Alanları

Lipazlar; deterjan, gıda, kağıt, deri, kozmetik ve parfüm endüstrisi, sabun üretimi, organik madde sentezi, sulu ortamda oluşan biyolojik dönüşümler, biyomedikal uygulamalar, biyosensör, rasemik asit ve alkol çözeltileri, bölge seçici açılasyon, pestisit üretimi, ester sentezi ve çevre yönetimi gibi birçok alanda kullanılan enzimlerdir. Lipazlar ayrıca yağlı atıkların ve poliüretanın parçalanmasını hızlandırmak için de kullanılırlar (Sharma ve ark., 2001; Pandey ve ark., 1999; Jaeger ve Reetz, 1998).

Lipazlar son yıllarda moleküler uygulamalarda sıkça kullanılan enzimler arasında yer almaktadır. Rekombinant DNA teknolojileri, lipazları endüstriyel uygulamalar için daha elverişli kılmak üzere kullanılmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda biyokatalizörlerin, kendi fizyolojik niteliklerinden daha farklı özellikler (organik çözücülerde kararlılık, sıcaklık kararlılığı ve enantiyo seçicilik gibi) göstermeleri beklenmektedir. Bu yaklaşımlar sonucu çeşitli uygulamalar için uygun biyokatalizörlerin geliştirilmesi mümkün olmakta, ilgili enzimler izole edilerek etkili uygulamalar için en iyi reaksiyon koşulları belirlenmektedir. Yabancı tip enzimlerden farklı özellikler taşıyan enzimlerin geliştirilmesi için akılcı protein tasarımı ve yönlendirilmiş evrim sıklıkla kullanılan yaklaşımlardır (Houde ve ark., 2003).

1.6. Lipazların Moleküler Uygulamaları

1.6.1. Rekombinant DNA Teknolojisi

Lipazların endüstriyel uygulamalarının daha verimli hale getirilmesi için rekombinant DNA teknolojileri son zamanlarda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özgün uygulamalar için uygun lipaz seçilerek, ilgili gen bir ekspresyon sistemine klonlanır ve enzim yüksek miktarda üretilerek saflaştırılır. Çoğunlukla mikrobiyal kaynaklı olan, klonlama ve dizileme çalışmaları yapılan birçok lipaz genine veritabanlarından ulaşılabilir. 1988 yılında Novozymes tarafından piyasaya tanıtılan Lipolaz, rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen ilk lipazdır. *Aspergillus oryzae*'de eksprese edilen bu lipaz, *Thermomyces lanuginosus*'tan elde edilmiştir (Houde ve ark., 2003; Schmidt-Dannert, 2001).

1.6.2. Protein Mühendisliği

Endüstriyel uygulamalarda kullanılan biyokatalizörlerin, enantiyo seçicilik, kararlılık ve sıcaklık kararlılığı gibi kendi fizyolojik niteliklerinden daha farklı özellikler göstermeleri beklenmektedir. Uygun biyokatalizörlerin geliştirilmesi ve etkili uygulamalar için en iyi reaksiyon koşullarının belirlenmesi oldukça zor bir işlemdir (Bornscheuer ve ark., 2002; Houde ve ark., 2003).

Biyoteknolojide kullanılan bazı yöntemlerin etkinliği, immobilizasyon, mikro- kapsülleme ya da amino asit rezidülerinin modifikasyonu gibi fizikokimyasal tekniklerin kullanılması ve reaksiyon ortamının geliştirilmesiyle artırılabilir. Ancak optimizasyon çalışmaları, enzimatik proseslerin endüstriyel olarak yönetilmesi açısından bazen yetersiz kalmaktadır. Böyle durumlarda enzimin katalitik özelliklerinin geliştirilmesi yoluyla bu durumun üstesinden gelinebilmekte, soy koleksiyonlarının ve toprak örneklerinin bu amaçla taranması sonucunda yeni biyokatalizörler belirlenebilmektedir. Protein mühendisliği tekniklerinin kullanılmasıyla yaban tipi enzimlerden yeni özellikler taşıyan enzimler geliştirilmektedir (Houde ve ark., 2003; Bornscheuer ve Pohl, 2001).

1.6.3. Proteinlerin Akılcı Tasarımı

Akılcı tasarım protein mühendisliğinde kullanılan bir teknoloji olup, enzimin üç boyutlu yapısının, yapı-işlev ilişkilerinin anlaşılması ve enzimin özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. X-ışını kırınımı analizi ile yapıları aydınlatılan ilk lipazlar *R. miehei* ve insan pankreatik lipazıdır. Günümüzde etkin bir şekilde kullanılan “Lipaz Mühendisliği” veritabanları yardımı ile birçok mikrobiyal lipazın yapısına ulaşmak mümkündür. Akılcı protein tasarımına, istenen enzimin yapı ve işlevinin bilinmesiyle geliştirilen moleküler modellerle başlanmıştır. Kurulan bu model sistemler sayesinde, enzimin aktivite, kararlılık ve enantiyo seçiciliği geliştirilebilmektedir. Yönlendirilmiş mutagenез çalışmalarıyla, mutant genler elde edilmekte ve mutant geni taşıyan vektör, konak organizmaya aktarılmaktadır. Yapılan ekspresyon çalışmalarını takiben, rekombinant varyantlar saflaştırılıp nitelendirilerek incelenmektedir (Kuchner ve Arnold, 1997; Houde ve ark., 2003).

1.6.4. Yönlendirilmiş Evrim

Yönlendirilmiş evrim istenen özellikte enzimlerin oluşturulmasında son yıllarda kullanılan güçlü bir yöntemdir. Bu sayede yüksek sıcaklık, asidik ve alkali ortam gibi uç koşullarda, organik çözücülerde gelişmiş katalitik aktivite ve yeni substrat özgüllüğü gösteren enzim varyantları oluşturulabilir. Yönlendirilmiş evrim çalışmaları; hedef gende genetik çeşitlilik oluşturulması, gen kütüphanelerinin kurulması ve kütüphanenin üretkenlik ve/veya istenilen katalitik aktivite yönünden taranması olarak tanımlanan iki ana basamaktan oluşur (Hibbert ve ark., 2005).

Yönlendirilmiş evrim yöntemi, enzimin yapı ve etki mekanizmasının bilinmediği durumlarda, akılcı protein tasarımına alternatif yöntem olarak kullanılabilir. Bu yöntem, hedef gen ya da moleküler çeşitliliği yaratan ilişkili gen setlerinin, rastgele mutagenез ve/veya rekombinasyon çalışmalarında kullanılır (Houde ve ark., 2003).

Rastgele kütüphane çeşitliliğinin oluşturulmasına dayanan ve moleküler evrim olarak da anılan yönlendirilmiş evrimde, her mutagenез basamağını geçerli ve

etkin bir tarama veya bir seçim basamağı izler. Oluşturulan varyantlar görüntülenme ve seleksiyon için uygun ekspresyon sistemlerinde ifade edilirler. Görüntüleme ve seleksiyon yönteminin seçimi, potansiyel iyi varyantların izolasyonu için oldukça önemlidir. Yönlendirilmiş evrimin en önemli avantajı, kristal yapı bilgisine ve mekanizmayı kavramaya yönelik bir bilgiye gereksinim duyulmamasıdır. Bu yaklaşım, endüstriyel öneme sahip birçok proteinin sahip olduğu özelliklerin iyileştirilmesinde ve bu proteinlere yeni işlevsel karakterlerin kazandırılmasında kullanılmaktadır. Yönlendirilmiş evrim deneylerinin başarısında oluşturulan kütüphanelerin kalitesi önemli bir yere sahiptir (Arnold ve Georgiou, 2003).

1.7. Rastgele Kütüphane Oluşturma Yöntemleri

Rastgele kütüphane oluşturma yöntemleri genel olarak;

- Rastgele mutagenез
 - Rekombinasyona dayalı metotlar
- olmak üzere ikiye ayrılabilir.

Kütüphane oluşturmada kullanılan en doğrudan strateji istenilen işleve yakın bir işleve sahip enzimin tüm geninin rastgele mutasyona uğratılmasıdır. Böyle bir uygulamada, yapıya ya da mekanizmaya dair herhangi bir bilgiye gereksinim duyulmaz, buna rağmen beklenmeyen faydalı mutasyonları ortaya çıkartabilir.

Klasik bir rastgele mutagenез yöntemi “hataya-eğilimli PCR” (ep-PCR)’dır. ep-PCR’da PCR koşullarının modifiye edilmesiyle mutasyon oranı değiştirilebilir. PCR bileşenlerinin konsantrasyonlarının değiştirilmesi ve kullanılan polimerazın doğruluğunun azaltılması, termal döngü parametrelerinin ayarlanması ile yanlış nükleotit eşleşmelerinin frekansı artırılabilir (Wang ve ark., 2006).

epPCR yöntemleri hedef gende oluşturulacak mutasyon oranını artırmada kullanılan stratejiye bağlı olarak 4 grupta toplanabilir;

1. PCR bileşenlerinin ayarlanması ile polimerazın doğruluğunun azaltılması,

2. Nükleotit analoglarının kullanılması,
3. Mutajenik polimeraz kullanımı,
4. Dizi doyurma mutagenezi yöntemleri (SeSam).

Dengeli olmayan bir nükleotit konsantrasyonu ep-PCR'da mutasyon oranını artırmak üzere kullanılır. Genellikle dCTP ve dTTP konsantrasyonlarının artırılmasıyla, amplifikasyonda yanlış eşleşmelerin sayısı da çoğaltılabilir. Mn^{2+} iyonlarının varlığı mutasyonların oluşturulmasına yardımcı olmakla birlikte, sonraki ligasyon çalışmaları üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir. Dolayısıyla PCR'dan sonraki basamaklarda bu iyonların uzaklaştırılması önemli ve gereklidir. Ep-PCR'da genellikle normal bir PCR reaksiyonuna görece daha yüksek konsantrasyonda Mg^{+2} iyonu kullanılmaktadır. Daha fazla Mg^{+2} iyonu, ep-PCR'da istenen yanlış eşleşmeye olanak sağlar. Böylece ep-PCR'da, deoksiribonükleotit konsantrasyonunun değiştirilmesi ve Mn^{2+} iyonlarının kullanımı ile polimerazın tanıma özgüllüğü azaltılarak, uzama basamağındaki yanlış eşleşme oranı artırabilir. Ep-PCR'da; ayrıca PCR döngülerinin geçtiği koşullar altında olası en yüksek kararlılığı, nükleotitlerin yeni sentezlenen DNA ipliklerine kolayca katılmasını ve yüksek oranda mutagenezi sağlamak amacıyla nükleotit analogları kullanılabilir. Hata düzeltme yeteneğinin olmaması ve yanlış eşleşme oranının yaklaşık 2.7×10^{-5} olması nedeniyle *Taq* DNA polimeraz hataya-eğilimli PCR'da ilk tercih edilen enzimdir, ancak nükleotitlerin yanlış eklenme oranını daha fazla artırmaya yönelik mutajenik polimerazların kullanımı, uygulanan diğer yaklaşımlardan birisidir (Cadwell ve Joyce, 1992; Shafikhani ve ark., 1997; Lin-Goerke ve ark., 1997; Olsen ve ark., 2000).

Wong ve arkadaşları 2004 yılında, epPCR yöntemlerindeki sınırlandırıcı özelliklerin üstesinden gelmek üzere dizi doyurma mutagenezi “Sequence Saturation Mutagenesis, SeSaM” yöntemini geliştirdiler. SeSaM'da, mutasyonlar evrensel bir baz aracılığıyla yerleştirilir. Mutasyonlar, evrensel bazın rastgele baz eşleşmesi yapabilme özelliği nedeniyle, hedef dizideki her bir nükleotit pozisyonuna yerleştirilebilir. Bu nedenle de SeSaM, DNA polimerazların mutasyona olan

eğilimlerinden tamamen bağımsız bir yolla diziyi rastgele mutasyona uğratabilen bir yöntemdir (Wong ve ark., 2004).

DNA polimeraz yeni DNA zincirlerinin sentezi boyunca belli oranda yanlış eşleşmiş bazın eklenmesini katalize edebilir, bu durum mutasyon oluşumuna sebep olur. Böylece epPCR'da, mutasyona uğramış bölgelerin düzenli dağılımı beklenebilir. epPCR'dan farklı olarak oligonükleotit bazlı mutasyonlar sadece çalışmada kullanılan sentetik oligonükleotitlerle ilişkili özgül bölgelerde olabilir. Çünkü mutasyonlar proteini kodlayan diziyi girmiş sentetik DNA dizisinin doğrudan bir sonucudur. Oligonükleotit temelli mutagenез DNA sentez sürecini, rastlantının düzey ve pozisyonunu tamamen kontrol edebilir. Son yıllarda sentetik oligonükleotitlerin sentez ve karışımını kontrol edebilen oligonükleotit üretim teknikleri geliştirilmiştir. Oligonükleotit temelli yöntemler protein kodlayıcı dizilerde spesifik pozisyon ve bölgelerin rastgeleleştirilmesi adına çok güçlü bir araçtır (Kaur ve Sharma, 2006; Wang ve ark., 2006).

Diğer bir kütüphane oluşturma yöntemi ise rekombinasyondur. epPCR veya oligonükleotit temelli mutagenез ile mutant kütüphane oluşturulması tek bir ana gen dizisi ile başlar. epPCR'da mutasyona uğramış DNA dizilerindeki değişikliklerin çoğu bölge mutasyonlarıdır. Delesyon ya da insersiyonların olabilme ihtimaline rağmen, ardışık homojen bazların varlığı veya tamamen ilgisiz DNA dizilerinin yer değiştirmesi olasılığı düşüktür. Oligonükleotit temelli mutagenез yöntemi ile sentezlenmiş mutasyonlu parçalarda dizi çeşitliliği sınırlıdır. Bu sorunun çözümü için ilk kez 1994 yılında Stemmer DNA karıştırma yöntemini geliştirmiştir ve sonrasında bu yöntemin çeşitli türevleri kurgulanmıştır (Stemmer, 1994; Vanhercke ve ark., 2005).

DNA karıştırma yönteminde genler, kimera varyantlarını oluşturacak şekilde kombine edilir. Gen karıştırma yönteminin geliştirilmesi, yönlendirilmiş evrim için önemli bir basamak olmuştur. DNA karıştırma yönteminde ilgili genlerin kodlayıcı dizileri DNase I ile kesilir ve rastgele uzunlukta DNA fragmanlarının bulunduğu bir havuz oluşturulur. Bu fragmanlar sonradan tam uzunlukta bir geni oluşturmak üzere primer eklenmeyen bir PCR ile birleştirilerek kimera genler oluşturulur. Sonraki

basamakta klonlama için ilave bir PCR daha yapılır. Genin 3' ve 5' uçlarıyla 15-20 bazlık homoloji gösteren sentetik oligonükleotitler, yeniden düzenlenmiş karışıma eklenir. Tek zincirli DNA, çift zincirli DNA'ya görece daha iyi birleşme gösterir (Stemmer, 1994; Arnold ve Georgiou, 2003).

Aile karıştırma “family shuffling”, DNA karıştırmanın bir diğer türevidir. İşlevleri ilginç proteinleri kodlayan yeni dizilerin oluşturulmasında güçlü bir yaklaşımdır. Çok düşük (% 30-40 kadar) dizi benzerliğinin söz konusu olduğu durumlarda bile, oluşan kimerik proteinlerin önemli bir bölümü işlevsel olarak aktif kalabilmektedir. Böylece rekombinasyon, başlangıçtaki proteinlerden farklı dizi içeriğine sahip proteinlerin eldesine ve katlanmış işlevsel proteinlerin oluşumuna olanak sağlar. Tersine dizi boşluklarında rastgele mutagenез sonucu oluşmuş büyük atlamalar fonksiyonel olmayan genlerin oluşumuna da yol açabilir (Joern ve ark., 2002; Kikuchi ve ark., 2000).

Literatürde mutant kütüphane oluşturmak üzere kullanılan birçok yöntem vardır. Hibrit enzim oluşturmak için kullanılan “incremental truncation” (ITCHY) yöntemi, genler arasında DNA homolojisinden bağımsız kombinasyonel füzyon kütüphaneleri oluşturabilir (Wang ve ark., 2006). Tam genom karıştırma olarak tanımlanan, tüm genomda yapılan karıştırma, klasik soy geliştirmede karşılaşılan zararlı mutasyonların indirgenmesi, moleküler çeşitliliğin artırılması için güçlü ve faydalı bir yöntemdir (Arnold ve Georgiou, 2003). “Staggered extension protocol” (StEP) olarak isimlendirilen başka bir yöntem, DNase I fragmentasyon basamağı gerektirmez ve kalıp değiştirerek kimerik genler oluşturur. Kalıp dizi kopyaları tekrarlayan denatürasyon basamakları ve çok kısa süreli tutunma ve uzama basamaklarında çoğaltılır. Her döngüde, büyüyen fragmanlar dizi tamamlayıcılığına bağlı olarak farklı kalıplara tutunur ve ileri uzar. Bu tekrar tam uzunluktaki diziler oluşana değin sürdürülür (Kaur ve Sharma, 2006). Klasik DNA karıştırma yönteminin dezavantajlarından kurtulmayı amaçlayan bir diğer rekombinasyon yöntemi ise ADO (Assembly of Designed Oligonucleotides)'dur. Bu metot ebeveyn genlerin kendi kendine hibridizasyonunu en aza indirir ve tasarlanan oligomerlerin kontrollü şekilde örtüşmesi sonucunda yüksek bir rekombinasyon frekansına ulaşılır (Zha ve ark., 2003). Tüm bu yöntemlerin yanı sıra, yönlendirilmiş evrimde

mutajenler (nitroz asit, hidroksilamin, bisülfat, EMS gibi) kullanılarak elde edilen mutantları içeren kütüphanelerden de yararlanılmaktadır. Bu klasik çalışmalarda mikroorganizmanın bütün genetik materyali mutajenik kimyasallarla muamele edilir. Bu kimyasallar *in vitro*'da spesifik bir gende rastgele mutasyon oluşturmak üzere de kullanılır (Wang ve ark., 2006). Kimyasalların yanı sıra UV kullanılarak da rastgele mutasyonlar oluşturulabilir. Bu yöntem ucuz ve kolay olmasının yanı sıra kütüphanedeki varyant sayısının sınırlandırılması bakımından da önem taşımaktadır (Stemmer, 2002). Rastgele mutant kütüphanelerinin oluşturulmasında en büyük engel mutajenik DNA fragmanlarının konak vektöre entegrasyonunda yaşanır. Bu durumda ligasyon aşamasının her yeni basamakta iyi optimize edilmesi gerekir. Ligasyon basamağını dışlamak için kullanılan bir yöntem, çeşitli mutator soyların kullanımıdır. Bu tür bakteriyel soyların DNA onarım mekanizmaları zarar görmüştür, dolayısıyla çalışılan plazmin mutasyonuna olanak sağlar (Hibbert ve ark., 2005). Bir diğer yöntem olan MEGAWHOP, ligasyonda karşılaşılan problemlerin aşılması için geliştirilmiş yeni bir DNA klonlama yöntemidir. Bu yöntemde klonlanacak DNA fragmanı, kalıp plazmitte homolog bir bölgeyi değiştiren bir megaprimer olarak kullanılır. Bu yöntem basit ve hızlıdır, kütüphanenin kalitesi reaksiyon koşullarından bağımsızdır ve klonlanacak DNA fragmanlarının restriksiyon enzim bölgeleri olmaksızın doğrudan vektöre klonlama yapılabilir (Arnold ve Georgiou, 2003; Miyazaki ve Takenouchi, 2002). Tüm bunların dışında, mutant kütüphane oluşturmak için SHIPREC, RACHITT, OCM, SCOPE, SISDC, kodon karıştırma, *in vivo* DNA karıştırma gibi çeşitli yöntemler de araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır (Kaur ve Sharma, 2006; Hibbert ve ark., 2005).

1.7.1. Mutant Kütüphanelerin Taranması ve Geliştirilen Mutantların Seçilmesi

Yapılan araştırmalarla genetik çeşitlilik oluşturmaya yönelik birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlarla oluşturulan kütüphanelerin boyutu genellikle büyüktür. Bu nedenle yönlendirilmiş evrimin ikinci basamağını oluşturan seçme ve görüntüleme geliştirilen mutantların tanımlanmasında çok büyük bir öneme sahiptir. Yönlendirilmiş evrim için en sınırlayıcı basamak, hedef aktivite için iyi, hızlı ve verimli tarama veya seçimin yapılabilmesidir. Yönlendirilmiş evrim çalışmalarında

gelişmiş özelliklere sahip enzim varyantlarının seçimi rastgele genetik kütüphanelerin oluşturulması kadar önemli bir süreçtir. Çok sayıda varyantın üstesinden gelecek hızlı ve verimli bir taramayı sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesi yönlendirilmiş evrime hız kazandıracaktır (Hibbert ve Dalby, 2005; Turner, 2003).

Bir yönlendirilmiş evrim uygulamasında bulunabilecek varyantlar, daima kütüphanenin taranabilen kısmı ile sınırlıdır. Bu durum literatürde, “you get what you screen for” cümlesi ile ifade edilmekte ve *in vitro* evrimin ilk yasası olarak kabul edilmektedir (Hibbert ve Dalby, 2005).

Temel tarama ve seçme stratejileri, gen ve enzimatik aktivite ürünü arasında bir bağlantı kurar. Tarama ve seçme arasındaki temel fark, tarama gen ya da klonlar üzerinde, seçme ise tüm varyant havuzunda gerçekleştirilir.

Tarama ve seçme yöntemlerinde aranan önemli özellikler vardır.

- İlk olarak, eğer olası ise, seçilen yöntemin ilgilenilen özellik ile doğrudan ilişkili olması istenir. Substrat, hedef substratla özdeş ya da mümkün olduğunca yakın olmalı, ürün tayini etkin katalistin seçimi için çoklu “turnover” koşulları altında yapılmalıdır.
- İkincil olarak, analiz oldukça hassas olmalıdır. Yönlendirilmiş evrim deneylerinin ilk döngüsünde mutantların önemli sayıya erişmesi ve aynı değişikliklerin varyantlar arasında sıkça tekrarlanmaması istenir. Ancak ilerleyen döngülerde daha zorlu şartlar uygulanarak en iyi mutantlar seçilir. Son olarak tarama ve seçme adımı, kapsamlı tarama formatında uygulanabilir olmalıdır. Yüksek çıktı “High throughput” olarak adlandırılan seçim ya da tarama metotları, yönlendirilmiş evrim çalışmaları için bir ön gereksinimdir (Arnold ve Georgiou, 2003; Olsen ve ark., 2000; Boersma ve ark., 2007).

Geniş kapsamlı bir tarama yöntemi hızlı ve güvenilir olmanın yanı sıra tekrarlanabilir nitelikte olmalıdır. Bu nedenle genellikle, seçim ya da taramanın

otomatik olması özellikle önemlidir. Diğer yandan seçim metotları, substrat reaksiyonu ya da ürün oluşumunu takiben renk ya da floresan değişimi içeren analizlerdir. Floresan yöntemlerinin avantajları arasında, oldukça hassas olmaları ve arka plan sinyallerine neden olan bileşenlere duyarlılıklarının oldukça düşük olması sayılabilir. Ancak, doğal olmayan substratların kullanılması ve büyük kromoforik gruplar, hatalı sonuçlara yol açabilmektedir. Ek olarak substrat olarak görev yapan esterler yüksek veya düşük pH'da ve yükselen sıcaklıklarda kararlılık gösterememekte ancak sulu çözeltilerde çalışabilmektedir (Schmidt ve Bornscheuer, 2005).

Kolorimetrik ve florimetrik tarama yöntemlerinin yanı sıra, faj gösterimi, ribozom gösterimi, gaz kromatografisi gibi farklı yöntemler de uyarlanmıştır (Arnold ve Georgiou, 2003; del Rio ve ark., 1995; Schuster ve ark., 2005; Wang ve ark., 2004; Kay ve ark., 1996; Hanes ve Pluckthun, 1997; Zhao ve ark., 1999)

Tarama yöntemlerinin başarısı, endüstriyel enzimlere yeni işlevlerin kazandırılmasında kullanılan yönlendirilmiş evrim yönteminin yaygın olarak kullanımına katkıda bulunacaktır. Yönlendirilmiş evrimin ilk basamağında çalışılan enzimden bağımsız olarak benzer stratejiler kullanılabilir. Ancak ikinci basamak olan tarama ve seçme aşamasında her enzim özelinde farklı yöntemler uyarlanmaktadır. Yönlendirilmiş evrim için en sınırlayıcı basamak, hedef aktivite için iyi, hızlı ve verimli tarama veya seçimin yapılabilmesidir (Hibbert ve ark., 2005; Turner, 2003). *In vitro*'da mutant kolonilerin belirlenmesi çoğunlukla agar üzerinde floresan ya da kolorimetrik bir ürün oluşumuna dayanır. Varyantların agar ya da filtreler üzerinde seçilmesi, büyük kütüphanelerin hızlı bir şekilde taranmasına olanak tanımaktadır. Varyantlar, enzimatik reaksiyon sonucu substratın parçalanması ve ürün oluşumu sonucunda pH'da oluşan değişimin bir pH indikatörü kullanılarak belirlenmesi ile seçilmektedir. Bunun yanı sıra renkli ya da floresan ürünün oluşumuyla ve agar üzerinde oluşan şeffaf zonlar ile de seçim yapılabilir. Kolonilerin agar petrilinde, florofor veya kromofor oluşumuna dayalı analizleri büyük bir varyant havuzunu taramaya olanak verir. Fakat çözünür ürünler koloniden difüzlendiği için ancak çok aktif varyantlar saptanabilir. Bu nedenle çözünür olmayan ürünlerin analizi daha duyarlıdır (Wahler ve Reymond, 2001).

Varyantların aktivite analizleri, enzim özelinde geliştirilmiş yöntemler aracılığı ile mikropilaka okuyucu kullanılarak yapılabilir. Mikropilaka okuyucuların kullanıldığı kantitatif kolorimetrik ya da florometrik yöntemler, substratın erişilebilirliği ve enzimin eksprese edildiği yere bağlı olarak kültür üst sıvısında ya da tüm hücre düzeyinde uygulanabilmektedir (Turner, 2003).

Çok sayıda örnek için substrat dönüşümünün hassas bir şekilde tespit edilebilmesine olanak veren yüksek çıktılı yöntemler, çoğu katalitik işlevin *in vitro* evrimini izlemek için gereklidir. Bu çalışmalarda deneylerin tekrarlanabilir olması, uyumlu sonuçların elde edilmesi ve analiz verilerinin güvenilir olması oldukça büyük öneme sahiptir. Günümüzde, bazı floresan temelli teknikler, HPLC, GC ve kapiler elektroforez teknikleri enzim aktivitelerinin yüksek çıktılı taranmasında etkin kullanılmaktadır. İlaç sanayinin, diğer endüstriyel sektörlerin ve yürütülen genom çalışmalarının yüksek çıktılı (hızlı, verimli, duyarlı, geniş kapsamlı) tarama yöntemlerine olan gereksinimleri, bu tarama yöntemleri ve bağlantılı yeni cihazların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (Schmidt-Dannert, 2001).

Enzimatik aktivite veya özellik, organizmanın yaşamı ve büyümesi için temel oluşturuyorsa iyileşmiş mutantların belirlenmesi ve seçimi doğrudan yapılabilir. Tersine hedef katalitik aktiviteye sahip mutantların seçilmesi, ancak saptanabilir bir sinyal aracılığıyla olasıdır (Cohen ve ark., 2001). Bakteriler veya mikroorganizmalara büyümede bir avantaj sağlayacak katalitik bir aktivitenin tanımlandığı çalışmaların en bilinen örneği, büyüme için ilgilenilen substratın tek karbon kaynağı olarak kullanılmasıdır. Bu türde bir seçim, büyük kütüphanelerin taranmasına izin vermektedir. Ancak mikrobiyal metabolizmanın değişen çevre koşullarına yüksek uyum yeteneği, konakçıya dayalı bu seçim yöntemlerinin kullanımını sınırlandırmaktadır (Wahler ve Reymond, 2001). Hücre veya fajların yüzeyinde bulunan enzimlerin gösterimi, tarama ve seçme için kullanılan yöntemlerdendir. Enzim kütüphanelerinin görüntülenmesi için mikrobiyal hücrelerin ve fajların yüzeyine bağlanan proteinlerin görüntülenmesinde kullanılan teknolojilerin temel alındığı faj ve hücre yüzeyi görüntüleme yöntemleri de geliştirilmiştir (Jung ve ark., 2003; Fernandez-Gacio ve ark., 2003).

1.8. Protein Saflaştırma Çalışmaları

Saflaştırma çalışmaları; proteinlerin çözünürlük, büyüklük, yük ve özgül bağlanma afiniteleri gibi karakteristik özelliklerine dayanarak yapılır. Protein saflaştırma çalışmaları sonucunda elde edilen saf ya da kısmen saf proteinlerin yapılan nitelendirme çalışmaları ile biyokimyasal işlevleri incelenebilir. Yapılan dizileme çalışmaları ile proteinlerin amino asit dizileri doğrulanabilir. Saf proteinler veya ligandları ile etkileşimde olan proteinler ile yapılan X-ışını kırınım analizleri ile proteinlerin üçüncül yapıları hakkında bilgi edinilebilir. Protein saflaştırma çalışmalarında, hedeflenen proteinin, diğer proteinlerden ve protein olmayan hücre bileşenlerinden ayrılması amaçlanır. Çoğunlukla proteinlerin benzer yapılarda ve yakın büyüklüklerde olmaları, hedeflenen proteinin diğer proteinlerden ayrılması işlemini zorlaştırmaktadır. Protein saflaştırmasında istenen en iyi sonuç; istenilen protein miktarında ve aktivitesinde büyük oranda azalma olmazken, diğer proteinlerin miktarının azalmasıdır (Berg ve ark., 2002; Dennison, 2002).

Proteinlerin birbirinden ayrılması için polietilen glikol çöktürmesi, çeşitli çözücüler kullanılarak çöktürme işlemleri ve tuz çöktürmesi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonunda gerçekleştirilen çöktürme işlemi, temelde protein yüzeyinde bulunan hidrofobik aminoasit rezidülerine dayanır. Proteinlerin hidrofobik yan zincirlere sahip amino asitleri yüzeyde konumlanmakta ve sulu çözeltiler içindeki su molekülleri, bu yan zincirler etrafında toplanarak kümeler oluşturmaktadır. Çözünen tuz iyonları, proteinlerin çevresinde kümelenmiş serbest su molekülleriyle etkileşime girerek proteinlerdeki yan zincirlerin birbirleriyle etkileşmesine olanak yarattığından proteinler yüksek tuz konsantrasyonunda çökerler. Çöktürme işlemi gerçekleştirildikten sonra ortamda kalan tuz, sonraki saflaştırma basamaklarında biyolojik aktiviteyi etkilemekte ve iyonik değişimlere neden olmaktadır. Bu nedenle protein çözeltisi içinde yer alan tuzun çöktürme işlemini takiben ortamdan uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi yapılır. Diyaliz aşamasını, proteinleri büyüklüklerine, iyonik yüklerine veya özgül moleküllere olan ilgilerine göre ayıran kromatografik yöntemlerin kullanıldığı basamak takip eder. Moleküler elek kromatografisi, proteinleri büyüklüklerine göre ayırırken, iyon değişim kromatografisinde ayırma prensibi proteinlerin verilen pH

değerindeki net yükleriyle ilintilidir. Afinite kromatografisi tekniği ise özgül kimyasal gruplara yüksek oranda afinite gösteren proteinlerin saflaştırılmasını sağlar (Scopes, 1994; Berg ve ark., 2002; Dennison, 2002).

1.9. Dizi Analizi Çalışmaları

Nükleotit dizilerinin belirlenmesi çalışmalarında iki temel teknik geliştirilmiştir. Enzimatik yöntem veya dideoksi zincir sonlanması olarak adlandırılan dizileme yaklaşımı, F. Sanger ve çalışma arkadaşları tarafından, kimyasal degradasyon yöntemi ise Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilmiştir. Bu iki teknik ilk kez 1977 yılında yayımlanan makalelerle bilim dünyasına tanıtılmıştır (Sanger ve ark., 1977; Maxam ve Gilbert, 1977). Bu konuda yapılan çalışmalarla araştırmacılar nükleik asitlerde baz dizilimlerinin belirlenmesine yaptıkları katkılardan dolayı, Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir. Sanger ve çalışma arkadaşları geliştirdikleri enzimatik yöntemle, tek iplikli DNA'nın tamamlayıcı kopyasını sentezlemek için, DNA polimerazdan yararlanmışlardır. DNA polimerazlar DNA sentezini doğrudan başlatma yeteneğinden yoksundurlar. Zincir uzaması ancak kalıp DNA'ya bağlanmış olan primer bir DNA'nın 3' ucunda gerçekleşir. Uzayan primer zincirine eklenecek deoksिनүkleotit, kalıp DNA'daki baz ile baz çifti oluşturacak şekilde konumlanır. Zincir uzaması, primerin uzayan ucundaki 3'-hidroksil grubu ile yeni gelen deoksिनүkleotitin 5'-fosfat grupları arasında kurulan fosfodiester bağlarıyla gerçekleşir. Böylece, tüm zincir 5'→3' yönünde uzar. Sanger dizi analizi metodu, *E. coli* DNA polimeraz I Klenow fragmanının kullanılmasıyla geliştirilmiştir. Oligonükleotit primer dizilenmek istenen tek iplikli DNA kalıbının 3' ucuna tutunur. Kalıp ve tutunmuş primer karışımı daha sonra dört tüpe bölünür. Her birisine DNA polimeraz, içlerinden yalnızca birisi radyoaktif olarak işaretlenmiş tüm deoksिनүkleozit trifosfatlar (dNTP'ler) ve 4 ddNTP'den yalnızca bir tanesi konulur. Bu koşullarda primer, sonlanmaya neden olan özgün dideoksिनүkleotitin eklenmesine değin uzatılır ve işaretlenir. Dizi analizi için kullanılan çeşitli DNA polimerazlar mevcuttur. Dizi reaksiyonlarının yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesine olanak veren enzimler yaygın şekilde kullanılmakta, DNA kalıbında oluşan ikincil yapıların yüksek sıcaklık değerlerinde bozulması dizi reaksiyonlarını daha etkin kılmaktadır (Frederick, 1993).

Dizi analizi çalışmaları, dizi haritalama olarak isimlendirilen iki veya daha çok dizinin karşılaştırılarak benzerliklerinin bulunması, bir dizinin içinde belli özelliğe sahip nokta veya bölgelerin bulunması, genom haritalanması, mutasyonların tayini, homolog dizilerin karşılaştırılarak filogenik ağaçların oluşturulması ve protein yapı tahminlerinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

1.10. Modelleme Çalışmaları

Yönlendirilmiş evrim çalışmalarının en önemli getirisi, proteinin yapısı hakkında önceden bir bilgi gereksiniminin olmamasıdır. Bununla birlikte, ebeveyn ve mutant enzimlerin yapı-işlev ilişkisinin bilinmesi, mutasyonların etkilerinin yorumlanması açısından oldukça önemlidir. Ebeveyn ve mutant enzimlerin yapılarının karşılaştırılmasıyla, yapısal değişikliklerin temel etkileri hakkında bilgiye ulaşılabilmektedir. Yapı-işlev arasındaki ilişkinin bilinmesi ileri basamaklarda planlanacak akılcı tasarım deneylerine iyi bir alt yapı sağlayarak, özellikleri daha da iyileştirilmiş mutant enzimlerin eldesine olanak tanıyacaktır.

Ebeveyn ve mutant enzimlerle ilgili deneysel anlamda yapısal bilginin olmadığı durumlarda, protein dizisinden 3D yapının tahmin edilebilmesi için birçok metot mevcuttur (Krieger ve ark., 2003). Homoloji ile modelleme bu metotlar arasında en kolay ve en başarılı olanıdır. Bu yöntem aşağıda belirtilen ilkelere dayanır.

- Protein yapısı, dizisiyle belirlenir.
- Evrim süresince 3D yapı, ilgili diziden daha çok kararlılık gösterir, öyleki bu durum uzak homoloji gösteren proteinlerin bile benzer yapıyı kabul edilebileceği sonucuna götürür (Chothia ve Lesk, 1986).

Homoloji ile modellemenin güvenilirliği, diziler arasındaki benzerliğin yüksek olduğu durumlarda artmaktadır. Bu yöntem;

- sorgulanan dizinin, veri tabanındaki dizilerle hizalanması “alignment”,
 - iskelet oluşturulması,
 - lup modelleme,
 - yan zincir modelleme,
 - model optimizasyonu ve doğrulama
- basamaklarından oluşur.

İlk hizalama basamağı için, % 20 kadar az benzerlik içeren dizilerin bile belirlenebilmesine olanak sağlayan birçok dizi veritabanları geliştirilmiştir (Kelley ve Sternberg, 2009). Genel olarak, 150 amino asitten büyük proteinlerde güvenli homoloji modelleme için % 25’in üzerinde dizi benzerliği gerekmektedir (Rost, 1999). Dizi benzerliğinin oldukça yüksek olduğu durumlarda, veritabanlarında yer alan dizilerin araştırılması basamağı atlanarak “one-to-one threading” yaklaşımı uygulanır. Böylece kullanıcı-tanımlı tek kalıp yapı kullanılarak homoloji modelleme yapılır.

1.11. Tezin Amacı ve Bilime Katkısı

Bu tez çalışmasında; ülkemiz yerel kaynaklarından izole edilen ve tür düzeyinde tanımlanan lipaz üreticisi *Bacillus* soylarından yönlendirilmiş evrim yöntemi ile mutant kütüphanelerinin oluşturulması, elde edilen kütüphanelerin hızlı ve doğru bir şekilde taranması için yöntemlerin geliştirilmesi, özellikleri iyileştirilmiş varyantların bu yöntemlerle seçimi, varyantlarda oluşturulan mutasyonların tanımlanması, elde edilen iyileştirilmiş enzim özelliklerinin yaban tip enzimlere görece değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Yönlendirilmiş evrim yaklaşımı; enzimlerin kararlılık, bölge seçiciliği ve özellikle enantiyo seçicilik gibi farklı özelliklerinin optimizasyonunda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Laboratuvar koşullarındaki evrim yöntemleri ile doğal evrim taklit

edilerek farklı uyum mekanizmaları belirlenmeye çalışılmaktadır. Ülkemiz yerel kaynaklarından izole edilen *Bacillus* soylarının lipaz üretkenliğinin iyileştirilmesi ve enzim kararlılığının artırılmasına yönelik yönlendirilmiş evrim yaklaşımı ve tarama/seçme yöntemlerinin geliştirilmesi ile literatürde bu konuda yapılan çalışmalara katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemesi

Kullanılan Malzeme	Üretici Firma
2-amilalkol	MERCK 1.00978.1000
2-propanol	RIEDEL 24137
Agar	BD 214010
Agaroz	SİGMA A-6013
Akrilamit	SIGMA A 8099
Amonyum persülfat (APS)	BIORAD 161-0700
Amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	MERCK 1.01216
Ampisilin	ROCHE 10 835 269 001
Arap zamkı (Arabik Gum)	MERCK 1.04228
Asetik asit	RIEDEL 27225
Aseton	MERCK 100013
Asetonitril	CARLO ERBA 401201
BaCl ₂	FLUKA
Bisakrilamit	BIORAD 161-0201
Bradford protein assay dye	BIORAD 500-0006
Brillant blue R	SIGMA B 7920
Bromofenol blue	SIGMA B-6131
BSA	SİGMA-ALDRİCH A7906
BaCl ₂	SİGMA-ALDRİCH 217565
CaCl ₂	SIGMA C-3306
CoCl ₂	SIGMA C 2644
CTAB (setil trimetil amonyum bromid)	SIGMA H 6269
CuCl ₂	SIGMA C-6641
Diyaliz membranı	ROTH 0653.1

DNase I rekombinant, RNase free	ROCHE 04716728001
dNTP (PCR grade nucleotide mix)	ROCHE 04 728 874 001
DMSO (Dimetil sülfoksit)	SIGMA D 5879
<i>EcoRI</i>	ROCHE 11 175 084 001
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	SIGMA E 5134
Etanol	J. T. BAKER 8228
Etidyum bromür	SİGMA E-7637
FeCl ₂	FLUKA 44939
FeCl ₃	MERCK
FeSO ₄	SIGMA F-7002
Filtre kağıdı	3 MM Whatman
Gliserol	RIEDEL 15524
Glisin	SIGMA G 7126
HiPrep Q FF 16/10	GE Healthcare
<i>HindIII</i>	ROCHE 10 656 321 001
HCl	MERCK 1.00314
IPTG (İzopropil-β-D-tiogalaktozit)	Roche 724815
İzoamil alkol	MERCK 1.00978.1000
K ₂ HPO ₄	MERCK 1.05101.1000
KCl	RIEDEL 12636
KH ₂ PO ₄	RIEDEL 04243
LiCl ₂	ALDRİCH 213233
Lizozim	MERCK 105281
Metanol	MERCK 106007.2500
MgCl ₂	MERCK 105832
MnCl ₂	MERCK 105917
NaAc	MERCK 106268
NaCl	MERCK 1.06400.1000
NaOH	MERCK 1.06462.1000
NH ₄ Ac	RIEDEL
NiCl ₂	SIGMA N 5756
Nutrient broth	DIFCO 234000
Oligolar	IDT

PEG8000	SİGMA P2139
<i>Pfu</i> polimeraz	STRATAGENE 600670
P-nitrofenol	SİGMA 104-8
P- Nitrofenil asetat	SİGMA N-8130
P- Nitrofenil bütirat	SİGMA
P- Nitrofenil dekanolat	SİGMA N-0252
P- Nitrofenil laurat	SİGMA 61716
P- Nitrofenil miristat	SİGMA 70124
P- Nitrofenil oktanoat	SİGMA 21742
P- Nitrofenil palmitat	SİGMA N-2752
P- Nitrofenil stearat	SİGMA N-3627
PMSF (Fenilmetilsülfonilflorid)	SIGMA 7626
Protein belirteci (PAGE-Ruler)	FERMENTAS SM0671
Protein standardı	SIGMA SDS-6H
RNase	ROCHE 11 119 915 001
SDS	SIGMA 5750
Sodyum deoksikolat	SİGMA
Sukroz	SİGMA S0389
T4 DNA ligaz	ROCHE 10 716 359 001
<i>Taq</i> DNA polimeraz	ROCHE 1 418 432
TEMED	SIGMA T 7024
Tribütirin	FLUKA 91012
Tris baz	SIGMA T-1503
Triton X-100	MERCK
Tween 20	SIGMA P 1379
Tween 80	SIGMA P 8074
X-gal	FERMENTAS R0404
Maya özütü	MERCK 1.03753
ZnCl ₂	Anonim
ZnSO ₄	Anonim
β-merkaptetanol	SIGMA M-6250
λ DNA	MBI-FERMENTAS

100 bp DNA belirteci	FERMENTAS 0241
----------------------	----------------

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Üretici Firma
+4 °C soğutucu	ARİSTON NOFROST
-20 °C dondurucu	ARİSTON NOFROST
-80 °C dondurucu	HERAEUS INSTRUMENT
Agaroz jel elektroforez sistemi	BIOMETRA AgaGel Mini
Akta saflaştırma sistemi GE, Healthcare	GE, Healthcare
Buz makinesi	BAR LINE BF 85
Çalkalamalı su banyosu	JULABO-SW 21
Çalkalamalı su banyosu	GFL 1083
Çalkalamalı yer inkübatörü	CERTOMAT-BS-T
Etüv	EDMUNT BÜHLER-TH 15
Hassas terazi	SARTORIUS-BL 210S
İnkübatör	EDMUND BÜHLER KS-15
Jel görüntüleme sistemi	PHARMACIA BIOTECH
Jel görüntüleme sistemi	VİLBER LOURMAT
Jel görüntüleme yazıcısı	SONY
Liyofilizatör	JOUAN RC-10.10
Liyofilizatör soğutucu motoru	JOUAN RCT 90
Liyofilizatör vakum motoru	ALCATEL- Pascal 2005 C1
Manyetik karıştırıcı	HEİDOLPH MR3001
Masa üstü soğutmalı santrifüj	HERAEUS Sepatech, Biofuge 15R
Masa üstü soğutmalı santrifüj	BECKMAN COULTER, Allegra 25R
Mikro plaka okuyucu	BMG Labtech, Fluostar Omega
Mikrosantrifüj	BECKMAN Microfuge 18
Mikrodalga fırın	BEKO-1550
Mikropipet 2 µl	GILSON
Mikropipet 1000 µl	GILSON
Mikropipet 200 µl	GILSON

Mikropipet 5000 µl	GILSON
Mikropipet (çok kanallı)	GILSON
Orbital karıştırıcı	BIOMETRA WT12
Otoklav	HIRAYAMA-HICLAVE HVE-50
Otoklav	VARIOKLAV-Dampfsterilizator 300
Otomatik gen analiz sistemi	BECKMAN COULTER CEQ 8000
pH metre	İNOLAB pH LEVEL 1
Protein elektroforez sistemi	BIORAD Mini Protean II
Spektrofotometre	BIORAD-Smartspec 3000
Steril kabin	HERAEUS-Herasafe-HS 12
Pastör fırını	BİNDER-ED115
Soğutmalı su banyosu	VWR 1160S
Sonikatör	BRANSON Digital Sonifier 250
Tek kullanımlık steril filtre (0.45 µm)	SCHLEİCHER&SCHUELL10462200
Tek kullanımlık steril filtre (0.22 µm)	SARTORIOUS STEDİM 17597
Terazi	SARTORİUS-BL 3100
Termal döngü cihazı	BİOMETRA T3
U.V transillüminatör	VILBER LOURMAT V026347
Vorteks	VORTEX GENIE-2
96-kuyulu mikrolaka	TPP 92097

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Biyolojik Materyal

GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu'nun, Kızılay Pendik Tıp Merkezi Mikrobiyoloji laboratuvarı ile birlikte yürüttüğü çalışmayla, ülkemizin Bursa, Afyon, Gönen ve Edremit gibi çeşitli ekolojik ortamlarından izole edilen ve lipaz üretme yeteneğine göre taranarak seçilen *Bacillus* soylarının bazıları geleneksel yöntemlerle tanımlanmış ve enzim üretiminin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ön tiplendirmesi yapılan soylar arasından, lipaz aktivitesi en yüksek olan 12 soy (L1, L3, L5, L6, L8, L10, L13, L14, L15, L16, L21 ve L22) seçilmiş, API 50 CHB/20 E

kiti ve VITEK sistemi kullanılarak sahip oldukları morfolojik ve biyokimyasal özellikler ve olası tür isimleri tayin edilmiştir (Tuzlakoğlu ve ark., 2003). Klasik tiplendirme yöntemi ile seçilen soylar, GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu tarafından yürütülen TÜBİTAK 1001 projesi (105T188) kapsamında, moleküler temelli çeşitli yöntemler kullanılarak ileri düzeyde tiplendirme çalışmalarına alınmıştır (İşsever Öztürk ve ark., 2008). Tez çalışması kapsamına alınan lipaz üreticisi yerel soyların izole edildikleri kaynakların isimleri, izolasyon koşulları Tablo 2.1’de, yine Grubumuz tarafından gerçekleştirilen klasik ve moleküler tiplendirme analizlerinin sonuçları ise Tablo 2.2’de yer almaktadır.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda belirtilen lipaz üreticisi soylardan L5 ve L21 biyolojik materyal olarak kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Lipaz üreticisi yerel soyların izole edildikleri kaynak yeri ve özellikleri.

Örnek No	Örnek Kaynağının Yeri ve Özellikleri		
	Kaynağın Yeri	pH	°C
L1	Gönen Dağ Ilıcası-1 (Su)	7	43
L3	Gönen Dağ Ilıcası-1 (Su)	7	43
L5	Gönen Dağ Ilıcası-2 (Su)	7,5	43
L6	Gönen Dağ Ilıcası-2 (Su)	7,5	43
L8	Edremit Zeytin İşletmesi (Karasu)	5	-
L10	Afyon Gazlıgöl Kaplıcası (Su)	-	29
L13	Afyon Gecek Kaplıcası (Toprak)	-	26
L14	Edremit Zeytin İşletmesi (Karasu)	5	-
L15	Edremit Zeytin İşletmesi (Karasu)	5	-
L16	Edremit Zeytin İşletmesi (Prina)	-	-
L21	Bursa Yeni Kaplıca (Tortu)	7,8	81,6
L22	Edremit Zeytin İşletmesi (Karasu)	5	-

Tablo 2.2. *Bacillus* yerel izolatlarının klasik ve moleküler tiplendirme yöntemleri sonucunda belirlenen tür adları (Gümüşel ve ark., 2008).

Soy	Tür ismi (Klasik)	Tür ismi (Moleküler tiplendirme)
L1	<i>B. subtilis/B. firmus</i>	% 70 <i>B. pumilus</i>
L3	<i>B. pumilus/B. sphaericus</i>	% 70 <i>B. pumilus</i>
L5	?	% 70 <i>B. pumilus</i>
L6	<i>B. pumilus</i>	% 70 <i>B. pumilus</i>
L8	?/ <i>B. subtilis/B. pumilus</i>	% 70 <i>B. subtilis</i>
L10	?/ <i>B. subtilis</i>	% 70 <i>B. subtilis</i>
L13	<i>B. subtilis</i>	% 80 <i>B. subtilis</i>
L14	<i>B. subtilis/B. pumilus</i>	% 60 <i>B. subtilis</i> % 60 <i>B. pumilus</i>
L15	<i>B. subtilis/B. pumilus</i>	≥ % 80 <i>B. pumilus</i> ?
L16	<i>B. subtilis</i>	% 80 <i>B. subtilis</i> % 60 <i>B. amyloliquefaciens</i>
L21	<i>B. pumilus</i>	% 80 <i>B. pumilus</i>
L22	<i>B. subtilis/B. pumilus</i>	% 70 <i>B. pumilus</i>

2.2.2. Yerel *Bacillus* Soylarından Genomik DNA İzolasyonu

DNA manipulasyonları Sambrook ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanan standart metotlara göre gerçekleştirildi (Sambrook ve ark., 1989). Tez çalışmasında kullanılan *Bacillus* soylarının genomik DNA'sı, Wizard DNA saflaştırma kiti (Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak izole edildi.

2.2.2.1. Promega Wizard Genomik DNA İzolasyon Kiti Protokolü

- 2 ml LB besi yeri, yerel *Bacillus* izolatlarının -20 °C stokları ile % 1 oranında aşılandı ve gece boyu 37 °C'ta, 175 rpm'de inkübe edildi.
- Kültürlerin 1 ml'si ependorf tüpüne alınarak 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvılar uzaklaştırıldı. Peletler 480 µl 50 mM EDTA, pH 8.0 içinde çözüldükten sonra 120 µl lizozim (10 mg/ml) eklenerek 37 °C'ta 30-60 dakika süreyle inkübe edildi.
- Inkübasyonu takiben örnekler 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvılar uzaklaştırıldı. Pelet 600 µl "nuclei lysis" çözeltisi ile mikropipet ile nazikçe karıştırılarak çözüldü ve -80 °C'ta 5 dakika süreyle inkübe edildi.
- Inkübasyon sonrasında oda sıcaklığına gelinceye kadar beklenen tüplere 3 µl RNase çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve 37 °C'ta 15-60 dakika inkübe edilip, tekrar oda sıcaklığına soğutuldu.
- Tüplere 200 µl "protein precipitation" çözeltisi eklenerek vortekslendi ve 5 dakika buzda bekletildikten sonra 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası elde edilen üst sıvı, oda sıcaklığında 600 µl izopropanol içeren yeni bir eppendorf tüpüne alınarak karıştırıldı.
- 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek, üst sıvı uzaklaştırıldı ve 600 µl % 70 etanol (oda sıcaklığında) eklenerek karıştırıldıktan sonra 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırılarak liyofilizatörde 10-15 dakika kurutuldu.
- Yapılan tüm bu işlemlerden sonra elde edilen genomik DNA çökeleği 40 µl sulandırma (rehydration) çözeltisi içinde 65 °C'ta 1 saat ya da +4 °C'ta gece boyu çözünmeye bırakıldı.

- Elde edilen genomik DNA konsantrasyonları % 1 agaroz jelde ve spektrofotometrik olarak tayin edildikten sonra -20 °C’ta saklandı.

2.2.3. Seçilmiş *Bacillus* Soylarından Lipaz Genlerinin PCR ile Çoğaltılmasına Yönelik Çalışmalar

Lipaz-kodlayan genler, izole edilen genomik DNA’dan, klasik ve moleküler tiplendirme çalışmalarından elde edilen sonuçlar gözetilerek tasarlanan oligonükleotitlerin kullanıldığı PCR’lar yardımıyla çoğaltıldı. Tasarlanan primerler, bu primerlerin taşıdığı *Hind*III, *Eco*RI ve *Pst*I restriksiyon enzim tanıma bölgeleri Tablo 2.3’te gösterilmektedir.

Tablo 2.3. Lipaz genlerinin çoğaltıldığı PCR’larda kullanılan primerler.

Primer	Soy	Dizi
Primer 20F	<i>B. subtilis</i>	5’-TAC <u>GAA GCT TGA</u> TGA AAT TTG TAA AAA GAA GGA TCA TTG-3’ <i>Hind</i> III
Primer 21F	<i>B. pumilus</i>	5’-TAC <u>GAA GCT TGA</u> TGA AAG TGA TKY KWK TTA AG-3’ <i>Hind</i> III
Primer 22R	<i>B. sub./B. pumi.</i>	5’-TAC <u>GGA ATT CTT</u> ART TYG TAT TCT GKC C-3’ <i>Eco</i> RI
Primer 23R	<i>B. subtilis</i> lipE	5’-TAC <u>GGA ATT CTT</u> AAT CAG GCT GTT GAC TAC-3’ <i>Eco</i> RI
Primer 24F	<i>B. thermocatenulatus</i>	5’-TAC <u>GAA GCT TGA</u> TGA TGA AAG GCT GCC GGG TG-3’ <i>Hind</i> III
Primer 25R	<i>B. thermocatenulatus</i>	5’-TAC <u>GGA ATT CTT</u> AAG GCC GCA AAC TCG CCA AC-3’ <i>Eco</i> RI
Primer 26F	<i>B. thermoleovolans</i>	5’-TAC <u>GCT GCA GGG</u> CTT GGG TTA TGT TTG TG-3’ <i>Pst</i> I
Primer 27R	<i>B. thermoleovolans</i>	5’-TAC <u>GGA ATT CTT</u> ATC CCG CAA GCT TCG C-3’ <i>Eco</i> RI

Lipaz aktivitesi yönünden öne çıkan 12 *Bacillus* sp. soyu farklı primer çiftleriyle yapılan kombinasyonlarla PCR çalışmasına alındı. Daha önce yapılan klasik ve moleküler tiplendirme çalışmaları sonucunda elde edilen veriler, primerlerin tasarlanmasında ve tasarlanan primerlere uygun *Bacillus* sp. soylarından lipaz genlerinin çoğaltılmasında kullanıldı. Lipaz genlerini çoğaltmaya yönelik PCR

çalışmalarında, farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarının yanı sıra, farklı tutunma sıcaklıkları denendi. Lipaz üreticisi *Bacillus* soylarında ilgili genleri çoğaltmaya yönelik PCR çalışma koşulları ile kullanılan programlar Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'te yer almaktadır. Yapılan PCR reaksiyonları sonrasında örnekler % 1 agaroz jelde yürütülerek PCR ürünlerinin büyüklükleri kontrol edildi.

Tablo 2. 4. Lipaz genlerinin çoğaltıldığı PCR'ların koşulları.

80 ng primer
200 ng kalıp DNA
200 μ M dNTP
1.5, 3 ve 4 mM olacak şekilde üç farklı $MgCl_2$ konsantrasyonu
0,9 U <i>Taq</i> DNA polimeraz / tüp
1X PCR tamponu

Tablo 2.5. Lipaz genlerinin çoğaltılması için kullanılan PCR programları.

<u>Prog# 81</u>	<u>Prog# 82</u>	<u>Prog# 83</u>
95 °C 5'	95 °C 5'	95 °C 5'
94 °C 1' } 55 °C 1' } 30x 72 °C 1' }	94 °C 1' } 64 °C 1' } 30x 72 °C 1' }	94 °C 1' } 55 °C 1.5' } 30x 72 °C 1' }
72 °C 10'	72 °C 10'	72 °C 10'

2.2.4. Klonlanacak PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden İzole Edilmesi

Lipaz-kodlayan genlerin PCR aracılığıyla çoğaltılması ve jelde ürün boylarının kontrol edilmesi aşamasından sonra, ilgili PCR ürünleri “Promega PCR clean-up and gel isolation kit” kullanılarak jelden geri kazanıldı ve izolasyon sonrası tekrar miktar tayini yapılmak üzere agaroz jelde görüntülendi. PCR ürünlerinin jelden izolasyonu aşamasında; örnekler sodyum asetat-alkol ile çöktürülüp

kurutulduktan sonra 15 µl ddH₂O içinde çözülerek, 3 µl 6x boya eklendi ve % 1'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforezi takiben ilgili bantlar jelden kesilerek alındı ve “Promega Wizard SV Gel and PCR clean-up system” kullanılarak izolasyon tamamlandı. İzolasyon sonrası örneklerden 5 µl ayrılarak % 1'lik agaroz jelde miktar tayini yapıldı.

2.2.4.1. “Promega Wizard SV Gel PCR clean-up and gel isolation kit” Protokolü

- Elektroforez sonrasında kesilen DNA parçası 1.5 ml eppendorf tüpe alınarak tartıldı.
- Her 1 mg jel başına 1 µl “membrane binding solution” eklenerek vortekslendi ve jel parçası tamamen çözünene değin 60-65 °C'a ayarlanmış su banyosunda bekletildi.
- Çözünen jel karışımı toplama tüpünün içine yerleştirilmiş SV mini kolona aktarılarak oda sıcaklığında 1 dakika süreyle bekletildi.
- 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından toplama tüpündeki sıvı dökülerek, mini kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- 700 µl “membrane wash solution” eklendikten sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, yine toplama tüpündeki sıvı döküldü ve mini kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- 500 µl “membrane wash solution” eklenen örnekler 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak mini kolon yine aynı tüpe alındı ve etanolün tamamen uzaklaştırılması için santrifüj kapağı kullanılmadan 14.000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj edildi.
- Mini kolon 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılarak üzerine 50 µl “nuclease-free water” eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika süreyle bekletildi.
- Son adımda 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından mini kolon atıldı. Eppendorf tüpü içinde bulunan DNA çözeltisi -20 °C'ta saklandı.

2.2.5. Çoğaltılan Lipaz Genlerinin Klonlanmasına Yönelik alışmalar

Klonlama alışmalarında “InsTAclone PCR Cloning kit (Fermentas)” kullanıldı. Bölüm 2.2.3’te yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında ilgili lipaz genlerini üretmede kullanılacak PCR koşulları belirlendi ve klonlama çalışması için istenen miktarda ürün elde edebilmek amacıyla toplu üretime gidildi. Bu çalışmada kullanılan PCR koşulları Tablo 2.6’da görölmektedir.

Tablo 2.6. Lipaz genlerinin klonlama amacıyla üretildiği optimize edilmiş PCR koşulları.

<u>PCR koşulları</u>
80 ng primer
200 ng kalıp DNA
200 µM dNTP
3 mM MgCl ₂
1,25 U <i>Taq</i> DNA polimeraz / tüp
1X PCR tamponu
<u>Prog# 81</u>
95 °C 5’
94 °C 1’
55 °C 1’
72 °C 1’
72 °C 10’
} 30x

PCR reaksiyonları belirtilen şartlarda gerçekleştirildikten sonra reaksiyon sonunda her bir tüpe 0.5 U/µl ilgili *Taq* DNA polimeraz enzimi eklenerek 72 °C’ta 15 dakika süreyle tamamlama reaksiyonu yapıldı. PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra çöktürme öncesinde örneklerden 2 µl alınarak % 1’lik agaroz jelde miktar

ayini yapıldı. Çöktürme işlemine alınacak PCR ürünleri ddH₂O ile 100 µl'ye tamamlanarak karıştırıldı. Her bir örneğe 10 µl NaAc (3M, pH 5.2) ve 250 µl % 100 EtOH eklenerek 30 dakika süreyle -80 °C'ta bekletildi. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi takiben örneklerin üst sıvısı uzaklaştırıldı ve % 70 EtOH eklenerek santrifüj işlemi tekrar edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, santrifüjlü evaporatör ile kurutuldu. Örnekler çöktürölüp kurutulduktan sonra 15 µl ddH₂O içinde çözölerek, 3 µl 6x boya eklendi ve % 1.2'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforezi takiben ilgili bantlar jelden kesilerek alındı ve Bölüm 2.2.4.1'de anlatıldığı gibi "Promega Wizard SV Gel and PCR clean-up system" kullanılarak izolasyon tamamlandı. İzolasyon sonrası örneklerden 5 µl ayrılarak % 1'lik agaroz jelde miktar tayini yapıldı. Ligasyon çalışması, agaroz jel profilinden yola çıkılarak yapılan miktar tayinleri temelinde gerçekleştirildi.

Ligasyon protokolü

165 ng vektör pTZ57R/T (InsTAclone PCR cloning kit, Fermentas)

0.27 pmol "insert"

5U T4 DNA ligaz

1X DNA ligaz tamponu

Ligasyon materyali öncelikle 22 °C'ta 30 dakika ve ardından 4 °C'ta gece boyu bırakıldı. Ertesi gün 70 °C'ta 10 dakika ligaz inaktivasyonu gerçekleştirildi. Bir sonraki basamakta TSS yöntemi ile hazırlanan *E. coli* JM109 kompetan hücreleri ligasyon materyali ile transforme edildi. Transformasyon basamağında pozitif ve negatif kontroller olarak sırasıyla, pTZ57R (insert taşıyan) ve pTZ57R (insert taşımayan) kullanıldı.

2.2.5.1. TSS ile Transformasyon Yöntemi

Kompetan hücre hazırlanması

- 2 ml LB besi yeri, tek koloni ile veya -20 °C ya da -80 °C hücre stoğu (*E. coli* JM109) ile % 1 oranında aşılaraq gece boyu 37 °C'ta 200 rpm'de inkübe

edildi.

- Kültürün 1 ml'si ile (% 1 aşılama oranı) 500 ml'lik erlende bulunan 100 ml LB besi yeri aşılanarak 37  C'ta 200 rpm'de inkübe edildi.
- OD₆₀₀ değeri 0.5 olunca kültür önceden soğutulmuş santrifüj tüpüne alınarak buzda 20 dakika bekletildi.
- Süre bitiminde +4  C'ta 7000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırdı.
- Pelet buzda soğutulmuş 10 ml TSS içinde  z ld kten sonra kompetan hücreler transformasyon için kullanıldı.
- Kullanılmayan hücreler bölümlere ayrılarak bekletilmeden -80  C'ta saklandı.

TSS (100 ml)

- 10 g PEG8000
- 5 ml DMSO

LB ile 95 ml'ye tamamlanarak 121  C'ta 20 dakika otoklavlandı. Soğutulduktan sonra içine filtre ile steril edilmiş 1 M MgCl₂'den 5 ml eklenerek karıştırıldı ve +4  C'ta saklandı.

LB (1 litre)

- 10 g nutrient broth
- 5 g yeast extract
- 8 g NaCl
- 0.52 g trizma base

LB agar (1 litre)

- 10 g/l nutrient broth
- 5 g/l yeast extract
- 8 g/l NaCl
- 15 g/l agar

Transformasyon

- Buzda bekleyen tüplere ligasyon materyalinin 5 µl'si dağıtıldı.
- Üzerlerine 200 µl kompetan hücre eklenerek karıştırıldı.
- Tüpler 30-60 dakika süreyle buz içinde bekletildi.
- 42 °C'ta 2 dakika ısı şokuna maruz bırakılan tüpler bu sürenin sonunda hemen buza alınarak 2-5 dakika bekletildi.
- Tüplere 1 ml LB eklendi ve 37 °C'ta 1 saat çalkalanarak inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında tüpler 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Tüpün dibinde bir miktar sıvı bırakacak şekilde üst sıvı döküldü ve kalan miktarla pelet çözülerek, X-gal/IPTG içeren LB+ampisilinli agar petrilere yayıldı.
- Petriler gece boyu 37 °C'ta karanlıkta inkübe edildi.

LB/Ampisilin/X-gal/IPTG agar plakları

Dimetilformamitte çözülerek hazırlanmış 20 mg/ml X-Gal'den (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 40 µl alınarak 40 µl LB ile karıştırıldı. Son olarak 40 µl IPTG (100 mM) eklenerek karışım hazırlandı. Bu karışım, baget yardımı ile LB-ampisilin agar petrilere yayılarak kurutuldu. Çalışmanın karanlıkta yapılmasına özen gösterildi.

IPTG (İzopropil-β-D-tiogalaktozit)

100 mM stok çözeltisi hazırlandı. 0.283 g IPTG, 10 ml steril distile su içerisinde çözüldü. 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek -20 °C'ta saklandı.

Ampisilin

10 mg/ml stok çözeltisi hazırlandı. 1 g ampisilin, 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü ve çözelti pH'sı 1M NaOH ile 8.5'e ayarlandı. 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek -20 °C'ta saklandı.

Transformasyon sonrası 37 °C'ta gece boyu büyütülen petrilere elde edilen beyaz koloniler, bir sonraki aşamada STET yöntemi ile plazmit izolasyonu yapılmak üzere hazırlandı.

2.2.5.2. Klon Adaylarından STET Yöntemi ile Plazmit İzolasyon Çalışmaları

Transformasyon sonucunda elde edilen beyaz koloniler LB+ampisilinli besi yerinde üretildi. Bu kolonilerden STET yöntemi ile plazmit izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitlerin 5 µl'si ilgili restriksiyon enzimleri ile kesilerek % 1 agaroz jelde kontrol edildi. Kesimler 37 °C'ta 2 saat süreyle gerçekleştirildi. Kesimin son 15 dakikasında örnekler RNase eklendi. Kesim sonrası sodyum asetat-alkol çöktürmesi yapılan örnekler kurutulduktan sonra uygun miktarda dH₂O ile çözüldü ve % 1 agaroz jelde yürütülerek parça büyüklükleri doğrulandı.

STET yöntemi ile plazmit izolasyonu

- Gece boyu, % 1 ampisilin içeren 10 ml LB besi yerinde büyütülen kültürler +4 °C'ta 3500 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelet 400 µl STET içinde çözüldü ve eppendorf tüpüne aktarıldı.
- 25 µl lizozim (10 mg/ml) solüsyonu eklenen tüpler 1 dakika süreyle vortekslendi.
- Tüpler bir sonraki aşamada kaynayan su banyosunda 45 saniye tutularak oda

sıcaklığında 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan pelet steril kürdan ile uzaklaştırıldı.

- Tüplere sırasıyla 200 µl 5M NH₄Ac ve 1 ml 2-propanol eklenerek vortekslendi ve -20 °C’ta 20-30 dakika bekletildi.
- +4 °C’ta 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüjün ardından üst sıvılar uzaklaştırılarak pelet kurutuldu ve 50 µl steril dH₂O ile vortekslenerek çözüldü.

STET (100 ml)

- 8 g sukroz
- 5 ml Triton X-100
- 5 ml 1M Tris-HCl pH 8.0
- 1.86 g EDTA

2.2.6. Dizi Analizi Çalışmaları

Klonlama çalışmalarını doğrulamak üzere yapılan restriksiyon endonükleaz kesimlerinin jelde değerlendirilmesinin yanı sıra, klonlanan ilgili lipaz genlerinin veritabanlarında yer alan lipaz gen dizilimleri ile karşılaştırılması amacıyla, TA klonlama sonucu elde edilen klon adaylarının nükleotit dizisi, Beckman Coulter CEQ 8000 otomatik dizi analiz sistemi kullanılarak belirlendi. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılacak plazmit DNA, STET yönteminden kaynaklanabilecek kirliliklerin analizi olumsuz etkileme ihtimali göz önüne alınarak kit aracılığıyla izole edildi. Çalışmada “Promega Wizard Miniprep Kit” kullanıldı.

“Promega Wizard miniprep kit” ile Plazmit DNA İzolasyonu

- Gece boyu büyütülen 5 ml hücre kültürü 4000 rpm’de 20 dakika süreyle çöktürülerek üst sıvı uzaklaştırıldı.

- Örneklere 250 µl “cell resuspension” solüsyonu eklenerek pipetle çözüldü ve örnek eppendorf tüpüne alındı.
- 250 µl “cell lysis” solüsyonu eklendikten sonra alt-üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- Tüplere 10 µl “alkaline protease” çözeltisi eklendikten sonra alt-üst edilerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- Bir sonraki basamakta 350 µl nötralizasyon çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve 14.000 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst sıvı pipetle alınarak özel tüplere yerleştirilmiş membran filtrele aktarıldı ve 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası alt tüpe biriken sıvı boşaltılarak tekrar yerleştirildi ve 750 µl yıkama çözeltisi eklenerek 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- İkinci yıkama 250 µl yıkama çözeltisiyle yapıldı ve 14.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Bir kez de santrifüj kapağı açık şekilde 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtre yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Son olarak örneklere 750 µl “nükleaz free water” eklendi ve 14.000 rpm’de 1 dakika süreyle santrifüj edildi ve plazmit izolasyonu tamamlandı. İzolasyon süresince yapılan tüm santrifüjler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Plazmit DNA örneklerine restriksiyon enzim kesimi uygulandıktan sonra DNA miktarı, % 1 agaroz jelde ve spektrofotometrik olarak belirlendi ve ardından dizi analizi reaksiyonuna geçildi.

Kalıbın daha iyi açılabilmesi ve okunabilmesi için Tablo 2.7’de yer alan programa ek olarak, plazmit DNA’lar için önerilen ön ısıtma reaksiyonu uygulandı. Bu adımda kalıp ve su eklenerek termal döngü cihazında 96 °C’ta 3 dakika veya 86 °C’ta 5 dakika olacak şekilde iki ayrı ön ısıtma programı uygulandı. Ön ısıtmayı takiben reaksiyona primer ve DTCS eklenerek Tablo 2.7’de belirtilen program aynı şekilde uygulandı.

Tablo 2.7. Dizi analizi için PCR koşulları.

<u>PCR koşulları</u>
250 ng kalıp DNA
6.4 pmol primer (M13 evrensel primer)
8 µl DTCS tamponu
dH ₂ O ile son hacim 20 µl olacak şekilde tamamlandı.
<u>PCR program</u>
94 °C'ta 4'
96 °C'ta 20''
50 °C'ta 20''
60 °C'ta 240''
30X

PCR tamamlandıktan sonra, reaksiyon 3M NaAc, pH 5.2, 100 mM EDTA, 20 mg/ml glikojen (v:v:v/2:2:1) karışımından oluşan çözeltinin eklenmesiyle durduruldu. Örnekler 60 µl % 95 soğuk etanol eklenerek +4 °C'ta 14 000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. 200 µl % 70 soğuk etanol eklenen örnekler 4 °C'ta 14.000 rpm'de 5 dakika süreyle çöktürüldü ve üst sıvı atıldıktan sonra % 70 etanol basamağı tekrar edildi. Örnekler liyofilizatörde kurutulduktan sonra, dizi reaksiyonundan hemen önce 40 µl örnek yükleme solüsyonunda çözülerek, örnek mikropalakalarına yüklendi ve Beckman Coulter CEQ 8000 dizi analiz sisteminde okundu.

Dizi analizi sonunda elde edilen lipaz gen dizilimlerinin, çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak veritabanlarında yer alan diğer lipaz genleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi sonucunda 12 *Bacillus* soyundan 10 tanesinin klon olduğu ve 0.65 kb büyüklüğündeki lipaz genini taşıdığı sonucuna varıldı. Homoloji çalışmaları NCBI GeneBank veritabanı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile gerçekleştirildi.

2.2.7. Ekspresyon Çalışması ile Klon Adaylarının Doğrulanması

Yapılan klonlama çalışmaları; restriksiyon endonükleaz kesimleri ve dizi analizleri ile doğrulandıktan sonra ekspresyon çalışmaları yapıldı. Klonlanan lipaz genleri, lipaz enzim aktivitesi yönünden değerlendirildi. Bu çalışmalarda, ön kültür için 2 ml LB+ampisilinli besi yeri, klonların -20 °C stokları ile % 1 oranında aşılansak gece boyu 37 °C'ta, 175 rpm'de inkübe edildi. Ana kültür çalışması büyüme koşulları korunarak 500 ml'lik erlenlerde yapıldı. Çalışma süresince hücre büyümesi takip edilerek OD₆₀₀ değerinin 0.6-0.8'e ulaştığı evrede, uyarımlı çalışılan grup 0.1 mM IPTG ile uyarıldı. Belirlenen saatlerde alınan örneklerde hücre içi ve hücre dışı aktivite testleri yapıldı. Aktivite testi Bölüm 2.2.9'da anlatıldığı gibi uygulandı. Yapılan hücre dışı aktivite testleri klonların, enzimi besi yeri ortamına salgılayabildiğini gösterdi. Ayrıca hücre içi aktivite de azımsanmayacak ölçüde yüksek bulundu. Alınan sonuçlar ışığında, ilgili lipaz genlerinin bir ekspresyon vektörüne alt klonlanmasına karar verildi.

2.2.8. Lipaz Genlerinin pUC19 Vektörüne Alt Klonlanması ve Ekspresyon Çalışmaları

Doktora tez çalışması kapsamında yapılan klonlama çalışmalarında “InsTAclone PCR Cloning kit (Fermentas)” ile çalışıldı ve başarılı sonuçlar alındı. Bu aşamayı takiben lipaz genlerinin pUC19 vektörüne alt klonlama çalışmaları yapıldı. Önceki çalışmalarda 12 farklı yerel *Bacillus* izolatından hareketle pTZ57R/T vektörüne klonlanan ve 10 tanesi bu vektör üzerinde ifade edilen lipaz genlerinin pUC19 (2.7 kb) ekspresyon vektörüne alt klonlaması denendi. Alt klonlama çalışmalarının ilk basamağında plazmit izolasyon çalışmaları yer aldı. Farklı plazmit izolasyon yöntemleri denendi ve en iyi verim, STET yöntemi ile elde edildi. Plazmit izolasyonu için; -20 °C hücre stoklarından 10 µl alınarak ampisilin içeren 10 ml LB besi yerine aşılansak hücreler gece boyu 37 °C'ta 175 rpm hızla çalkalanarak büyütüldü. Elde edilen kültürlerden STET yöntemi ile izole edilen plazmitler % 1 agaroz jelde kontrol edildi. Klonlama çalışmaları için, pTZ plazmitlerinden elde edilen *Hind*III-*Eco*RI fragmanları, aynı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi

ve pUC19 ekspresyon vektörüne ayrı ayrı alt klonlandı. Plazmitlerin ve pUC19 vektörünün kesim protokolü Tablo 2.8’de yer almaktadır.

Tablo 2.8. Alt klonlama çalışmalarında kullanılan RE kesim protokolü.

Lipaz genlerini taşıyan plazmitlerin RE ile kesim protokolü	Restriksiyon enzimleri ile pUC19 vektörü için kesim protokolü
1X tampon	30 µg pUC19
4U RE <i>Hind</i> III/µg DNA	4U RE <i>Hind</i> III/µg DNA
4U RE <i>Eco</i> RI/µg DNA	4U RE <i>Eco</i> RI/µg DNA
15 µg plazmit DNA	1X tampon
Toplam hacim 100 µl	Toplam hacim 100 µl

Kesim çalışmasında 15 µg plazmit DNA, mikrogram başına 4U restriksiyon enzimi kullanılarak 1.5 saat 37 °C’ta kesime alındı. Ayrıca bu süreye ek olarak 15 dakika DNase’den arındırılmış RNase (0.25 µg/µl) uygulandı.

Kesim sonrasında örnekler, asetat-alkol çöktürmesinin ardından uygun hacimlerde çözülerek izole edilmek üzere % 1 agaroz jele yüklendi. “Promega PCR clean-up and gel isolation kit” kullanılarak jelden geri kazanılan örnekler miktar tayini yapıldıktan sonra ligasyon basamağına geçildi.

İlgili restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek jelden izole edilen pUC19 plazmiti klonlama vektörü olarak kullanıldı. Ligasyon basamağında vektör:fragman oranı; pUC19 için 1:1 ve 1:7 pikomoldür. 37 °C’ta 10 dakika ve 0 °C’ta 10 dakika inkübe edilen örnekler son olarak 1U ligaz eklenerek 0 °C’ta 30 dakika bekletildi ve ligasyon gece boyu 16 °C’ta devam ettirildi. Enzimin inaktivasyonu 70 °C’ta 10 dakikada gerçekleştirildi. Bir sonraki basamakta TSS yöntemi ile hazırlanan *E. coli* JM109 kompetan hücreleri ligasyon materyali ile transforme edildi. Örnekler, LB+ampisilinli agar petrilere yayılarak, 37 °C’ta gece boyu inkübe edildi.

Transformasyon sonucunda elde edilen koloniler, ampicilin içeren LB besi yerinde 10 ml hacimde büyütülerek, plazmit izolasyonları STET yöntemiyle yapıldı. İzolasyon sonrası plazmit DNA'lar ilgili restriksiyon endonükleaz (*Hind*III ve *Eco*RI) enzimleri ile kesildi ve agaroz jelde değerlendirildi.

Restriksiyon enzimleri ile plazmit kesim protokolü-

1X tampon

4U RE / μ g DNA

5 μ g plazmit

Toplam hacim 50 μ l

Kesimler 37 °C'ta 1.5 saat süreyle gerçekleştirildi, bu süreye ek olarak 15 dakika RNase uygulaması yapıldı. Kesim sonrası sodyum asetat-alkol çöktürmesi yapılan örnekler kurutulduktan sonra uygun miktarda dH₂O ile çözülerek % 1 agaroz jelde yürütüldü ve DNA parça büyüklükleri belirteç eşliğinde değerlendirildi. Yapılan alt klonlama çalışmasına alınan 10 ayrı *Bacillus* soyundan köken alan lipaz genleri, pUC19 vektörüne klonlandı. pUC19 vektörüne yapılan alt klonlama sonucu elde edilen plazmitlerin ilgili restriksiyon enzimleri ile kesim profilleri ve 0.65 kb'lık parça büyüklükleri agaroz jelde doğrulandı.

2.2.8.1. pUC19 Vektörüne Yapılan Alt Klonlama Sonucunda Elde Edilen Klonlarda Ekspresyon Çalışması

pUC19 vektörüne klonlanan ve parça büyüklükleri doğrulanan örnekler, lipaz aktivitesi yönünden irdelenmek üzere ekspresyon çalışmasına alındı. Rekombinant vektörleri taşıyan *E. coli* JM109 hücreleri ön kültür hazırlığı için, 2 ml LB+ampicilinli besi yeri, örneklerin -20 °C hücre stokları ile % 1 oranında aşılansak gece boyu 37 °C'ta, 175 rpm'de inkübe edilerek, 16 saat süreyle ampicilin (100 μ g/ml) içeren LB besi yerinde büyütüldü. Ana kültür çalışması büyüme koşulları korunarak ampicilin içeren taze LB besi yerinin, ön kültür ile % 1 oranında aşılmasıyla başlatıldı. Çalışma süresince hücre büyümesi takip edilerek, kültür

OD₆₀₀ değerinin 0.6-0.8'e ulaştığı evrede, 0.1 mM IPTG ile uyarıldı. Belirlenen saatlerde alınan örneklerde hücre dışı ve hücre içi aktivite testleri yapıldı. Gen ekspresyonu 0.1 mM final IPTG ile uyarılarak, inkübasyon 37 °C'ta 175 rpm çalkalama hızı ile 24 saat süreyle izlendi. Hücre içinden alınan örneklerle yapılan lipaz aktivite testlerinde kayda değer bir aktivite bulunamadı. Yapılan hücre dışı aktivite testleri klonlanan soyların, enzimi besi yeri ortamına salgılayabildiğini gösterdi, bu ileride yapılacak yönlendirilmiş evrim çalışmalarını takiben yapılacak klonlama ve ekspresyon çalışmaları için oldukça iyi bir sonuç olarak değerlendirildi. Bu durum, mutant kütüphaneden elde edilen varyantların, enzim aktivitesi yönünden taranmasının elverişli hale gelmesinin ifadesidir.

2.2.9. Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipaz aktivitesi sentetik bir substrat olan paranitrofenil palmitatın kullanıldığı, spektrofotometrik bir yöntemle belirlendi (Winkler ve Stuckmann, 1979).

1U Enzim

Verilmiş reaksiyon koşullarında (37 °C, pH 8.0), para-nitrofenil palmitattan bir dakikada, 1 µmol pNP (para-nitrofenol) oluşturan enzim miktarı 1U olarak tanımlandı.

2.2.9.1. Aktivite Testi

- 100 µl örnek eppendorf tüpüne alınarak üzerine 800 µl 0.1 M K-fosfat, pH 8.0 tamponu eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Gerektiğinde, teste alınan örnek miktarı spektrofotometrenin sağlıklı okuma aralığının içinde bir değer okuyacak şekilde değiştirilebilir.
- 37 °C'ta 3 dakika ön inkübasyon yapıldı.

- 100 µl 8 mM pNPP içeren substrat çözeltisi eklenerek karıştırıldı.
- 37 °C'ta 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 30 dakika sonunda eppendorf tüplerine 0.5 ml 3 M HCl çözeltisi eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.
- 13.500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda elde edilen üst sıvının 333 µl l'si, 1 ml 2 M NaOH çözeltisine eklenerek vorteks ile karıştırıldı.
- Spektrofotometrede A_{405} değeri, aynı koşullarda inkübe edilen, 900 µl 0.1 M K-fosfat, pH 8.0 tamponu ve 100 µl substrat çözeltisi içeren köre karşı okundu (Biorad Smart Spec 3000, USA) (Lesuisse ve ark., 1993).

Aktivitede Kullanılan Çözeltiler

Tampon Çözelti

% 0.1 arabik gum

% 0.2 deoksikolik asit

0.1 M K-fosfat pH 8.0 tamponu içinde çözülerek hazırlanır.

Substrat Çözeltisi

8 mM pNPP çözeltisi; 3 mg pNPP (para-nitrofenil palmitat) 1 ml izopropanol içinde vorteksle çözülerek hazırlanır. Substrat olarak kullanılan pNPP çözeltisinin şeffaf olan görüntüsünün zaman içinde sarı renge dönmesinden kaynaklanabilecek hataları engellemek üzere substratın her kullanım öncesinde taze olarak hazırlanmasına özen gösterilir.

3 M HCl Çözeltisi

62 ml HCl, distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

2 M NaOH Çözeltisi

16 gram NaOH, 200 ml distile su içinde çözülerek hazırlanır.

Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

0.1 mg/ml pNP (para-nitrofenol) çözeltisi; 0.1 mg pNP 0.1 M K-fosfat, pH 8.0 tamponu içinde çözülür. Deney tüpleri iki set halinde hazırlanır ve her sette 1'den 6'ya kadar numaralandırılan (Birinci tüp kör olarak alındı) tüplere sırasıyla 0, 25, 50, 75, 100 ve 125 µl pNP çözeltisi konulur. Tüplerdeki örnekler, 0.1 M K-fosfat, pH 8.0 tamponu ile 1333 µl'ye tamamlanır. Daha sonra spektrofotometrede her tüpteki örneğin OD₄₀₅ değeri ölçülür. İki setin değerlerinin ortalaması alınarak kalibrasyon eğrisi çizilir ve eğrinin eğimi hesaplanır. Elde edilen eğim değeri lipaz aktivitesinin hesaplanmasında kullanılır.

Lipaz aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{Aktivite} = \frac{\text{Eğim} \times \frac{A_{405} \times 1000}{M.A_{pNP}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon Zamanı (dakika)}}$$

Reaksiyon Hacmi: 1 ml

Enzim Hacmi: 0.1 ml

Reaksiyon Süresi: 30 dakika

M.A_{pNP}: 139.1g/mol

Eğim: 0.0805

2.2.10. Yönlendirilmiş Evrim Çalışmaları

Tez çalışmasında; yönlendirilmiş evrim yaklaşımlarından biri olan “DNA shuffling” DNA karıştırma yöntemi ile oluşturulan mutant kütüphaneler, artan enzim aktivitesi yönünden tarandı. DNA karıştırma deneyleri kapsamında birçok optimizasyon çalışması yapıldı. İlk aşamada plazmit izolasyonu STET yöntemi ile yapıldı, izole edilen plazmit DNA’lar ilgili restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilip alkol-asetat çöktürmesine alındı. Örnekler çöktürülüp kurutulduktan sonra 15 µl ddH₂O içinde çözülerek, 3 µl 6x boya eklendi ve % 1.2’lik agaroz jele yüklendi. Elektroforezi takiben ilgili bantlar jelden kesilerek alındı ve “Promega Wizard SV Gel and PCR clean-up system” kullanılarak izolasyon tamamlandı. Jel izolasyonunun ardından DNase I ile kesime gidildi. Bu basamağa kadar olan bölümdeki en büyük sorun, jelden geri kazanılan DNA miktarının, RE kesimine alınan DNA miktarına görece oldukça düşük olmasıydı. Bir sonraki aşama olan DNase I kesim sürecinde farklı DNA ve enzim konsantrasyonlarının yanı sıra kesim sıcaklığı ve sürelerde de optimizasyon çalışmalarına gidildi. Tüm bu optimizasyon çalışmaları için yüksek konsantrasyonda DNA’ya gereksinim duyulması, RE kesimi sonrası elde edilen DNA miktarının oldukça düşük olması nedeniyle, DNase I kesim aşamasında yeterince deneme yapılamadığı için, plazmit DNA yerine PCR ürünüyle çalışılmasına karar verildi.

2.2.10.1. DNA Karıştırma Kütüphane Hazırlığı

Bu tez çalışmasında rastgele fragmanların oluşturulması için yapılan DNase I kesimi, Mn²⁺ varlığında gerçekleştirildi (Lorimer ve Pastan, 1995). DNA karıştırma basamağında Stemmer metodu izlendi (Stemmer, 1994). Primersiz PCR “Self-reassembling PCR” ürünü dilue edilerek, tam boy PCR ürününün elde edileceği PCR çalışmasında kalıp olarak kullanıldı (Zhao ve Arnold, 1997). DNA karıştırma çalışmalarında, 10 farklı klon arasında farklı kombinasyonlar yapılarak, varyant havuzunun çeşitliliği artırılmaya çalışıldı. Çalışmalar 0.65 kb’lik parça taşıyan 9 adet *B. pumilus* ve 1 adet *B. subtilis* klonu ile, Primer 21-22 ve Primer 20-22 olmak üzere 2 çift primer seti kullanılarak yapıldı.

2.2.10.2. Plazmit İzolasyonu ve Plazmit Üzerinden Gen Çoğaltımı

Plazmit izolasyonu için -20 °C hücre stoklarından 10 µl alınarak ampisilin içeren 10 ml LB besi yerine ekilen kültürler gece boyu 37 °C'ta 175 rpm hızla çalkalanarak büyütüldü. Elde edilen kültürlerden STET yöntemi ile plazmit izolasyonu yapılarak % 1 agaroz jelde kontrol edildi. *lip* genlerini içeren 0.65 kb'lik DNA fragmanları, *B. pumilus* klonlarından 21F ve 22R, *B. subtilis* klonundan 20F ve 22R primerleri kullanılarak çoğaltıldı. İzole edilen plazmit DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR ile lipaz genleri çoğaltıldı. PCR koşulları Tablo 2.9'da yer almaktadır.

Tablo 2.9. Plazmit DNA üzerinden gen çoğaltım koşulları.

Plazmit üzerinden gen çoğaltım PCR koşulları	PCR programı
1X PCR buffer	
40 ng plazmit	95 °C 5'
160 ng primer (Primer 20F, 21F ve 22R)	94 °C 1'
200 µM dNTP	55 °C 1'
3 mM MgCl ₂	72 °C 1.5'
0.9 U/tüp <i>Taq</i> DNA polimeraz	72 °C 10'
Final hacim 25 µl	

PCR reaksiyonundan sonra elde edilen 0.65 kb büyüklüğündeki fragmanlar “Promega Wizard SV Gel and PCR clean-up system” (Bölüm 2.2.4.1) kullanılarak % 1 agaroz jelden geri kazanıldı. Bir sonraki aşamada ebeveyn DNA fragmanları Mn²⁺ varlığında DNase I ile kesildi.

2.2.10.3. DNase I ile Kesim

DNase I enzimi ile kesim aşamasında çeşitli optimizasyon çalışmaları yapıldı. Her bir ebeveyn DNA için, 1 ve 2 µg olmak üzere farklı DNA miktarları, 0.3 U, 0.45 U ve 0.6 U DNase I gibi farklı enzim konsantrasyonları, 15 °C, 20 °C ve 25 °C olmak üzere farklı inkübasyon (DNase I) sıcaklıkları ve 2, 5, 7 ve 11 dakika olmak üzere de farklı kesim süreleri kullanıldı. Bu çalışma kapsamında klonlar ilgili primerlerle çoğaltıldıktan sonra DNase I kesimi uygulandı. Her klon özelinde 1.5 µg DNA, 0.45 U DNase I enzimi ile aşağıdaki koşullarda kesime alındı.

DNase I Kesim koşulları:

1x 50 mM Tris-HCl pH 7.5

10 mM MnCl₂

1.5 µg DNA (her bir ebeveyn DNA için)

0.45 U DNase I

Final hacim: 50 µl

İlgili DNA'ların, reaksiyon tamponunun ve manganın yer aldığı reaksiyon karışımı 25 °C'ta 5 dakika süreyle ön inkübasyona alındı. Ardından 0.45 U DNase I (10 U/ µl) eklenerek 25 °C'ta 11 dakika süreyle kesime bırakıldı. Kesim sonrası 90 °C'ta 10 dakika süreyle inaktivasyon yapıldı. İnaktivasyon sonrası örnekler sodyum asetat-alkol çöktürmesine alındı. Örnekler kurutulup 10 µl ddH₂O içinde çözülerek, 2 µl 6x boya eklendi ve izolasyon amacıyla % 1.5'lik agaroz jele yüklenerek, kesilen fragmanlar jel elektroforez yöntemiyle bir DNA belirteci eşliğinde yürütüldü. Jelde oluşan "semear"ın 70 bç ve altındaki fragmanlar, küçük parçaların izolasyonu için özelleşmiş olan Qiagen "Qiaex II gel extraction kit" ile jelden izole edildi.

"Qiaex II gel extraction kit" Protokolü

- Elektroforez sonrası kesilen DNA parçası 1.5 ml eppendorf tüpe alınarak tartıldı.
- <100 bç DNA fragmanları için 1 hacim jele, 6 hacim QX1 solüsyonu eklendi.

- QIAEX II solüsyonu 30 saniye süre vortekslendikten sonra, eppendorf tüpüne 10 µl eklendi.
- 50 °C'ta 10 dakika süreyle agaroz jelin çözünmesi ve DNA'nın bağlanması için tutuldu. Her iki dakika da bir vortekslenerek QIAEX solüsyonu süspansiyon halinde korundu ve rengin sarı olduğundan emin olundu.
- Örnek 30 saniye süreyle santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelet 500 µl 'Buffer QX1' ile vortekslenerek yıkandı, 30 saniye santrifüjlenerek süpernatant pipetle uzaklaştırıldı, böylece kalan agaroz parçaları uzaklaştırılmış oldu.
- Pelet 500 µl 'Buffer PE' ile vortekslenerek iki kez yıkandı. 30 saniye santrifüjlenerek süpernatant pipetle uzaklaştırıldı, böylece kalan tuzlardan arındırılmış oldu.
- Pelet kuruyup beyaz renge dönüşünceye kadar havaya maruz bırakıldı.
- DNA elüsyonu için 20 µl H₂O eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- 30 saniye santrifüjün ardından süpernatant yeni bir tüpe alındı.
- Verimi % 10-15 oranında artırmak için son iki basamak tekrar edildi.

2.2.10.4. DNA karıştırma I. PCR (primersiz PCR)

DNase I kesimi sonucunda elde edilen ürün jelden izole edildikten sonra tamamı kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (jel izolasyonu sonucunda elde edilen toplam miktar 20 µl). DNA karıştırma 1. PCR aşamasında, DNase I kesimi sonrası oluşan fragmanlar primersiz bir PCR ile birleştirilmektedir. Bu aşamada *Pfu* polimeraz enzimi kullanıldı. Kullanılan PCR koşulları Tablo 2.10'da yer almaktadır.

Tablo 2.10. DNA karıştırma I. PCR koşulları.

PCR koşulları	PCR Program
20 µl saflaştırılmış fragman	96 °C'ta 3'
1x <i>Pfu</i> polimeraz reaksiyon tamponu	94 °C'ta 1'
0.4 mM dNTP	55 °C'ta 1'
2.5 U/tüp <i>Pfu</i> polimeraz	72 °C'ta 1'+5sn./döngü
Final hacim: 50 µl	72 °C'ta 10'

2.2.10.5. DNA Karıştırma II. PCR (Primerli PCR)

Fragmanların birleştirilmesini hedefleyen DNA karıştırma 1. PCR sonrası, elde edilen ürünün kullanıldığı primerli bir PCR reaksiyonu yapıldı.

Tablo 2.11. DNA karıştırma II. PCR koşulları.

PCR koşulları	PCR Program
1 µl PCR I ürünü	96 °C'ta 3'
80 pmol primer	94 °C'ta 1'
1x <i>Taq</i> buffer	55 °C'ta 1'
0.2 mM dNTP	72 °C'ta 1'+5sn./döngü
2.5 U/tüp <i>Taq</i> / <i>Pfu</i> polimeraz (1:1)	72 °C'ta 10'
Final hacim: 50 µl	

Yapılan bu 2. PCR sonucunda tam boy ürün elde edildi. PCR koşulları Tablo 2.11'de yer almaktadır. Çalışmada *Taq* ve *Pfu* polimeraz enzimleri birlikte kullanılmıştır. Primerli PCR aşamasında 21F-22R (*B. pumilus*) ve 20F-22R (*B. subtilis*) primer çiftleri kullanıldı. Bu primer çiftleri ile Tablo 2.11'de verilen

koşullarda tam boy PCR ürünleri (0.65 kb) elde edildi. PCR reaksiyonu sonrası örnekler agaroz jelde görüntülendi.

İkinci PCR sonunda elde edilen 0.65 kb'lık tam boy PCR ürünü, klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere daha fazla ürün elde etmek amacıyla toplu üretime alındı. Yapılan toplu PCR üretimi sonrası örnekler sodyum asetat-alkol çöktürmesi uygulandı. Kurutulup çözüldükten sonra agaroz jele yüklenen örnekler, jelden izole edildi. İzolasyonda “Promega Wizard SV Gel and PCR clean-up system” kiti kullanıldı. İzolasyon sonrası agaroz jelde miktar tayini yapıldı.

2.2.10.6. RE ile Kesim ve Örneklerin “clean-up” Kitinden Geçirilmesi

Toplu üretilip jelden izole edilen doğru büyüklükteki tam boy 0.65 kb büyüklüğündeki DNA karıştırma PCR II ürünleri, miktar tayini yapıldıktan sonra *HindIII-EcoRI* restriksiyon enzimleri ile kesime alındı. Restriksiyon endonükleaz kesiminde, 1 µg DNA için 4U enzim kullanıldı. Kesimler 37 °C'ta bir saat süreyle gerçekleştirildi. Kesim sonrası örnekler yine sodyum asetat-alkol çöktürmesine alındı ve sonrasında kurutularak çözüldü. Elde edilen ürün Promega PCR “clean-up” kit kullanılarak, reaksiyonda kullanılmadan artan nükleotit ve primerler temizlendi. Örnekler yine agaroz jele yüklenerek miktar tayinleri yapıldı.

2.2.10.7. Klonlama Vektörünün Hazırlanması, Ligasyon ve Transformasyon

Toplu üretilip, jelden izole edilen ve ilgili RE ile kesildikten sonra, kit aracılığıyla temizlenen örnek, mutant kütüphane oluşturmak amacı ile klonlandı. Klonlama vektörü olarak, daha önce alt klonlama çalışmalarında kullanılan ve ekspresyon çalışmalarında oldukça iyi verim alınan pUC19 vektörü kullanıldı. 30 µg pUC19, 4 U/µg restriksiyon endonükleazı (*EcoRI* ve *HindIII*) kullanılarak 1.5 saat süreyle 37 °C'ta kesime alındı. Ayrıca bu süreye ek olarak 15 dakika RNase uygulaması yapıldı. Kesim sonrası sodyum asetat-alkol çöktürmesinin ardından

uygun hacimde çözülerek jelden izole edilmek üzere % 1 agaroz jele yüklendi. Bölüm 2.2.4.1’de anlatıldığı gibi “Promega PCR clean-up and gel isolation kit” kullanılarak jelden geri kazanılan pUC19 vektörü için miktar tayini yapıldıktan sonra ligasyon basamağına geçildi.

Ligasyon protokolü

150 ng vektör (pUC19)

0.42 pmol “insert”

1U T4 DNA ligaz

0.5 mM ATP

1X T4 DNA ligaz tamponu

Gece boyu 16 °C’ta sürdürülen ligasyon reaksiyonu, tüplerin 70 °C’ta su banyosunda 15’ bekletilmesi ile sonlandırıldı ve TSS yöntemi ile hazırlanan *E. coli* JM109 kompetan hücreleri ligasyon materyali ile transforme edildi. Hücreler % 1 ampisilin içeren LB agar petrilere yayılarak gece boyu 37 °C’ta inkübe edildi. Yapılan tüm DNA karıştırma çalışmaları kapsamında toplam 10.000 koloni elde edildi. 10.000 koloni, üç farklı basamağın kullanıldığı tarama aşamasında lipaz aktivitesindeki artış yönünden incelendi.

2.2.10.8. Mutant Kütüphanelerin Taranması ve Enzim Ekspresyonu

Yönlendirilmiş evrimin ikinci basamağını, geliştirilen mutantların taranması/seçilmesi oluşturur. Yönlendirilmiş evrim deneylerinde uygun tarama ve seçme yöntemlerinin geliştirilmesi sınırlayıcı bir basamaktır. Tez çalışması kapsamında elde edilen kütüphanedeki aktif mutantlar, üç basamaklı tarama yöntemiyle belirlendi. İlk tarama basamağı “tributyrim agar” petrilinde, ikinci basamak ise 96-kuyulu mikropalakada gerçekleştirildi. Son basamakta pozitif aktivite veren örnekler erlende ekspresyon çalışmasına alındı. Mutant kütüphane, aktivite artışını baz alarak tarandı.

Tribütirin agar plaklarında seçim

1. aşamada aktif lipaz proteinlerini eksprese eden bütün mutantlar, transformasyon petrilerinden alınan kolonilerin, tribütirin agar petrilerinde verdiği berrak halolarla tanımlandı. Tribütirin agar petrilerinin içeriği, 1.5 g/l Arabic gum, 15 v/l Tribütirin, 10 g/l Nutrient broth, 5 g/l Maya özütü, 8 g/l NaCl, 15 g/l Agar'dan oluşmaktadır. Bu karışım dijital sonikatör aracılığıyla homojenize edildi (2 dakika, % 90 amplitude) ve otoklavlandı (Liebeton ve ark., 2000). Petrilere dökülmeden önce % 1 ampisilin eklendi. Transformanlar bu petrilere aktararak 37 °C'ta 16 saat süreyle inkübe edildi ve kolonilerin etrafında enzim salınımını gözlemlemek için 6 saat süreyle 4 °C'ta bekletildi. Çevresinde berrak halo gözlenen varyantlar daha ileri analizler için ikinci basamak tarama yöntemine alındı.

Mikroplaka okuyucu ile yapılan seçim

2. aşamada, tribütirin agar petrilerinde yüksek aktivite gösteren varyantlar, “master” petrilerinden % 1 ampisilinli 250 µl LB içeren 96-kuyulu mikroplakalara inoküle edildi. 37 °C'ta gece boyu büyütülen hücreler ertesi gün 4 °C'ta 5000 x g'de 30 dakika süreyle santrifüj (rotor S5700, Allegra 25R Beckman, USA) edildi ve kültür süpernatanı aktivite testinde kullanıldı. Lipaz aktivitesi pNPP'nin substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (Eom ve ark., 2005). Ölçülen aktivite, kültür yoğunluğu için normalize edildi. Aktivite tamponu 8 mM pNPP ve v:v:v/1:4:95 oranında asetonitril/etanol/tris tampondan oluşmaktadır. 0.003 g pNPP tartılarak 1 ml asetonitril içinde çözüldü. Karışıma 4 ml etanol ve 95 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 tamponu eklenerek karıştırıldı. 100 ml aktivite tamponu ile yaklaşık 500 test yapılabilir. Aktivite testi için 50 µl hücre üst sıvısı mikroplaka okuyucunun kuyularına dağıtıldı ve her bir örneğe 200 µl aktivite tamponu eklenerek 37 °C'ta 30 dakika inkübe edildi. A₄₀₅ değeri mikroplaka okuyucuda (BMG Labtech, Fluostar Omega, Germany) değerlendirildi.

Erlende ekspresyon çalışmasıyla aktivitenin ölçülmesi

Ebeveynlerden yüksek aktivite gösteren mutantlar, aktivitenin doğrulanması için 3. tarama basamağı olan erlen çalışmasına alındı. % 1 ampisilin içeren 10 ml LB besi yeri, önceki gün büyümeye alınan ön kültür ile aşılandı. Gen ekspresyonu 0.1 mM final IPTG ile uyarıldı. Belirli saatlerde örnek alınarak aktivite testleri yapıldı. Normalize edilen lipaz aktivitesi *p*-nitrofenil palmitat'ın substrat olarak kullanıldığı aktivite testi ile Bölüm 2.2.9.1'de anlatıldığı gibi spektrofotometrik olarak ölçüldü.

2.2.10.9. Dizi Analizi Çalışmalarıyla Varyant Dizilerinin Belirlenmesi

Yapılan DNA karıştırma çalışmalarının doğrulanması ve varyantların sahip olduğu DNA dizisinin belirlenmesi amacıyla, Bölüm 2.2.6'da anlatıldığı gibi analiz için örnekler hazırlandı ve nükleotit dizisi, CEQ 8000 otomatik dizi analiz sistemi kullanılarak belirlendi.

Yapılan tarama çalışmaları ve dizi analizlerinin sonunda, lipaz enzim aktivitesi yönünden ön plana çıkan, L5 ve L21 ebeveyn lipazlarından DNA karıştırma yöntemiyle elde edilen L3-3 varyantı ve ebeveyn enzimler saflaştırma ve nitelendirme çalışmalarına alınarak, yapıda meydana gelen değişikliklerin enzim aktivitesi üzerine olan etkileri biyokimyasal yönden irdelendi.

2.2.11. Enzim Saflaştırma Çalışmaları

2.2.11.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Tez çalışması kapsamında, rekombinant ebeveyn lipaz enzimleri ve bunlardan türetilen iyileştirilmiş varyant saflaştırma çalışmasına alındı. Öncelikle LB besi yerinde büyütülen kültürler (toplam 2 lt) 4 °C'ta 7000 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi (TA-10 rotor, Beckman Coulter, USA). Kültür süpernatanı Whatman No. 3 filtre kağıdından süzüldü. Süzülen üst sıvı tek basamakta yapılacak çöktürme

işlemi için, % 80 amonyum sülfat ile 4 °C'ta gece boyu karıştırılarak çöktürmeye bırakıldı. Ertesi gün bu karışım, iki eşit parçaya bölünerek, 4 °C'ta 10000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen üst sıvılar ayrılarak, peletler -20 °C'ta saklandı. Kültür üst sıvısının toplanmasından bu aşamaya kadar olan her basamakta enzim aktivitesi ve protein miktarı belirlendi. Enzim aktivitesi Bölüm 2.2.9'da, protein miktar tayini Bölüm 2.2.11.4'te anlatıldığı gibi yapıldı.

2.2.11.2. Kromatografi Çalışmaları

Çöktürme sonrası amonyum sülfat peleti, kolon tamponu olan 50 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8.0) çözüldü. Enzim solüsyonu aynı tamponda gece boyu diyalize bırakıldı. Çözünmeyen materyaller öncelikle 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, ardından 0.45 µm'lik filtreden (Sartorius minisart, Goettingen, Germany) geçirilerek uzaklaştırıldı. Hazırlanan enzim solüsyonu önceden 50 mM Tris-HCl tampon (pH 8.0) ile dengelenmiş iyon değişim kromatografi kolonuna HiPrep Q FF 16/10 (GE Healthcare, Sweden) yüklenerak, AKTA saflaştırma sistemi (GE, Healthcare, Sweden) kullanılarak saflaştırıldı. Enzim elusyonu kolon tamponuna eklenen 0-1 M NaCl lineer gradyanı ile yapıldı. Enzim aktivitesi Bölüm 2.2.9'da anlatıldığı gibi tayin edildi. Yüksek lipaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar toplanarak havuz oluşturuldu. Protein konsantrasyonu, BSA'nın standart olarak kullanıldığı Bradford yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Saflaştırılan lipaz enziminin moleküler kütlesi SDS-PAGE (% 12) yöntemiyle belirlendi. Jeller "Commasie Brilliant Blue R-250" boyasıyla boyanarak görüntülendi.

2.2.11.3. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Saflaştırılan enzimlerin moleküler ağırlıkları Laemmli tarafından tanımlanan SDS-PAGE (% 12) ile belirlenmiştir (Laemmli, 1970). SDS-PAGE jeli, Tablo 2.12'de içeriği verilen, ayırma (alt jel) ve derişim jeli (üst jel) olmak üzere iki farklı jelden oluşmaktadır.

Tablo 2.12. SDS-PAGE jel içeriği.

Ayırma Jeli (Alt Jel)	Derişim Jeli (Üst Jel)
- 750 µl dH ₂ O - 3750 µl 0,75 M Tris HCl, pH: 8.8 / % 0.2 SDS - 3 ml Akrilamit/ Bisakrilamit (30:1) - 90 µl %10 APS - 6 µl TEMED	- 1050 µl dH ₂ O - 1500 µl 0,25 M Tris HCl, pH: 6.8 / % 0.2 SDS - 390 µl Akrilamit/Bisakrilamit (30:1) - 60 µl % 10 APS - 3 µl TEMED

Örneklerin Hazırlanması

SDS-PAGE analizi için örnekler (15 µl) ve yükleme tamponu (5 µl), 5 dakika süreyle kaynatılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler, kuyucuklara yüklendikten sonra cam plakları taşıyan kaset, 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankı içine yerleştirildi. Jele belirteç olarak, Fermentas “PAGE ruler” yüklendi. Yürütme işlemi, örnekler ayırma jeline geçene kadar 100 V’ta, geçtikten sonra 200 V’ta gerçekleştirildi ve elektroforezin ardından boyama çözeltisinde bekletildi. Sonrasında arıtma çözeltisine alınarak boyanın açılması sağlandı.

Yükleme Tamponu: 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, % 1 SDS, 2 mM EDTA, % 1 β-merkaptoetanol, % 10 gliserol, % 0.002 Bromofenol blue.

5X SDS-PAGE yürütme tamponu: 15 g Tris baz, 72 g Glisin ve 5 g SDS, distile su ile 1 litreye tamamlandı ve pH 8.3’e ayarlandı.

Boyama Çözeltisi: 100 ml % 10 asetik asit, 100 ml % 95’lik alkolde çözülmüş % 0.25 Coomassie Blue ile hazırlandı.

Arıtma Çözeltisi: % 5 asetik asit, % 50 etanol ile hazırlandı.

2.2.11.4. Bradford Testi ile Protein Miktarının Belirlenmesi

‘Dye Binding’olarak da isimlendirilen Bradford yönteminde, boya olarak Coomasie Blue G-250 kullanılmaktadır (Bradford, 1976). Coomassie Blue G-250, asit içinde çözüldüğünde kırmızı-kahverengi bir renk oluşturmaktadır. Boyanın pozitif yüklü proteinlere bağlanması sonucunda ortaya çıkan mavi renk, 595 nm dalga boyunda ölçülerek, protein miktarının belirlenmesinde kullanılır (Scopes, 1994).

Tez çalışması kapsamında belirlenen miktardaki enzim örneği eppendorf tüplerine alındı, distile su ile 800 µl’ye tamamlandı. 200 µl Coomassie Blue G-250 eklenen örnekler, alt üst edilerek iyice karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda, protein içermeyen köre karşı okundu.

Bradford analizi için kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında, sığır serum albumini (BSA) standart olarak kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi, konsantrasyonu 2-10 µg aralığında olan BSA miktarları kullanılarak hazırlandı. Bütün tüplere 200 µl Bradford boyası eklendikten sonra spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Elde edilen A_{595} değerlerinin, BSA miktarına karşı yerleştirilmesi ile çizilen grafikten elde edilen eğim, protein miktarının hesaplanmasında kullanıldı.

Toplam protein miktarı: $A_{595} / \text{Eğim} / \text{örnek hacmi (µl)}$ şeklinde hesaplanır.

2.2.11.5. Enzim Nitelendirme Çalışmaları

Kısmen saflaştırılmış, iki ebeveyn ve bir varyant lipazının sahip olduğu özelliklerin belirlenmesi amacıyla nitelendirme çalışmaları yapıldı. Nitelendirme çalışmalarında en iyi aktivitenin alındığı ve göreceli saf bir kesimi içeren “Havuz 1” ile çalışıldı. Bütün karakterizasyon çalışmaları 3 set yapılarak değerlendirildi.

Saflaştırılan lipaz enzimlerinin optimal sıcaklığını belirleme deneyleri 5-55 °C aralığındaki sıcaklıklarda ve 100 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tamponu kullanılarak, bölüm 2.2.9’da anlatıldığı gibi standart aktivite testi uygulandı. Belirlenen optimal reaksiyon sıcaklığı (37 °C), bundan sonra yapılan tüm aktivite testlerinde kullanıldı.

Lipaz enzimlerinin optimal reaksiyon pH’sı, 37 °C’ta farklı pH değerlerindeki (4.0-11.0) 100 mM tamponlar kullanılarak tayin edildi. Kullanılan tamponlar; sodyum asetat tamponu (pH 4.0-6.0), potasyum fosfat tamponu (pH 7.0-8.0) ve glisin-NaOH tamponu (pH 9.0-11.0) şeklindedir.

Sodyum asetat- asetik asit tamponu (pH 4.0-6.0)

200 mM sodyum asetat ve 200 mM asetik asit hazırlanır. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH ayarlanır, 50 ml alınarak dH₂O ile 100 ml’ye tamamlanır.

Fosfat tamponu (pH 7.0-8.0)

200 mM K₂HPO₄ ve 200 mM KH₂PO₄ hazırlanır. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH ayarlanır, 50 ml alınarak dH₂O ile 100 ml’ye tamamlanır.

Glisin-NaOH (pH 9.0-11.0)

200 mM Tris ve 200 mM NaOH hazırlanır. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH ayarlanır, 50 ml alınarak dH₂O ile 100 ml’ye tamamlanır.

Farklı pH aralığındaki tamponlarda ve 37 °C’ta standart aktivite testi yapılarak enzimlerin optimal reaksiyon pH’sı 8.0 olarak belirlendi. Bu aşamadan sonra yapılan nitelendirme testlerinde optimal pH değerindeki tampon kullanıldı.

Sıcaklık kararlılığının belirlenmesinde de yine aynı sıcaklık aralığı (5-55 °C) ve 100 mM potasyum fosfat, pH 8.0 tampon kullanıldı. Saflaştırılan enzimler 5-55 °C aralığındaki sıcaklıklarda 30 dakika bekletildikten sonra yapılan standart lipaz aktivite testi ile kalan aktivite belirlendi. Enzimlerin 5 °C’ta verdiği aktivite değeri % 100 kabul edilerek, diğer sıcaklıklardaki kalan aktivite değerleri hesaplandı.

Doktora tez çalışması kapsamında 50 °C'ta yapılan daha ileri düzeyde analizler ile enzimlerin geri dönüşümsüz inaktivasyon oranı belirlendi. Saflaştırılmış enzimler 50 °C'ta 7 saate kadar tutularak, enzimlerin yarı ömürlerinin ($T_{1/2}$) belirlenmesi hedeflendi. Çalışmada enzimler 50 °C'ta 7 saate kadar tutularak test edildi. Bu süre zarfında 50 °C'ta tutulan enzimlerden periyodik olarak örnek alınarak standart lipaz aktivitesi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

pH kararlılığının belirlenmesi çalışmalarında, saflaştırılan enzimler yukarıda adı geçen farklı pH değerlerindeki tamponlarda (pH 4.0-11.0) 4 °C'ta 1 hafta boyunca tutulduktan sonra, pH 8.0 tamponunda ve 37 °C'ta standart lipaz aktivite testine alındı. pH 8.0'da elde edilen aktivite değeri % 100 kabul edilerek, diğer pH'lardaki kalan aktivite değerleri belirlendi.

Farklı metal iyonlarının, deterjanların, organik çözücülerin ve inhibitörlerin lipaz aktivitesine etkisi, saflaştırılan enzimlerin bahsedilen ajanları içeren aktivite tamponunda 37 °C'ta 30 dakika süreyle bekletildikten sonra yapılan standart aktivite testi ile değerlendirildi. Enzimler, yukarıda adı geçen farklı ajanlarla 37 °C'ta 30 dakika süreyle yüzleştirildikten sonra, standart lipaz aktivite testine alındı ve yalnızca enzim içeren kontrol örneğine göreceli % kalan aktivite değerleri hesaplandı. Çalışmada; 10 mM metal iyonları (FeCl_2 , FeCl_3 , LiCl_2 , ZnCl_2 , NiCl_2 , CoCl_2 , ZnSO_4 , BaCl_2 , CuCl_2 , FeSO_4 , NaCl , KCl , MnCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 , NH_4SO_4 , NH_4Ac), % 0.1 ve % 1 deterjan (CTAB (setil trimetil amonyum bromit), sodyum deoksikolat, TritonX-100, Tween 20, Tween 80, SDS (sodyum dodesil sülfat)), % 10 ve % 30 organik çözücü (aseton, etanol, metanol, izo-propanol, izoamilalkol, DMSO (dimetil sülfoksit), asetonitril), 1 mM ve 10 mM inhibitor (EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), PMSF (fenil metil sülfonil florit)) kullanıldı.

Substrat özgülüğünün belirlenmesi çalışmalarında çeşitli pNP yağ asiti esterleri kullanıldı. Asetik asit (C_2), bütirik asit (C_4), oktanoik asit (C_8), dekanolik asit (C_{10}), laurik asit (C_{12}), miristik asit (C_{14}), palmitik asit (C_{16}) ve stearik asit (C_{18}) gibi yağ esterlerinin kullanıldığı çalışmada elde edilen sonuçlar, en yüksek aktivitenin alındığı substrata görece (pNP oktanoik yağ açıl ester) yüzde değer olarak belirlendi.

2.2.12. *Bacillus* Lipazlarının Modelleme Çalışmaları

Literatürde 3D yapısı bilinen herhangi bir *Bacillus pumilus* lipazı olmamasından dolayı, L5 ve L21 ebeveyn enzimleri ve L3-3 mutant lipazı için iki basamaklı bir strateji kullanılarak homoloji modelleri oluşturuldu. İlk basamakta, 3D yapısı bilinen homolog enzimler, *Bacillus pumilus* mutant L3-3 enzimine ait dizinin, araştırma için PDB veri bankasını kullanan, FFAS03 serverine (<http://ffas.ljcrf.edu/ffas-cgi/cgi/ffas.pl>) (Jaroszewski ve ark., 2011) yüklenmesiyle incelendi.

Beklendiği üzere, *B. pumilus* lipazlarıyla (% 78), 3D yapısı en yüksek dizi benzerliği gösteren lipazın aynı aileden gelen (Aile I.4.) *B. subtilis* lipase A (PDB ID: 1I6W) (van Pouderoyen ve ark., 2001) olduğu belirlendi. İkincil olarak, homoloji modellerinin oluşturulması basamağı, *B. pumilus* L5 ve L21 ebeveyn ve L3-3 varyant lipazlarının gen dizilimleri, kalıp dizi olarak kullanılan *B. subtilis* lipase A lipazı ile Phyre2 server yardımıyla “One-to-one threading” protokolü kullanılarak gerçekleştirildi (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley ve ark., 2009).

B. pumilus lipaz homoloji modelleri, PyMOL (versiyon 1.2r1) (Schrödinger, LLC) kullanılarak incelendi ve kalıp olarak kullanılan *B. subtilis* lipase A yapısı ile özellikle farklılıklar içeren noktalar gözetilerek karşılaştırıldı. *B. pumilus* L3-3 mutantı için yapılan yapısal incelemede, özellikle amino asitler arasındaki etkileşim olasılıklarına ve uyumsuzluk problemlerine, önem verildi. İkincil yapı tayini, DSSP programı (Kabsch ve ark., 1983) ile hesaplandı. Yapısal figürler PyMOL ile hazırlandı.

3. BULGULAR

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Biyolojik Materyal

Ülkemizin farklı ekolojik ortamlarından izole edilerek tez çalışmasında kullanılan *Bacillus* soyları, lipaz üretme yeteneğine göre taranarak, GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu'nun, Kızılay Pendik Tıp Merkezi Mikrobiyoloji laboratuvarı ile birlikte yürüttüğü çalışmayla sahip oldukları morfolojik ve biyokimyasal özellikler yönünden incelendi ve tür isimleri tayin edildi. Yine GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubu'na yapılan TÜBİTAK 1001 projesi (105T188) kapsamında kullanılan çeşitli moleküler temelli yöntemlerin kullanılmasıyla daha ileri düzeyde tanımlamalar yapıldı. DNA karıştırma yöntemiyle elde edilen ve aktivite yönünden iyileşmiş en iyi varyant olan L3-3, tez çalışmasında kullanılan yerel *Bacillus* soyları arasında yer alan L5 ve L21 ile yapılan DNA karıştırma çalışmalarıyla elde edildi. L5 ve L21 soyları, Balıkesir ve Bursa yörelerinden izole edildi ve yapılan karakterizasyon çalışmaları sonunda bu soyların *Bacillus* sp. oldukları belirlendi. *Bacillus* cinsi bakteriler; Gram-pozitif, çubuk şekilli, aerobik, katalaz-pozitif özelliği gösteren bakterilerdir. *Bacillus* cinsinin en önemli özelliği endospor oluşturma yeteneğidir. Yapılan biyokimyasal testler (Tuzlakoglu ve ark., 2003) ve 16S rDNA gen analizleri (İşsever Öztürk ve ark., 2008) sonucunda L5 ve L21 soyları *Bacillus pumilus* olarak tanımlandı.

3.2. Seçilmiş *Bacillus* Soylarında Lipaz Genlerinin PCR ile Çoğaltma Çalışmaları

Doktora tez çalışmasının ilk aşamasında lipaz enzim üreticisi olduğu belirlenmiş yerel *Bacillus* soylarının lipaz genleri, yapılan klasik ve moleküler temelli nitelendirme çalışmalarının sonuçları ele alınarak tasarlanan primerler ile farklı PCR koşulları denenerek çoğaltılmaya çalışıldı. Yapılan yönlendirilmiş evrim çalışmaları sonucu ortaya çıkan mutant kütüphaneden lipaz aktivitesi yönünden en yüksek artışı gösteren L3-3 mutanı, L5 ve L21 soylarından türetildi. L5 ve L21

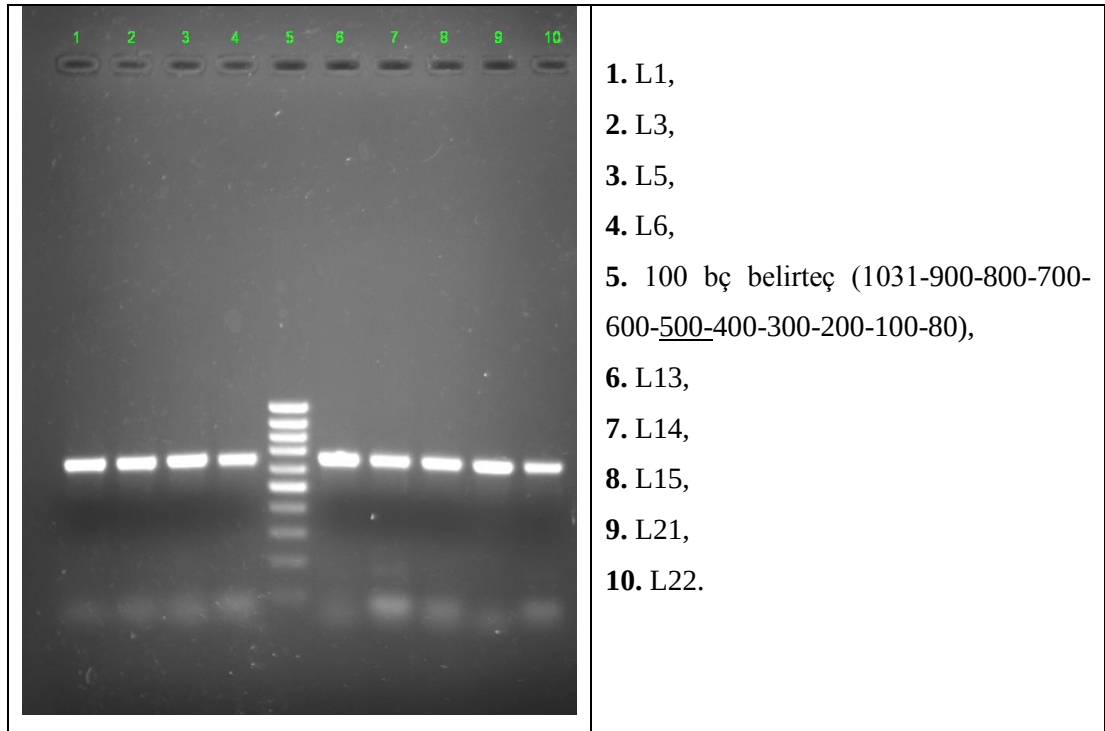
soyalarının yanı sıra tez çalışmasında kullanılan diğer soylarla da farklı primer çiftleri ve PCR koşulları denenerek lipaz genleri çoğaltılmaya çalışıldı. Bu çalışma kapsamında elde edilen farklı boylardaki PCR ürünleri, çalışmada kullanılan primer çiftleri ve yerel *Bacillus* sp. soyları Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Yerel *Bacillus* soylarından lipaz genlerinin çoğaltılması için kullanılan primer çiftleri ve elde edilen PCR ürün boyları.

Yerel <i>Bacillus</i> soyu	Kullanılan primer çifti	PCR ürünü boyu
L1	Primer 21F /Primer 22R	648 bç
L3	Primer 21F /Primer 22R	648 bç
L5	Primer 21F /Primer 22R	648 bç
L6	Primer 21F /Primer 22R	648 bç
L8	Primer 20F / Primer 22R	220 bç / 550 bç
L10	Primer 20F / Primer 22R	220 bç / 550 bç
L13	Primer 21F /Primer 22R	648 bç
L14	Primer 21F /Primer 22R	648 bç
	Primer 20F / Primer 23R	900 bç
L15	Primer 21F /Primer 22R	648 bç
	Primer 20F / Primer 23R	170 bç / 700 bç
L16	Primer 20F / Primer 22R	648 bç
L21	Primer 21F /Primer 22R	648 bç
	Primer 20F / Primer 23R	170 bç
L22	Primer 21F /Primer 22R	648 bç

Yapılan PCR çalışmalarında, tasarlanan primerler; Primer 20F-22R, Primer 21F-22R, Primer 20F-23R, Primer 24F-25R, Primer 26F-27R şeklindeki çiftler halinde kullanıldı. Primer 24F-25R (*B. thermocatenulatus*) ve Primer 26F-27R (*B. thermoleovolans*) çiftlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonları sonucunda özgül olmayan birçok bant elde edildi. Bu nedenle bu primer çiftleriyle elde edilen ürünler klonlama çalışmalarına alınmadı. Diğer primer çiftleriyle yapılan PCR reaksiyonları sonunda elde edilen ürün boyları Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Lipaz genlerini üretmeye yönelik yapılan PCR çalışmalarında en iyi sonuçlar Primer 21F (*B. pumilus*) ve 22R (*B. pumilus/B. subtilis*) çiftinin kullanıldığı reaksiyonlarda elde edildi. Bu primer çiftiyle L1, L3, L5, L6, L13, L14, L15, L21, L22 yerel *Bacillus* soylarından 648 bç büyüklüğünde parçalar üretildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen agaroz jel profili Şekil 3.1’de verilmektedir.



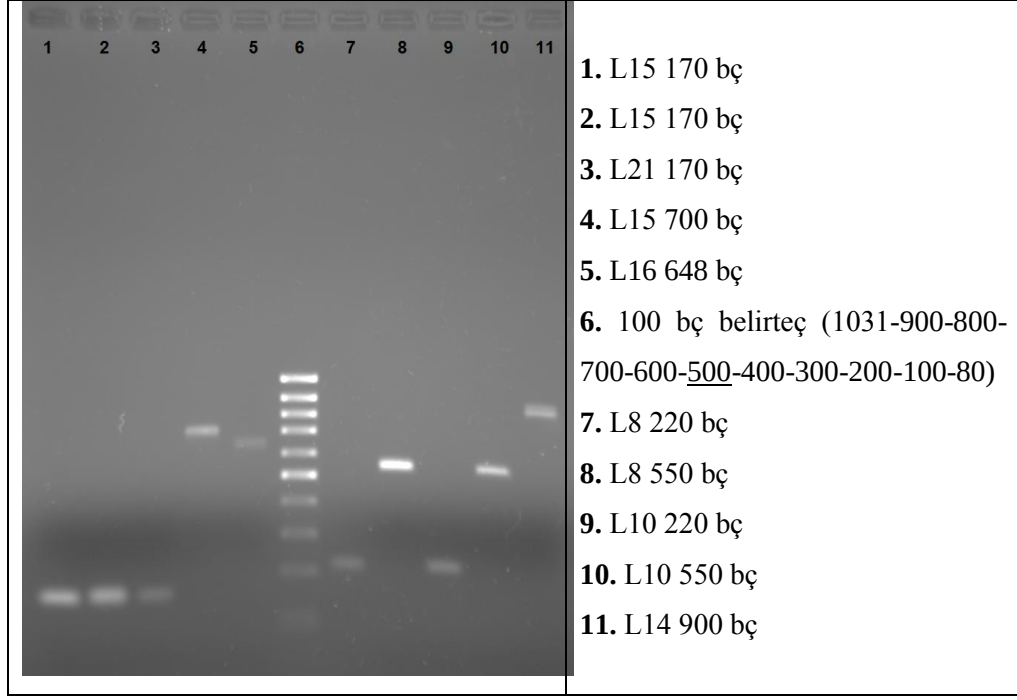
Şekil 3.1. 21F-22R primerlerinin kullanıldığı PCR’lar sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel profili.

Primer 21F-22R çifti ile herhangi bir PCR ürünü elde edilemeyen diğer 3 *Bacillus* soyu (L8, L10, L16), Primer 20F (*B. subtilis*) ve Primer 22R (*B. pumilus/B.*

subtilis) ile çoğaltıldı. PCR sonrası L8 ve L10 soylarından 220 bç ve 550 bç, L16 soyundan ise 648 bç büyüklüğünde PCR ürünleri elde edildi. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel profilleri Şekil 3.2’de gösterilmektedir.

Bunların yanı sıra 20F (*B. subtilis*) - 23R (*B. subtilis* lipE) primer çiftiyle yapılan PCR çalışması sonunda, L14 soyundan 900 bç, L15 soyundan 170 bç ve 700 bç, L21 soyundan ise 170 bç büyüklüğünde ürünler elde edildi. PCR reaksiyonu sonunda elde edilen ürünler Şekil 3.2’de gösterilmektedir. Bu soylardan aynı zamanda Primer 21F (*B. pumilus*) ve 22R (*B. pumilus/B. subtilis*) çiftleri kullanılarak, 648 bç büyüklüğünde ürün elde edilmişti (Şekil 3.1).

Farklı büyüklükteki PCR ürünlerinin elde edildiği çalışmalarda istenen saflıkta ürün elde edebilmek için, Tablo 2.3’de verilen primer listesinde yer alan primerler kullanılarak çeşitli optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon çalışmalarında, farklı tutunma sıcaklıkları, *Taq* polimeraz enzimleri, $MgCl_2$ konsantrasyonları denendi. Çalışmalar sonunda elde edilen en iyi verimin alındığı, spesifik olmayan bantlardan arındırılmış en temiz PCR ürünleri agaroz jel profilleri değerlendirilerek belirlendi. Belirlenen koşullar gözetilerek farklı boylardaki PCR ürünleri toplu üretime alındı ve bir sonraki çalışma olan klonlama basamağı için hazırlandı.



Şekil 3.2. L8, L10, L14, L15, L16, L21 soylarından, 20F-22R ve 20F-23R primer çiftleriyle elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel profili.

3.3. *Bacillus* sp. Soylarının Klonlama, Dizileme ve Ekspresyon Çalışmaları

PCR çalışmaları sonunda elde edilen 170 bp, 220 bp, 550 bp, 648 bp, 700 bp ve 900 bp büyüklüğündeki PCR ürünleri klonlama çalışmaları öncesinde jelden izole edilerek, yine agaroz jelde miktar tayinleri yapıldı. Klonlama aşamasında “InsTAclone PCR Cloning kit (Fermentas)” kullanıldı. Klonlama çalışmaları ilk aşamada yapılan reskripsiyon endonükleaz kesimleri ile doğrulandı. Sonraki aşama için klonlanan farklı büyüklükteki parçaların lipaz enzim dizilimlerine sahip olup olmadıklarını kontrol amacıyla, gen dizilimleri belirlendi. Bu bağlamda dizi analizi çalışmaları yapıldı. Klon adaylarının gen dizilimleri CEQ 8000 otomatik dizi analiz sistemi kullanılarak belirlendi. Elde edilen veriler çeşitli biyoinformatik araçları kullanılarak değerlendirildi. Homoloji çalışmaları BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) yardımıyla gerçekleştirildi. Ancak yapılan dizi analizi çalışmaları sonucunda, klonlanan altı farklı büyüklükteki PCR ürünlerinden yalnızca 648 bp büyüklüğünde olanın lipaz gen dizilimine sahip olduğu

belirlendi. Farklı büyüklükteki parça taşıyan klonlar ile yapılan ekspresyon çalışmasında da, yalnızca 648 bp büyüklüğündeki parçayı taşıyan klonlardan lipaz aktivitesi elde edildi.

Yapılan biyoinformatik çalışmaları sonunda; L1, L3, L5, L10, L13, L14, L15, L21 ve L22 soylarının *B. pumilus* lipaz gen dizilimlerine, L16 soyunun ise *B. subtilis* lipaz gen dizilimine sahip olduğu belirlendi. Yapılan biyoinformatik çalışmalarıyla 648 bp büyüklüğünde parça taşıyan klonların lipaz-esteraz süper aile domainini taşıdıkları sonucuna varıldı.

Klonlanan lipaz genleri lipaz aktivitesi yönünden incelenmek üzere ekspresyon çalışmalarına alındı. Ekspresyon uyarımlı ve uyarımsız gerçekleştirildi, belirlenen saatlerde alınan örneklerle hücre içi ve hücre dışı aktivite testleri yapıldı. Hücre dışı aktivite testleriyle elde edilen sonuçlar, klonlanan soyların enzimi besi yeri ortamına salgılayabildiğini gösterdi. Bununla birlikte hücre içi aktivite testlerinde de kayda değer lipaz aktivitesi belirlendi. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirilerek bir sonraki aşamada ilgili lipaz genlerinin farklı bir vektöre alt klonlanmasına karar verildi. Alt klonlama çalışmalarında, lipaz genleri pUC19 (2.7 kb) ekspresyon vektörüne alt klonlaması denendi.

Klonlama çalışmaları, rekombinant plazmitlerin ilgili restriksiyon endonükleazlarla kesimi ve 648 bp büyüklükteki DNA fragmanlarının agaroz jelde görüntülenmesiyle doğrulandı. Yapılan ekspresyon çalışmalarıyla, alt klonlama çalışmaları sonunda klonlar, lipaz aktivitesi yönünden de irdelendi. 10 ayrı *Bacillus* soyundan köken alan lipaz genleri, pUC19 vektörüne başarıyla klonlandı.

Yapılan alt klonlama çalışmaları sonrası 648 bp büyüklüğünde parça taşıyan, lipaz enzim aktivitesi yönünden taranmış ve gen dizilimleri doğrulanmış 10 klon ile yönlendirilmiş evrim çalışmaları kapsamında, DNA karıştırma yöntemi kullanılarak mutant kütüphaneler oluşturuldu. Bu kütüphaneler lipaz aktivitesi yönünden artış gösteren varyantı bulmak amacıyla tarandı. Yapılan tarama çalışmaları sonunda L5 ve L21 *Bacillus pumilus* soylarından türeyen L3-3 mutanıtı ön plana çıktı. Tez projesi

kapsamında bu varyant üzerine gidilerek, DNA yapısında oluşturulan değişikliklerin, protein yapı ve işlevine olan etkileri üzerinde çalışmalar yapıldı.

Yapılan dizi analizi çalışmaları sonucunda ebeveyn enzimlerin lipaz gen dizisi, **JX163855** (L5) ve **JX163856** (L21) erişim numaralarıyla GenBank veritabanına depo edildi.

GenBank: JX163855.1

>gi|408690814|gb|JX163855.1| Bacillus pumilus strain L5 lipase gene, complete cds

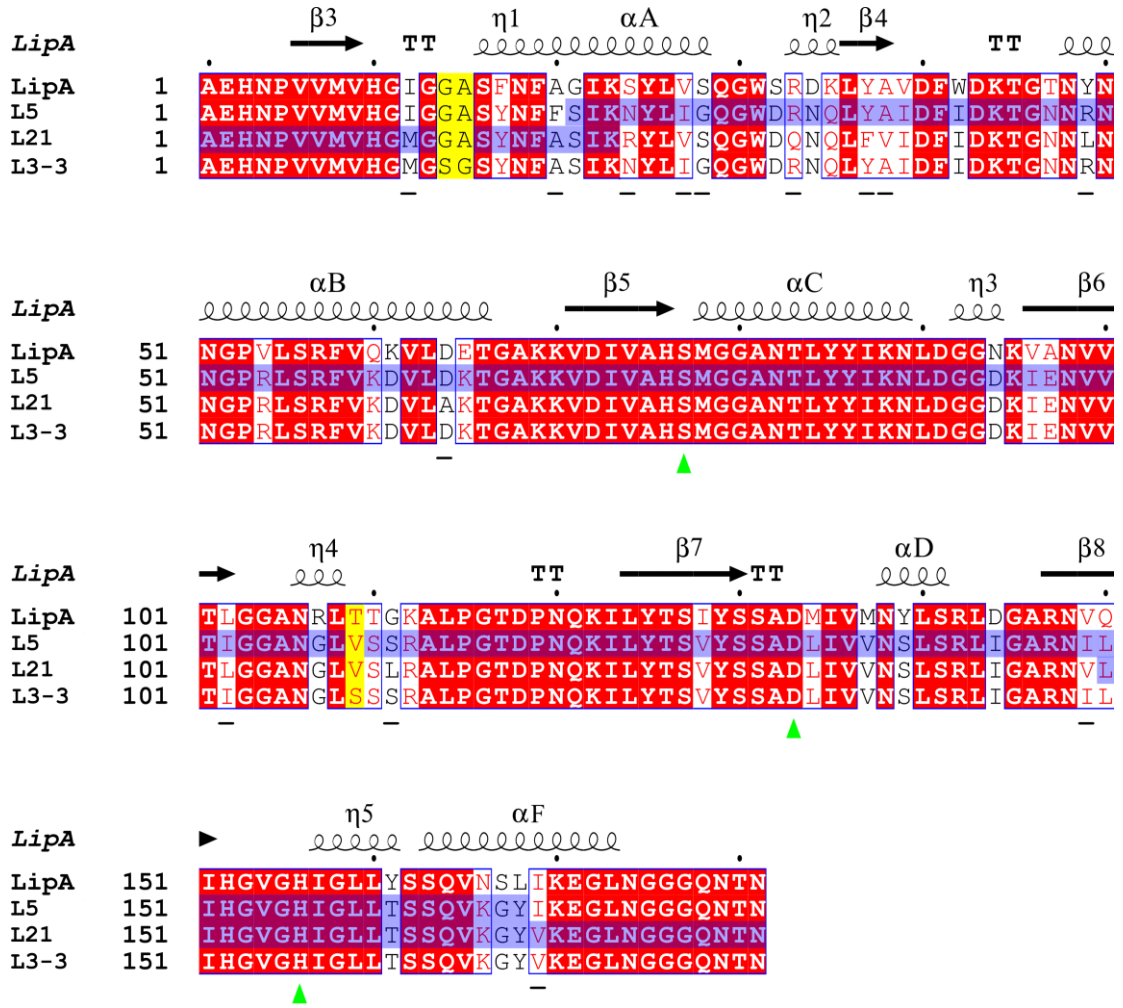
```
ATGAAAGTGATGTTTGTAAAGAAAAATGAGTTTGCAATTCTCATTGCGCT
TGCATTGGTGATTGGTTCAATGGCTTTTATCCAGCCGAAAGAGGTGAAGG
CGGCTGAGCATAATCCAGTTGTGATGGTGCACGGCATTGGTGGTGCCTCT
TATAACTTTTTTCTATTAATAAAATTACTTGATTGGACAAGGCTGGGATCG
AAACCAATTATATGCTATTGATTTTCATAGACAAAACAGGAAATAACCGC
AACAATGGTCCGCGTCTATCGAGATTCGTCAAAGATGTGTTAGACAAAAC
GGGTGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGCTCATAGTATGGGCGGGGCGAAC
ACGCTATATTATATTAAGAATCTAGATGGCGGCGATAAAATTGAGAACGT
TGTCACAATTGGTGGAGCAAACGGACTCGTTTCAAGCAGAGCATTACCA
GGCACAGATCCAAATCAAAAAATTCTTTACACATCCGTCTATAGCTCAGC
AGATCTTATTGTCGTCAACAGCCTCTCTCGTTTAATTGGCGCAAGAAACA
TCCTGATCCATGGCGTTGGCCATATCGGTCTATTAACCTCAAGCCAAGTG
AAAGGGTATATTAAAGAAGGACTGAACGGCGGAGGCCAGAATACGAATT
AA
```

GenBank: JX163856.1

>gi|408690816|gb|JX163856.1| *Bacillus pumilus* strain L21 lipase gene, complete cds

```
ATGAAAGTGATGTTATTTAAGAAAAAGAGTTTGCAAATTCTTGTTGCCCT
TGCCTTAGTGATAGGTTCAATGGCCTTCATCCAGCCGAAAGAAGCCAAAG
CGGCTGAGCATAATCCGGTTGTGATGGTGCATGGCATGGGTGGTGCCTCT
TATAACTTTGCTTCGATCAAACGATACTTAGTATCACAGGGATGGGATCA
AAACCAACTTTTTGTAAATCGATTTCATAGACAAAACAGGCAATAACCTGA
ACAATGGCCCGAGGCTCTCTAGATTTCGTGAAAGATGTACTAGCCAAAAC
GGGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGCTCATAGCATGGGCGGTGCGAAC
ACGTTATACTATATTA AAAACCTAGACGGCGGAGATAAAATTGAAAACG
TCGTCACATTAGGTGGAGCAAACGGACTCGTATCACTCAGAGCATTACCA
GGCACCGATCCAAATCAAAAAATTCTTTACACTTCTGTCTATAGCTCAGC
CGATCTCATCGTCGTCAACAGTCTCTCTCGCTTAATTGGCGCAAGAAACG
TCCTCATCCACGGCGTTGGACATATCGGTCTATTAACCTCAAGCCAAGTC
AAAGGGTATGTGAAAGAAGGATTGAATGGCGGAGGACAGAATACAAAC
TAA
```

Klonlama çalışmaları sonrasında yapılan dizi analizleriyle, klonlanan L5 ve L21 *B. pumilus* soylarının kromozomal DNA'larının PCR ile çoğaltılarak elde edilen açık okuma çerçevesi 648 bp büyüklüğünde bulundu. TA klonlama yöntemiyle gerçekleştirilen klonlama basamağında pTZ57R/T vektörü kullanıldı. 0.65 kb büyüklüğündeki ORF (open reading frame) dizileme çalışmaları ile doğrulandı. Öncül lipazı kodlayan 645 bp büyüklüğündeki parça, 215 amino asit içermektedir. DNA translasyonu, kodlanmış enzimlerin 34-rezidüel sinyal peptit içerdiğini göstermektedir (SignalP 4.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Olgun enzimin kesilmesinden sonra, 181 amino asit rezidüsü taşıyan, yaklaşık 19 kDa moleküler büyüklükte bir protein oluştuğu belirlendi. Dizi analizi çalışmaları, L5 ve L21 ebeveyn lipazların DNA düzeyinde % 85, protein düzeyinde de % 89 oranında benzerlik taşıdığını gösterdi. Her iki ebeveyn lipaz, protein düzeyinde *B. subtilis* lipaz A (ref) ile % 78 oranında benzerlik göstermektedir (Şekil 3.3).

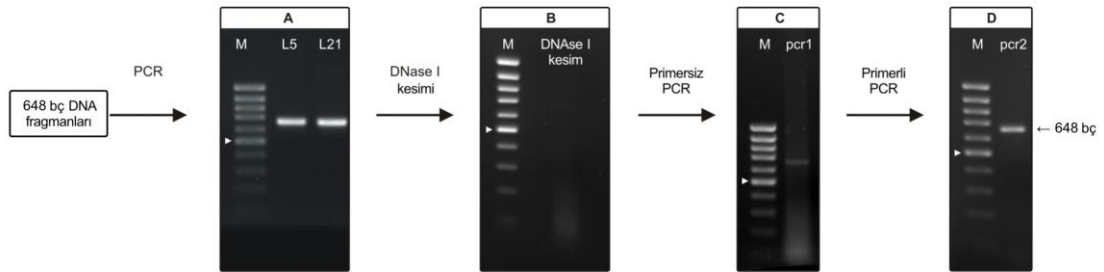


Şekil 3.3. *Bacillus subtilis* (LipA)’nın, iki *Bacillus pumilus* ebeveyn (L5, L21) ve L3-3 mutanıtı ile ESPript (Gouet ve ark., 1999) kullanılarak yapılmış dizi “alignmenti”. LipA’nın ikincil yapısı gösterilmektedir. Katalitik bölge (S77, D133, H156) yeşil üçgenlerle temsil edilmektedir. Mavi kutular, L3-3 mutant dizisinin, hangi ebeveyninden türevlendiğini göstermektedir. İlk çapraz geçiş pozisyonu 20/21 ve 23/24 rezidüleri, ikinci çapraz geçiş pozisyonu ise 149/150 ve 168/169 rezidüleri arasında yer almaktadır. Kimerik farklılıklar siyah altı çizili yerlerle, L3-3 nokta mutasyonları ise sarı kutularla temsil edilmektedir.

3.4. DNA Karıştırma ve Kütüphane Taranması

Yapılan DNA karıştırma çalışmalarıyla, enzim aktivitesi yönünden gelişmiş en iyi varyant olan L3-3, *B. pumilus* lipaz L5 ve L21 ebeveyn genleri kullanılarak

elde edildi. Rastgele fragmanların oluşturulması basamağında DNase I kesimi Mn^{2+} varlığında yapıldı. DNase I ile kesim çalışmasında kullanılan L5 ve L21 klonlarının *lip* genlerini içeren 648 bç büyüklüğündeki DNA fragmanları, plazmit DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR ile çoğaltıldı (Şekil 3.4 (A)). DNase I enzimi ile kesim aşamasında farklı DNA, enzim konsantrasyonu, farklı kesim süresi ve sıcaklıklarının denendiği bir dizi optimizasyon çalışması yapıldı. DNA fragmanlarının DNase I ile kesilmesinin ardından elde edilen “smear” şeklindeki jel profili Şekil 3.4 (B)’de gösterilmektedir. <70 bç aralığındaki fragmanlar jelden izole edilerek DNA karıştırma çalışmalarının bir sonraki basamağı olan, reaksiyonda primer kullanılmadan DNA parçalarının birleştirildiği PCR çalışması (PCR I) yapıldı. PCR I sonrası “smear” görüntüsünün içinde 648 bç büyüklüğündeki parça jelde gözlemlendi (Şekil 3.4 (C)). DNA karıştırma 1. PCR’da fragmanlar birleştirildikten sonra, elde edilen ürünün kullanıldığı primerli bir PCR reaksiyonu yapıldı. Yapılan bu PCR reaksiyonu (PCR II) sonunda 648 bç büyüklüğünde tam boy ürün elde edildi. Yeniden birleştirilmiş fragmanlar agaroz jelde yürütülerek doğru büyüklükteki tam boy ürünün oluşumu kontrol edildi (Şekil 3.4 (D)).



Şekil 3.4. *Bacillus pumilus* L5 ve L21 klonlarının <70 bç fragmanlarından 648 bç’lik genin yeniden eldesi. M = 100 bp DNA belirteç (yukarıdan aşağıya: 1031, 900, 800, 700, 600, 500 (►), 400, 300, 200, 100, 80 bp). (A), Lipaz genlerini kodlayan 648 bç DNA fragmanlarının, L5 ve L21’den PCR ile çoğaltılması. (B), DNase I kesim sonrası (10 mM Mn^{2+} varlığında 25 °C’ta 11 dakika) elde edilen “smear” görünümü. (C), Saflaştırılan fragmanların primersiz PCR ile birleştirilmesi. (D), Primerlerin eklendiği koşullarda yapılan PCR II sonucu tam boy PCR ürünü.

DNA karıştırma ikinci PCR sonunda elde edilen 648 bç büyüklüğündeki tam boy PCR ürünü için klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere daha fazla ürün elde

etmek amacıyla, toplu üretim yapıldı ve ürünler jelden geri kazanıldı. *HindIII-EcoRI* restriksiyon enzimleriyle kesilerek, aynı enzimlerle kesilen ve alt klonlama çalışmalarında iyi sonuçlar alınan pUC19 vektörüne klonlandı. Transformasyon basamağında *E. coli* JM109 kompetan hücreleri kullanıldı. Transformasyon sonucu elde edilen koloniler lipaz aktivitesi yönünden tarandı.

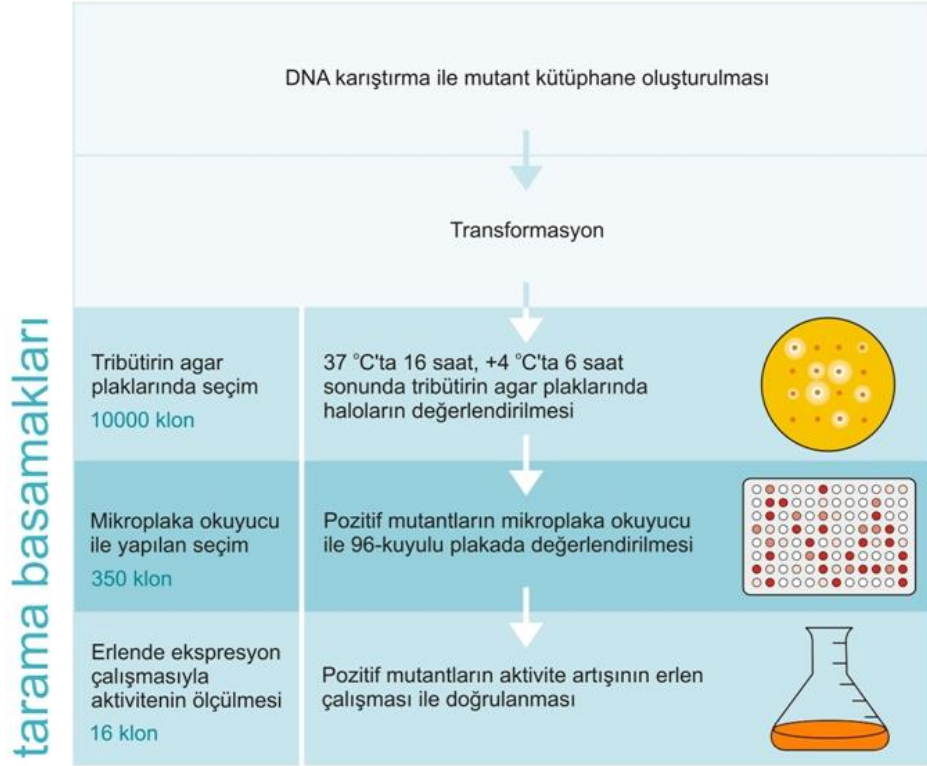
Yönlendirilmiş evrimin ikinci basamağını, geliştirilen mutantların taranması/seçilmesi oluşturur. Yönlendirilmiş evrim deneylerinde uygun tarama ve seçme yöntemlerinin geliştirilmesi sınırlayıcı bir basamaktır. Yapılan analizlerin hızlı, tekrarlanabilir ve güvenilir olması önemlidir.

Yapılan tüm DNA karıştırma çalışmaları sonunda toplam 10.000 koloni elde edildi. 10.000 koloni, üç farklı basamağın kullanıldığı tarama aşamasında lipaz aktivitesindeki artış yönünden incelendi.

Doktora tez çalışması kapsamında, L5 ve L21 *Bacillus pumilus* soylarıyla yapılan DNA karıştırma çalışmaları sonucunda elde edilen 10.000 koloni, tribütirin agar petripleri, mikrolaka okuyucu ve büyük ölçekte yapılan ekspresyon çalışmalarının yer aldığı 3-basamaklı bir strateji ile tarandı. Elde edilen transformanlar artan lipaz aktivitesinin belirlenmesine yönelik olarak tarandı. İlk tarama basamağında tribütirin agar petrilerinde oluşan halo görüntüsünden yararlanıldı. İkinci basamak 96-kuyulu mikrolaka kullanılarak yapıldı. Son basamakta ise pozitif aktivite veren örnekler erlende ekspresyon çalışmasına alındı. Mutant kütüphaneye lipaz aktivitesindeki artış baz alınarak tarandı (Şekil 3.5).

İlk basamakta tribütirin agar petrilerinde tribütirin hidroliziyle oluşan açık renkli zonlar (halo) karşılaştırılarak seçim yapıldı. Transformasyon sonucu elde edilen koloniler tribütirin agar petrilerine aktararak oluşturduğu zonlara göre, yaklaşık 10.000 transformanın 5500 kadarının (% 55) lipaz aktivitesi gösterdiği belirlendi. Her bir petride ebeveyn soylar kontrol olarak kullanıldı. Bu soyların oluşturduğu açık renkli zonlara görece daha büyük ve net zon veren koloniler ikinci basamakta yapılacak tarama çalışmasına alındı. Tribütirin agar petrilerinden gözle seçilmiş, ebeveyn soylara görece daha iyi lipaz aktivitesi gösteren 350 koloni (% 3.5)

ikinci tarama basamağı için seçildi.



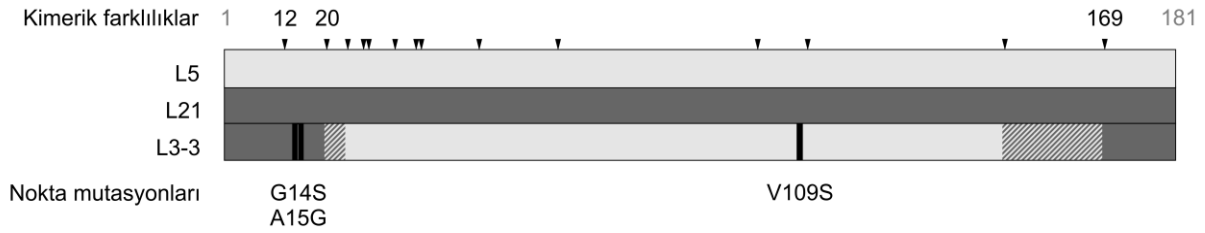
Şekil 3.5. Mutant kütüphane tarama basamakları.

İkinci tarama basamağında, lipaz aktivitesi 96 kuyulu plakalar ile kolorimetrik olarak tayin edildi. Yine bu aşamada da ebeveyn soyların kontrol olarak kullanılmasıyla aktivite artışı doğrulandı. Bu ebeveyn soylardan yüksek aktivite gösteren en iyi 16 transforman seçilerek üçüncü tarama aşaması için ekspresyon çalışmasına alındı.

Üçüncü tarama aşamasında ekspresyon çalışmalarıyla, seçilen varyantların aktiviteleri yine ebeveyn enzimlerin kontrol olarak kullanıldığı koşullarda test edildi. Bu basamakta ilk iki basamakta seçilerek belirlenen varyantlar, lipaz aktivitesindeki artış yönünden tekrar doğrulanmış oldu. 10.000 koloni ile başlanan ve her tarama basamağında sınırlandırılarak irdelenen mutant kütüphaneden, lipaz aktivitesi yönünden en büyük artışı gösteren varyant olan L3-3 seçildi.

Ancak mutant kütüphanenin taranması çalışmalarında farklı yöntemlerle ölçülen lipaz aktivite sonuçları bize aktivite aldığımız varyantın dizisiyle ilgili bir sonuç vermemektedir. Yapılan rastgele değişimlerin belirlenmesi ancak dizi analizi ile belirlenebilmektedir. Aktivite çalışmaları bize üzerine daha çok gitmemiz gereken varyantı işaret etmektedir. Bu nedenle dizi analizi çalışmalarıyla DNA karıştırma sonucunda yapıda oluşan değişiklikler belirlendi. Tarama çalışmaları sonunda elde edilen en iyi varyant olan L3-3 daha ileri düzeyde irdelendi. Bu nedenle, DNA karıştırma sonucunda yapıda oluşan değişiklikler dizi analizi çalışmalarıyla belirlendi.

L3-3 varyantı için yapılan dizi analizleri sonucunda, L3-3 varyantının 2 çapraz geçiş pozisyonuna sahip kimerik bir mutant olduğu belirlendi. Bu çapraz geçiş sonucunda, L3-3 varyantı, L5 ebeveyninden orijinlenen, orta bölgede yer alan büyük bir fragman ve L21 ebeveyninden türevlenen kısa N- ve C- terminal fragmanlarından oluşur (Şekil 3.6 ve Şekil 3.3).



Şekil 3.6. *Bacillus pumilus* ebeveynleri (L5, açık gri ve L21, koyu gri ile gösterilmektedir) ve L3-3 mutanti dizilerinin şematik gösterimi. L3-3 mutanti dizisi içinde gösterilen açık gri ve koyu gri bölgeler, mutant enzim dizisinin hangi ebeveyn soydan türevlendiğini temsil etmektedir. DNA dizisindeki bölgesel homoloji nedeniyle, L3-3 mutantının çapraz geçiş pozisyonları tam olarak belirlenememektedir. Şekilde gölgeli bölgeyle temsil edilen ilk çapraz geçiş pozisyonu 20/21 ve 23/24 rezidüleri, ikinci çapraz geçiş pozisyonu 149/150 ve 168/169 rezidüleri arasında yer almaktadır. İki ebeveyn arasındaki kimerik farklılıklar siyah üçgenlerle, L3-3 mutantındaki 3 farklı nokta mutasyonu siyah çubuklarla gösterilmektedir.

Orta fragmanda, iki ebeveyn enzim arasında farklılık gösteren rezidülerin yer aldığı, 11 adet kimerik farklılık gözlemlenmektedir. Bununla beraber terminal fragmanlarda da 3 adet farklılığa rastlanmaktadır. Ayrıca, dizinin incelenmesiyle, L3-3 varyantının 3 nokta mutasyonu (G14S, A15G ve V109S) taşıdığı, bu mutasyonların ebeveyn enzimlerden kaynaklanmadığı ve *B. subtilis* lipaz A'nın yapısında da yer almadığı belirlendi. Sonuç olarak, L3-3 varyantı, L5 ebeveyninden 6 pozisyonda ve L21 ebeveyninden 14 pozisyonda farklılık göstermektedir. Yapının detaylı gösterimi Şekil 3.6'da verilmektedir.

3.5. Ebeveyn ve Mutant Lipazların Saflaştırma Çalışmaları

Doktora tez çalışması kapsamında, DNA karıştırma çalışmalarına alınan yerel *Bacillus pumilus* L5 ve L21 klonları ve bu klonlardan türevlenerek lipaz aktivitesi yönünden en iyi iyileşmeyi gösteren L3-3 mutanıtı, sahip oldukları biyokimyasal özellikler yönünden incelenmek üzere saflaştırılarak, nitelendirildi. Büyük ölçekli kültürlerin 12. saatte toplandığı saflaştırma çalışmasında kültür üst sıvısı % 80 amonyum sülfat ile tek basamakta çöktürüldü. Saflaştırma aşaması iyon değişim kromatografisinin kullanılması ile yine tek basamakta gerçekleştirildi. *B. pumilus* L5 ve L21 klonları ile L3-3 mutanıtının saflaştırma sonuçları Tablo 3.2'de yer almaktadır.

Tablo 3.2. L5, L21 ve mutant L3-3 lipazlarının saflaştırma tablosu.

	Toplam Aktivite (U)			Toplam Protein (mg)			Ham Spesifik Aktivite (U/mg)			Saflaştırma oranı			Verim (%)		
	L5	L21	L3-3	L5	L21	L3-3	L5	L21	L3-3	L5	L21	L3-3	L5	L21	L3-3
Lizat supernatan	17444	8950	189104	143	148	151	122	60	1255	1.00	1.00	1.00	100	100	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi	13804	8091	119554	65.6	61.5	84.9	210	132	1409	1.73	2.18	1.12	79.1	90.4	63.2
İyon değişim	7339	4743	98624	6.38	8.49	8.96	1150	558	11012	9.43	9.26	8.78	42.1	53.0	52.2

İyon değişim kromatografi basamağının sonunda elde edilen verim, başlangıç aktivitesine göre L5 için % 42, L21 için % 53 ve L3-3 için % 52 olarak bulundu. Her

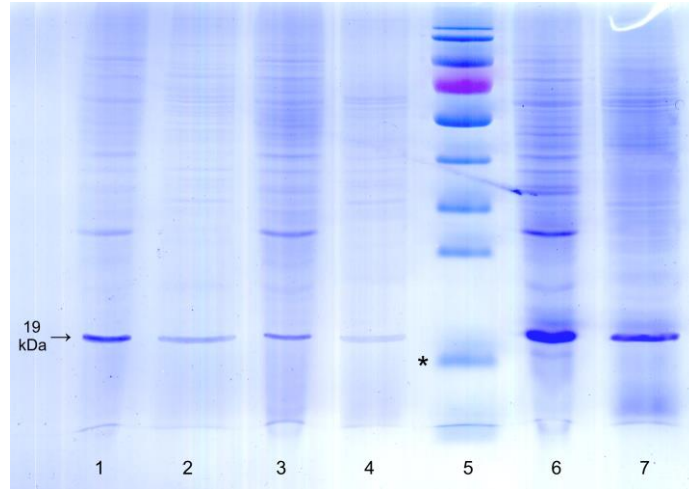
üç enzim için de spesifik aktivite artışı, yaklaşık 9 kat olarak belirlendi. Bununla birlikte elde edilen değerlerin ilgili örnekler için, saflaştırma oranı açısından düzeltilmesi gerekmektedir. Çünkü saflaştırma işlemi tek basamakta kısmi olarak gerçekleştirildi ve bu nedenle ortamdaki safsızlıkların aktivite ve protein miktar tayinleri yönünden sağlıklı sonuçlar verebileceği düşünüldü. Enzimlerin saflaştırma dereceleri, SDS-PAGE jel profilinin kullanıldığı densitometrik analiz ile hesaplandı. Buna göre saflık, L5 için % 40, L21 için % 25 ve L3-3 için % 60 olarak belirlendi. Doğrulanmış spesifik aktivite Tablo 3.3’de verilmektedir. Bu sonuçlar, L3-3 mutantının spesifik aktivitesinin, L5 lipazına görece 6.4 kat ve L21 lipazına görece 8.2 kat artığını gösterdi.

Tablo 3.3. Saflaştırılan L5, L21 ve L3-3 mutantı lipaz enzimlerinin spesifik aktivite değerleri.

	L5	L21	L3-3
Ham spesifik aktivite (U/mg)	1150 ± 3	558 ± 4	11012 ± 4
Düzeltilmiş spesifik aktivite (U/mg)	2878 ± 8	2238 ± 16	18332 ± 7

Tablo 3.3’de, saflaştırma çalışmaları sonucunda hesaplanan ham spesifik aktivite değerleri ve densitometrik analizlerle elde edilen doğrulanmış değerler yer almaktadır.

Saflaştırılan enzimlerin moleküler büyüklüğü SDS-PAGE jel elektroforezi ile yaklaşık 19 kDa tayin edildi (Şekil 3.7). 1, 3 ve 6 numaralı kuyularda sırasıyla, L5, L21 ve L3-3 mutantının saflaştırma öncesi, 2, 4 ve 7 numaralı kuyularda ise saflaştırma sonrasındaki jel profilleri görülmektedir. Yapılan analizlerle enzimlerin saflık dereceleri, L5 için % 40, L21 için % 25 ve L3-3 için % 60 olarak belirlendi. İyon değişim kromatografisi sonunda elde edilen fraksiyonlar, lipaz enzim aktivitesi ve SDS-PAGE jel profilleri dikkate alınarak, çok saftan az safa doğru üç ayrı havuz halinde toplandı. En iyi havuz olan havuz 1 ile nitelendirme çalışmaları yapıldı.



Şekil 3.7. *B. pumilus* ebeveyn ve mutant lipazlarının kısmi saflaştırma sonrası SDS-PAGE profili. 1 ve 2, L5’in iyon değişim kromatografi öncesi ve sonrası; 3 ve 4, L21’in iyon değişim kromatografi öncesi ve sonrası; 5, Fermentas “PAGE ruler” (10, 17 (*), 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130 ve 170 kDa); 6 ve 7, L3-3 mutantının iyon değişim kromatografi öncesi ve sonrası. Lipaz bandı (►) ile gösterilmektedir.

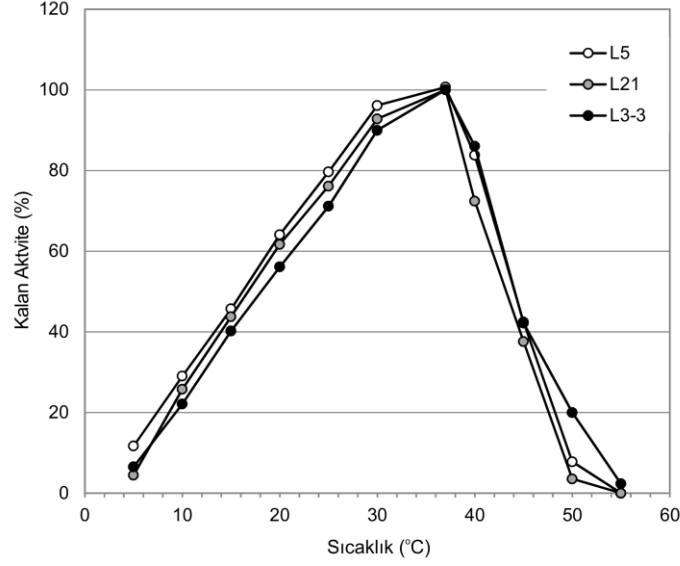
3.6. Ebeveyn ve Mutant Lipazların Nitelendirilmesi

İyon değişim kromatografisi ile tek basamakta kısmi olarak saflaştırılan, klon L5, klon L21 ve mutant L3-3 lipazlarının, optimal sıcaklık ve pH, sıcaklık ve pH kararlılığının belirlenme deneylerinin yanı sıra, çeşitli metal ve tuzlar, deterjanlar, organik çözücüler, inhibitörlerin enzimler üzerindeki etkileri incelendi. Bununla birlikte her üçü için substrat özgülüğü kullanılan farklı zincir uzunluğundaki *p*NP yağ açıl esterleriyle belirlendi. Yapılan tüm nitelendirme çalışmaları en az üç kez tekrar edilerek doğrulandı. Lipaz aktivite testi Bölüm 2.2.9.1’de anlatıldığı gibi yapıldı.

3.6.1. Optimum Reaksiyon Sıcaklığı

Farklı sıcaklıklarda (5-55 °C aralığı) enzim aktivitesinin ölçülmesiyle yapılan optimal sıcaklık deneylerinin sonunda ebeveyn ve varyant lipaz enzimlerinin optimal reaksiyon sıcaklığı 37 °C olarak belirlendi. Bu basamaktan sonra yapılan bütün

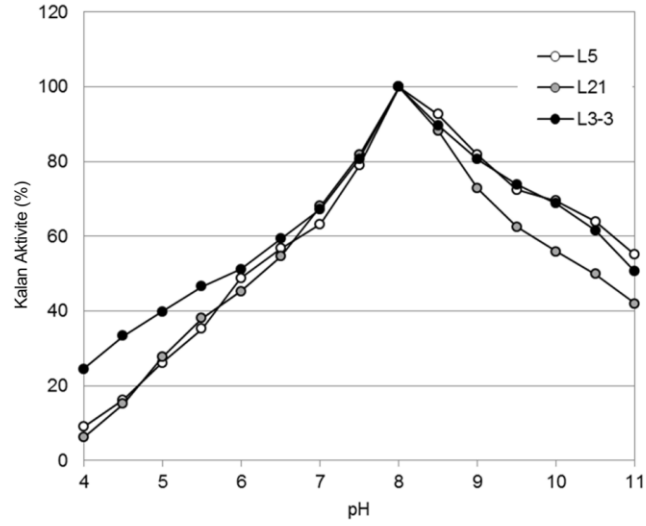
nitelendirme testleri 37 °C'ta gerçekleştirildi. Optimal sıcaklığın üzerindeki sıcaklık değerlerinde aktivitenin hızla azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Ebeveyn ve mutant lipazlarının farklı sıcaklıklardaki, pH 8.0 değerinde ölçülen kalan aktivite değerleri.

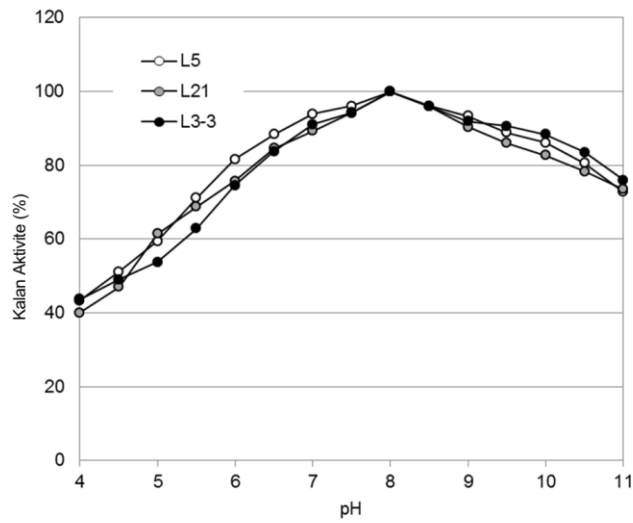
3.6.2. Optimal pH ve pH Kararlılığı

Optimal pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla, farklı pH'larda (pH 4.0-11.0) hazırlanan tamponlarla aktivite testleri yapıldı. pH-aktivite profilleri hem mutant hem de ebeveyn enzimler için benzer sonuçlar gösterdi ve enzimler için optimal pH değeri pH 8.0 olarak belirlendi (Şekil 3.9.). Bu aşamadan sonra yapılan nitelendirme testlerinde enzimlerin optimal aktivite verdiği pH 8.0 değerindeki tampon ile çalışıldı.



Şekil 3.9. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi. 37 °C'ta 30 dakika sonrasında farklı pH değerindeki tamponlarda elde edilen kalan aktiviteler.

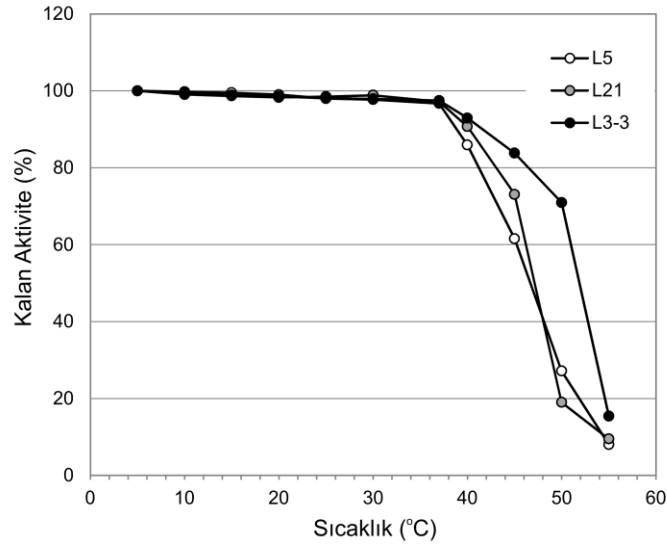
Enzimlerin pH kararlılığının belirlenmesi amacıyla, saflaştırılan enzimler pH değerleri Şekil 3.10'da verilen tamponlarda, 4 °C'ta 1 hafta süreyle inkübe edildi. İnkübasyonu takiben yapılan aktivite testleri sonucunda, pH 8.0'da elde edilen değer % 100 kabul edildi ve diğer pH değerleri için kalan aktivite değerleri hesaplandı. Enzimlerin pH kararlılık testleri sonuçlarının ebeveyn ve mutant enzimler için yine benzer sonuçlar verdiği gözlemlendi. Yapılan analizlerle pH 6.5-10.0 aralığında enzimlerin aktivitelerinin % 80-100 oranında korudukları belirlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkisi. 4 °C'ta 7 gün ön inkübasyonun ardından farklı pH değerindeki tamponlarda elde edilen kalan aktiviteler.

3.6.3. Sıcaklık Kararlılığı

Sıcaklık kararlılığını belirlemek üzere enzimlerin, reaksiyon öncesi verilen sıcaklıklarda (5-55 °C) 30 dakika bekletildikten sonra aktivite testine alındığı çalışmada, 5 °C'ta alınan aktivite değeri % 100 kabul edildi. Ebeveyn enzimlerin, 40 °C değerine kadar aktivitelerinin yaklaşık % 80'ini koruduğu, yüksek sıcaklıklarda ise aktivite değerlerini hızla kaybettikleri gözlemlendi. 50 °C'ta, mutant enzimin aktivitesinin % 70'ini, L5 ve L21 lipazlarının ise sırasıyla, aktivitelerinin ancak % 28 ve % 19'unu koruyabildikleri gözlemlendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Ebeveyn ve mutant lipazlarının farklı sıcaklıklarda 30 dakika ön inkübasyon sonrası, ölçülen kalan aktivite değerleri.

Daha ileri analizlerde sıcaklık kararlılığı 50 °C'ta geri dönüşümsüz inaktivasyon oranının belirlenmesiyle yapıldı. Bu çalışma sonunda elde edilen 50 °C'taki $T_{1/2}$ değerleri Tablo 3.4'te gösterilmektedir. Enzimlerin yarı ömrünün ($T_{1/2}$) belirlenmesi testlerinde, saflaştırılmış enzimler 50 °C'ta 7 saate kadar tutularak test edildi. 7 saat süresince aralıklı olarak örnek alınarak lipaz aktivitesi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi. Yapılan analizlerle 50 °C'ta mutant enzimin, ebeveyn enzimlere görece yaklaşık 9 kat daha yüksek kararlılık gösterdiği belirlendi.

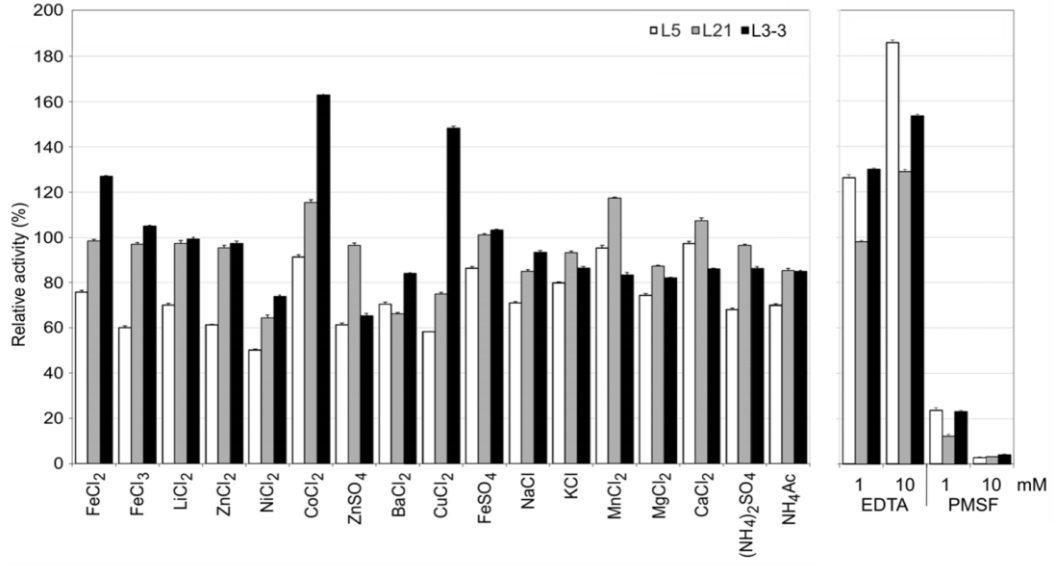
Tablo 3.4. Saflaştırılan L5, L21 ve L3-3 lipaz enzimlerinin yarılanma ömrü değerleri.

	L5	L21	L3-3
T_{1/2}, 50 °C (min)	4.20 ± 0.12	4.40 ± 0.03	38.5 ± 0.7

Yapılan DNA karıştırma sonucunda oluşan mutant kütüphaneler, lipaz aktivitesindeki artış gözetilerek tarandı. Kullanılan tarama ve seçme yöntemlerinde, enzim sıcaklık kararlılığının artışı ile ilgili herhangi bir test yapılmadı. Bu nedenle nitelendirme çalışmaları sonunda elde edilen sıcaklık kararlılığındaki artış çalışmaya ve yapısal yorumlara yeni bir bakış açısı kazandırdı.

3.6.4. Metal İyonlarının ve Çeşitli İnhibitörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Yapılan bir diğer nitelendirme çalışmasında metal iyonlarının ebeveyn ve mutant enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlendi. Çalışmada Şekil 3.12’de yer alan metal iyonları kullanıldı. Reaksiyon öncesinde enzimlerin farklı metal tuzlarıyla (10 mM) 37 °C’ta 30 dakika süreyle yüzleştirilmesinin ardından, lipaz aktivite testinin yapılmasıyla elde edilen veriler, metal iyonu içermeyen kontrole göre değerlendirildi. Bu sonuçlara göre, metal iyonlarının enzimlerin aktivitesi üzerine etkisinin ılımlı olduğu ve aktivitelerin % 50-163 arasında değiştiği gözlemlendi. En belirgin etki CuCl₂ varlığında elde edildi. Bu metal varlığında mutant enzimin aktivitesi artarken, ebeveyn enzimlerin inhibe olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte CoCl₂ ve FeCl₂ varlığında yine mutant enzimin aktivitesi önemli oranda artı (Şekil 3.12).



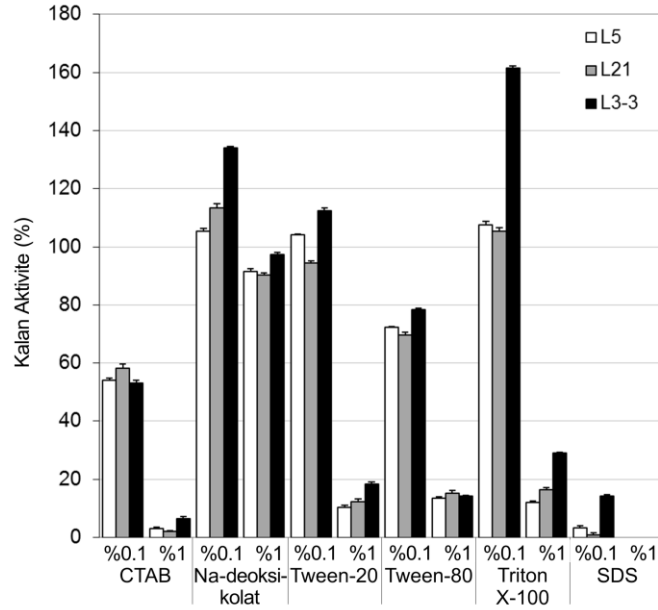
Şekil 3.12. Farklı metal ve tuz (sol), EDTA ve PMSF (sağ) varlığında elde edilen kalan aktivite değerleri. Metal ve tuzlar 10 mM; EDTA ve PMSF 1 ve 10 mM olarak kullanıldı. Hata çubukları standart sapmayı temsil etmektedir.

Çeşitli inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde 1 ve 10 mM EDTA ve PMSF kullanıldı. Enzimler inhibitörlerle 37 °C'ta 30 dakika süreyle yüzleştirildikten sonra lipaz aktivite testi yapıldı. Yalnızca enzim içeren, herhangi bir inhibitör içermeyen kontrol örneğine göre % kalan aktivite olarak hesaplandı. EDTA'nın enzim aktivitelerini azaltıcı yönde bir etkisi görülmedi. PMSF'in ise aktiviteleri güçlü bir şekilde inhibe ettiği açıkça görüldü (Şekil 3.12).

3.6.5. Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Nitelendirme çalışmalarında deterjanların enzim aktiviteleri üzerine etkileri de irdelendi. Enzimler reaksiyon öncesi % 0.1 ve % 1 oranlarında kullanılan deterjanlar ile 37 °C'ta 30 dakika süreyle yüzleştirildikten sonra, lipaz aktivite testi uygulandı. Elde edilen sonuçlar, herhangi bir deterjan içermeyen kontrole göre değerlendirildi. Na-deoksikolat dışındaki % 1 konsantrasyondaki tüm deterjanlar ebeveyn ve mutant lipazlar üzerinde inhibitor etki gösterdi. CTAB, Tween 20 ve Triton X-100 varlığında mutant enzim, ebeveyn enzimlere görece aktivitesini büyük oranda korudu. % 0.1 SDS varlığında ebeveyn enzimlerin aktivitelerini neredeyse

tamamen kaybettiği, mutant enzimin ise bu koşullarda görece daha dayanıklı olduğu sonucuna varıldı (Şekil 3.13).

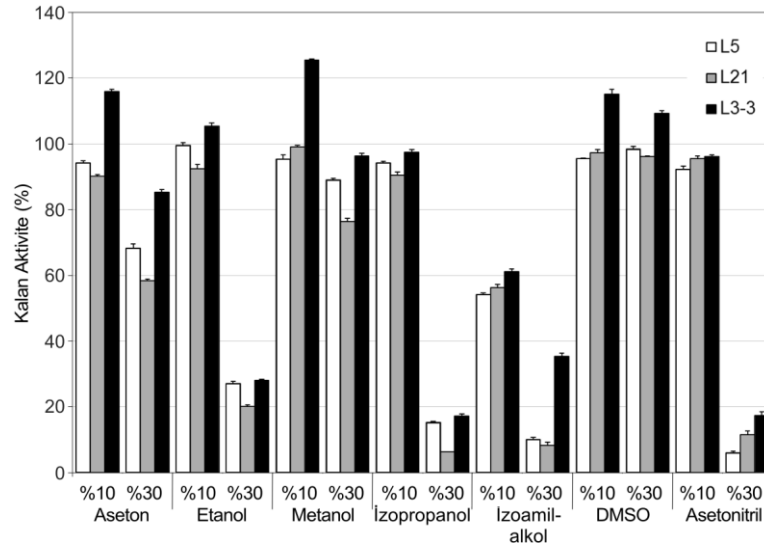


Şekil 3.13. Çeşitli deterjanlar varlığında, ebeveyn ve mutant lipazlarından elde edilen kalan aktivite değerleri. Hata çubukları standart sapmayı temsil etmektedir.

3.6.6. Organik Çözücülerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çeşitli organik çözücülerin etkisinin irdelendiği nitelendirme çalışmasında, enzimler % 10 ve % 30 oranında kullanılan organik çözücülerle reaksiyon öncesinde 37 °C'ta 30 dakika yüzleştirildikten sonra lipaz aktivite testi yapıldı. Sonuçlar yalnızca enzim içeren kontrol örneğine göreceli olarak değerlendirildi ve kalan aktivite değerleri hesaplandı.

Organik çözücülerin etkisine bakıldığında % 30 etanol, izopropanol, izoamil alkol ve asetonitril varlığında enzim aktivitelerinin oldukça azaldığı gözlemlendi. Birçok durumda mutant enzimin aktivitesini, ebeveyn enzimlere görece yüksek oranda koruduğu belirlendi (Şekil 3.14).

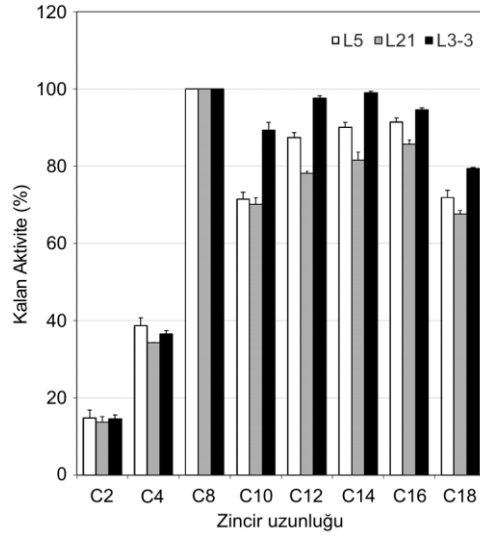


Şekil 3.14. Çeşitli organik çözücüler varlığında, ebeveyn ve mutant lipazlarından elde edilen kalan aktivite değerleri. Hata çubukları standart sapmayı temsil etmektedir.

3.6.7. Enzimlerin Substrat Özgüllüğünün Belirlenmesi

Substrat özgüllüğünün belirlenmesi için yapılan deneylerde farklı zincir uzunluğundaki (C2-C18) *p*NP yağ açıl esterleriyle aktivite testleri yapıldı. En yüksek aktivite değeri *p*NP oktanoik yağ açıl ester ile yapılan lipaz aktivitesi ile elde edildi. Veriler en yüksek aktivitenin alındığı substrata görece yüzde değer olarak belirlendi.

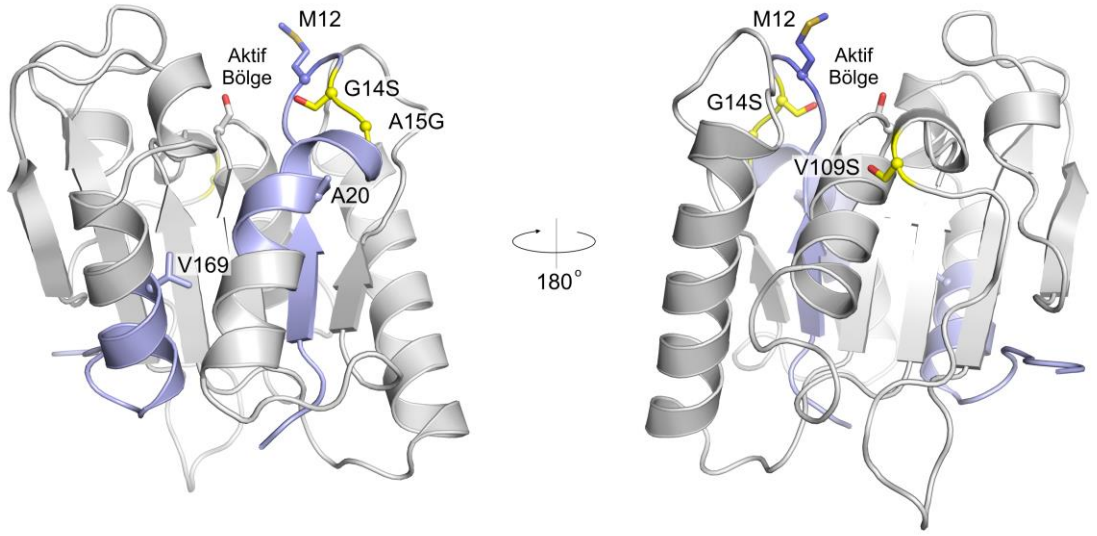
Yapılan testler sonunda ebeveyn ve mutant enzimler çok küçük farklılıklar ortaya koydu. Mutant lipazın, ebeveyn lipazlara görece uzun zincirli triaçilgliserolleri az da olsa daha yüksek oranda tercih ettiği belirlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Ebeveyn ve mutant enzimlerin farklı zincir uzunluğundaki *pNP* yağ açıl esterlerine karşı substrat özgüllüğü. C2 (asetik), C4 (bütirik), C8 (oktanoik), C10 (dekanoik), C12 (laurik), C14 (miristik), C16 (palmitik) ve C18 (stearik). En yüksek aktivitenin alındığı substrata (*pNP* oktanoik yağ açıl ester (C8)) görece yüzde değer olarak belirlendi. Hata çubukları standart sapmayı temsil etmektedir.

3.7. Modelleme Çalışmalarından Elde Edilen Yapısal Bulgular

B. pumilus L5 ve L21 klonları ile L3-3 mutant lipazı dizilerinin FFAS03 sunucusu kullanılarak gerçekleştirilen analizi sonucu, bu enzimlerin yine aynı alt aileye ait (alt aile I.4) *B.subtilis* lipaz A ile en yüksek dizi homolojisine sahip olduğu gözlemlendi. *B. pumilus* ebeveyn ve mutant lipazları, *B. subtilis* lipaz A'dan 38, 39 ve 40. pozisyonlarda, sırasıyla % 79, % 78 ve % 78 dizi benzerliği ile farklılık göstermektedir. *Bacillus pumilus* L3-3 mutant lipazı (Şekil 3.16) ile L5 ve L21 ebeveyn lipazlarının Phyre (Kelley, 2009) ile oluşturulan üç boyutlu modellerinden güvenilir değerler elde edildi.



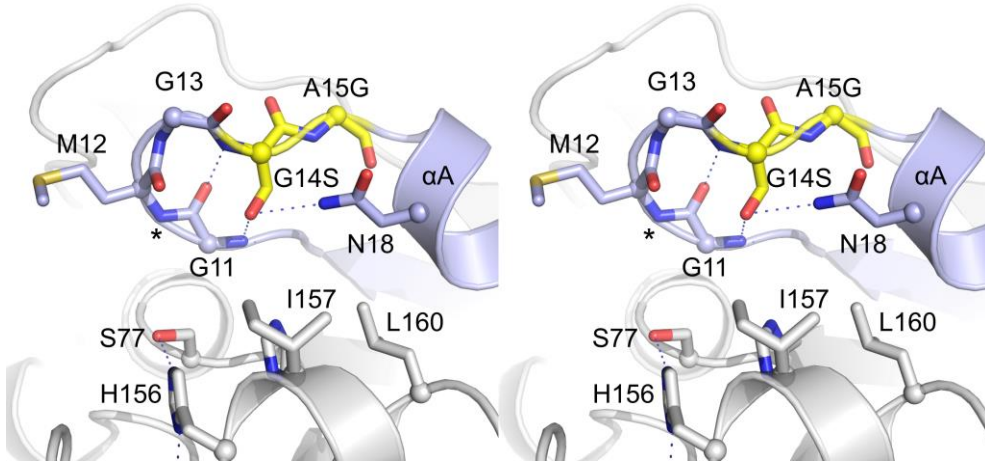
Şekil 3.16. *B. pumilus* L3-3 mutant enziminin Phyre (Kelley ve Sternberg, 2009) ile oluşturulan üç boyutlu modeli. Ebeveyn L21’den türevlenen N- ve C- terminal polipeptit segmentler içerisindeki üç kimerik farklılık (M12, A20 ve V169) mavi renk ile gösterilmiştir; gri renk ile gösterilen orta segment ebeveyn L5’den türetilmiştir. G14S, A15G ve V109S nokta mutasyonları sarı karbon atomları olarak belirtilmiştir. Aktif bölgede bulunan S77 katalitik rezidüsü de gösterilmiştir.

B. pumilus lipazları ve *B. subtilis* lipaz A arasında gerçekleştirilen dizi hizalama “alignment” (Şekil 3.3) çalışmaları, hizalanan diziler arasında herhangi bir ekleme “insersiyon” veya boşluk “gap” bulunmadığı durumda, L3-3 ve LipA arasında 40 rezidü farklılığı olduğunu ortaya koymaktadır. Gözlemlenen 40 rezidü farklılığının yaklaşık yarısı homolog değişimlerdir ve 35 tanesinin yan zincirleri enzimin yüzeyinde, çözücüyle temas halinde olan kısımlarda konumlanmaktadır; geri kalan rezidü farklılıkları ise enzimin hidrofobik “core” unda yerleşmiş bulunmakta ve en çok bir metil grubu içermektedir. Enzimler arasındaki dizi farklılıklarının yaklaşık olarak yarısının (21 tanesi) ikincil yapı birimleri (α -sarmallar ve β -iplikler) içerisinde, diğer yarısının ise luplar ve 3_{10} -heliksler içerisinde bulunduğu belirlendi. L5 ve L21 ebeveyn enzimleri arasındaki kimerik farklılıklar ile G14S, A15G ve V109S özgün mutasyonlar üzerinde özellikle duruldu. L3-3 mutasında G14S mutasyonu Phyre ile modellendi, N18 rezidüsünün yan zinciriyle yakın temas kurabilecek uygun olmayan (unfavourable) bir serin yan zincir rotameri gözlemlendi;

bundan dolayı farklı bir yan zincir rotameri seçildi. Değiştirilen diğer rezidülerin hiçbirinde ciddi uyuşmazlık sorunları belirlenmedi. L3-3 mutant ile L5 ebeveyn arasındaki üç kimerik farklılık ile L3-3 mutantındaki üç özgün nokta mutasyonundan aşağıda bahsedilmektedir.

Kimerik Farklılıklar (M12, A20 ve V169)

Altı rezidüden (10-15 rezidüleri) oluşan bir lupun uç kısmında bulunmakta olan rezidü 12, iplik $\beta 3$ ve heliks $\eta 1/\alpha A'$ 'yı birbirine bağlamaktadır (Şekil 3.17). Bu rezidünün yan zinciri çözücüye maruz kaldığından, izolösünün metiyonine kimerik değişimi enzim ile substrat arasında oluşan hidrofobik ve van der Waals etkileşimlerinin güçlenmesini sağladığı düşünülmektedir. Rezidü 20, heliks αA 'nın başında, aktif merkezden 16 Å uzaklıkta bulunmaktadır ve çözücüyle temas halinde olan bir yan zincire sahiptir. Bu pozisyondaki bir fenilalaninin alanine değişimi, enzim yüzeyinin hidrofobisitesi ile yüksek sıcaklıklardaki agregasyon eğilimini önemli oranda azaltacaktır. Rezidü 169 heliks αF içerisinde yerleşiktir; bu rezidünün yan zinciri enzimin hidrofobik kısmında (Şekil 3.16) aktif merkezden uzakta bulunmaktadır. Bu pozisyonda izolösün valin değişimi (bir metil grubu) enzimin iç kısımdaki lokal katlanmanın hafifçe değişmesine sebep olabileceğini düşündürdü.



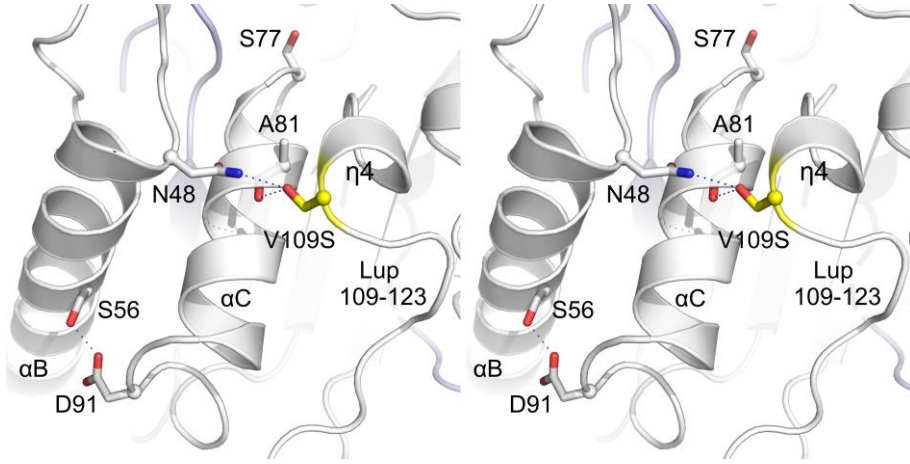
Şekil 3.17. L3-3 mutant modelin stereo figürleri. Nokta mutasyonları sarı karbon atomları ile gösterilmektedir. Hidrojen bağı etkileşimleri mavi noktali çizgiler ile temsil edilmektedir. İplik $\beta 1$ ve sarmal αA 'yı birbirine bağlayan $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lup (10-15 rezidüleri) içerisindeki nokta mutasyonları G14S ve A15G. S14 O γ atomu, heliks αA 'daki N18'in N $\delta 2$ atomu ve G11'in ana zincir azot atomu ile hidrojen bağı etkileşimine sahiptir. G11O ve G14N arasındaki β -dönüş hidrojen bağı etkileşimleri ayrıca gösterilmektedir. $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lupu substrat bağlayıcı yarığın bir tarafında, substratın "leaving group"unun bağlanabileceği kısımda bulunmaktadır. Aktif bölgenin bu kısmını çevreleyen bazı rezidüler (I157, L160) ve nükleofilik serin rezidüsü (S77) "stick representation" olarak gösterilmektedir. Oksianyon deliğinin bir kısmını oluşturan rezidü M12'nin ana zincir azot atomu asterisk ile gösterilmiştir (*).

Nokta Mutasyonları (G14S, A15G ve V109S)

Rezidü 14, $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lup (10-15 rezidüleri) içinde substrat bağlayıcı yarığın bitişiğinde bulunmaktadır (Şekil 3.17). Bu bölgeye serin yan zinciri girişinin, ana zincir torsiyon açısı ($\phi = -86^\circ$, $\psi = -171^\circ$) üzerine bir etkisi olmamakla birlikte, bu eklenti lokal yüzey polaritesini artırdı. Ayrıca bu durum lup içerisinde iki yeni hidrojen bağının kurulması ihtimalini güçlendirmektedir. G11'in ana zincir azot

atomu ve N18'in N82 atomu ile G11'in ana zincir oksijen atomu ile S14 ana zincir azot atomu arasındaki β -dönüş hidrojen bağı etkileşimi korunmaktadır.

Rezidü 15 mutasyonu, β 3- η 1/ α A lupuna (Şekil 3.17) üçüncü bir glisin rezidüsünün girişine neden olmaktadır. Ebeveyn *B. pumilus* enzimlerinde (*B. subtilis* LipA olduğu gibi), 15. pozisyonundaki alanin yan zinciri çözücüye doğru uzanmakta, substrat bağlayıcı yarığın kenarında Y17'nin yan zinciri ile hidrofobik yüzey "patch"i kurmaktadır. L3-3 mutant enziminde metil grubunun yokluğu lokal yüzey hidrofobisitesini düşürmektedir. Rezidü 109 enzimin yüzeyinde, 3_{10} heliks η 4'in devamında konumlanmaktadır (Şekil 3.18). *B. pumilus* ebeveyn lipazı L5 ve L21'in her ikisinde de 109. rezidü valindir ve bu rezidünün bir serin ile değişimi lokal yüzey hidrofobisitesini azaltmaktadır. Serin hidroksil grubu ayrıca, *B. subtilis* lipaz A'da karşılığı olan treonine benzer şekilde iki hidrojen bağının kurulmasını sağlamaktadır. Rezidü A81'in (heliks α C içersindeki) ana zincir oksijen atomu ile birinci, heliks α B'nin N-terminal rezidüsü N48'in N82 atomu ile de ikinci hidrojen bağı oluşturabilir.



Şekil 3.18. L3-3 mutant modelin stereo figürleri. Nokta mutasyonları sarı karbon atomları ile hidrojen bağı etkileşimleri mavi noktalı çizgiler ile gösterilmektedir. (b) V109S nokta mutasyonu; yan zinciri, heliks αB 'nin N-terminal rezidüsü olan N48'in N δ 2 atomu ve A81'in (heliks αC içindeki) ana zincir oksijen atomu ile direkt hidrojen bağları kurmaktadır. Uzun αB heliksi yalnızca S56 ve D91 arasında bir direkt hidrojen bağı kurabilmektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimler tüm canlı hücrelerde reaksiyonları yöneten, organizmaların yaşamasını ve çoğalmasını sağlayan, gıda, deterjan, ecza, tekstil, kağıt, deri ve kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda kullanılan katalizörlerdir. Enzimlerin kullanımı, endüstriyel anlamda önemli oranda maliyeti düşüren bir etki gösterir. Birçok uygulama alanında yaygın olarak kullanılan enzimler, ticari olarak üretilmektedir. Enzimler, hücrelerdeki özgül biyokimyasal reaksiyonlardaki görevlerinin yanı sıra kimyasal katalist olarak da kullanılmaktadırlar. Toksik atıkların azalmasına yardımcı olan enzimler büyük ölçekteki üretim proseslerinde de etkin olarak görev almaktadırlar (Beilen ve Li, 2002; Jaeger ve ark., 2002).

Enzimler oluşumu milyonlarca yıl alan biyolojik evrimin ürünleridir. Sahip oldukları olağandışı özgüllük ve katalitik güç gibi özelliklerinden ötürü önemli biyomoleküllerdir. Enzimlerin kullanıldığı prosesler çok eski zamanlara dayanmaktadır. Bakteri ve ökaryotik organizmalar tarafından üretilen enzimler, birçok biyoteknolojik uygulama alanında etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Enzimler genel olarak, oda sıcaklığında sulu ortam, atmosferik basınç ve nötral pH gibi ılımlı koşullar altında çalışırlar. Endüstriyel anlamda önem taşıyan enzimler genellikle mikrobiyal kökenlidir. Endüstriyel enzim pazarında en önemli yeri, proteaz, lipaz, amilaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimler almaktadır. Kimyasal proseslere göreceli olarak, enzim kullanılan süreçlere olan ilginin artmasının nedenleri arasında, enzimatik reaksiyonların yüksek özgüllüğü ve kullanılan ılımlı reaksiyon koşulları sayılabilir (Pandey ve ark., 1999; Houde ve ark., 2003; Sharma ve ark., 2001).

Endüstriyel anlamda büyük önem taşıyan lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar, EC 3.1.1.3), gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden türetilen esterlerin, sentez ve hidrolizini kataliz eden enzimlerdir. Lipazların aktif bölgelerinde, Ser-Asp/Glu-His dizisini içeren korunmuş, katalitik bir üçlü bulunur. Bu yapı serin proteazlarda da aynı niteliktedir. Serin rezidüsü iyi korunmuş Gly-X-Ser-X-Gly motifinde yer alır. Lipazların, üç boyutlu yapıları α/β -hidrolaz ailesi için tipik olan α/β -hidrolaz katlanması gösterir (Jaeger ve Reetz., 1998; Sharma ve ark.,

2001; Gupta ve ark., 2004). Bakteriyel ve fungal orijinli mikrobiyal lipazların ticari kullanımı, birçok farklı uygulamayı kapsamaktadır. Bu enzimler deterjan ve gıda endüstrisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte lipazlar, kağıt endüstrisi, farmasötik endüstri, sentetik organik kimya gibi diğer uygulamalarda da kullanılmaktadır. Lipazlar üzerindeki büyük ilginin nedeni bu enzimlerin sahip olduğu enantiyo seçicilik, bölge seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özelliklerdir (Gupta ve ark., 2004; Jaeger ve Eggert, 2002; Reetz, 2002).

Biyoteknolojik uygulamalarda sıkça kullanılan bakteriyel ve fungal kaynaklı lipazların yanı sıra, bu enzimler çeşitli bitki ve hayvanlar tarafından da üretilirler ve yeryüzü flora ve faunasında geniş bir yere sahiptirler (Pandey ve ark., 1999; Gupta ve ark., 2004).

Doktora tez çalışması kapsamında, GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubunun daha önce yaptığı çalışmalarla Balıkesir (Gönen Dağ Ilıcası) ve Bursa (Yeni Kaplıca) yöresinden izole edilen, lipaz aktivitesi yönünden taranan *Bacillus* sp. L5 ve L21 soyları biyolojik kaynak olarak kullanılmıştır. Bu soyların tiplendirilmesinde, ilk basamakta sahip oldukları morfolojik ve biyokimyasal özelliklere göre klasik tiplendirme çalışmaları yapılmış ve olası tür isimleri tayin edilmiştir (Tuzlakoğlu ve ark., 2003). Daha ileri düzeyde tiplendirme çalışmaları, TÜBİTAK 1001 projesi (105T188) kapsamında moleküler temelli birçok yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir (İşsever Öztürk ve ark., 2008). Yapılan klasik ve moleküler temelli tiplendirme çalışmaları sonunda L5 ve L21 soyları *Bacillus pumilus* olarak tanımlanmıştır.

Bacillus cinsi, ekonomik üretim kapasitesine sahip, kolay ve yüksek hızda üreyen, farklı karbon ve nitrojen kaynaklarını kullanabilen, yüksek verimde ürün oluşturan bakterilerdir. Bulunduğu kültür ortamına hücre dışı enzim salgılayabilme yeteneğine sahiptirler. Tüm bu özelliklerden ötürü, *Bacillus* cinsi biyoteknolojik olarak büyük önem taşımakta ve birçok endüstriyel süreç için enzim kaynağı olarak etkin bir biçimde kullanılmaktadır (Sneath, 1986; Harwood, 1992).

Bakteriyel lipolitik enzimler endüstriyel anlamda büyük öneme sahiptirler. Bu enzimlerin gerçek lipazlar (E.C.3.1.1.3) olarak sınıflandırılmasında iki kriter kullanılır. İlk kriter; enzim, su-yağ ara yüzeyinde aktif olmalıdır ve aktivite emülsifiye trigliserit substrat varlığında artmalıdır. Bu fenomen “interfacial activation” (yüzeylerarası aktivite) olarak tanımlanmaktadır (Verger, 1997). İkinci kriter; enzim, bir kapağa “lid” sahip olmalıdır. Bu kapak yapısı proteinin yüzey lupu olarak tanımlanır ve görevi aktif bölgeye erişimi kontrol etmektir (Holmquist, 2000). Ancak bu iki kriterin sınıflandırma için uygun olmadığı gerçeği ortaya çıkmıştır. Çünkü yapılan çalışmalarda *B. subtilis* lipaz A ve *Fusarium solani* kütinaz gibi enzimlerin kapak yapısına sahip olmadıkları ve yüzeylerarası aktivite göstermedikleri belirlenmiştir (Martinez ve ark., 1994; Pouderoyen ve ark., 2001). Günümüzde lipazlar, uzun zincirli açıl gliserollerin hidrolizini katalizleyen karboksilesterazlar olarak tanımlanmaktadır. Açıl zincir uzunluğu 10 karbon atomundan daha uzun olan gliserol esterler, lipaz substratları olarak kabul edilirler (Jaeger ve ark., 1999).

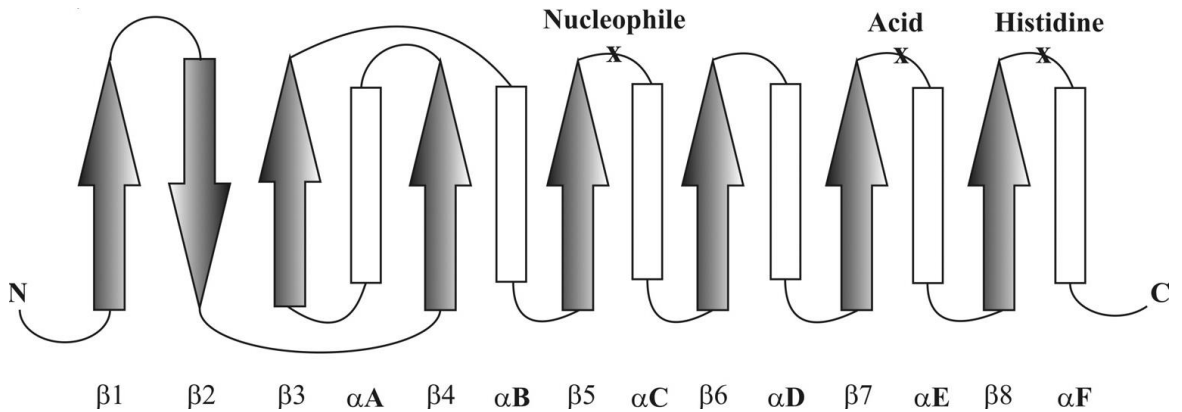
Birçok lipaz enzimi kapak olarak nitelendirilen yapısal bir özelliğe sahipken, *B. subtilis* LipA böyle bir yapı içermemektedir. Bu nedenle de aktif bölge solvente maruz kalmaktadır. *B. subtilis* 168 Lipaz A (LipA), yüzeylerarası aktivite göstermemesi ve bir kapak yapısı içermemesinden dolayı özel bir ilgi görmektedir. 181 amino asit rezidüsünden oluşan, 19 kDa moleküler büyüklüğe sahip LipA, minimal α/β katlanması gösteren enzimlerdendir. *Fusarium solani* kütinazı da aynı özellikleri taşımaktadır (Pouderoyen ve ark., 2001; Boersma ve ark., 2008).

Bakteriyel lipazlar sahip oldukları amino asit dizi homolojisine göre tanımlanırlar. Sekiz farklı aile altında gruplandırılmışlardır. Gerçek lipazları içeren Aile I, *Pseudomonas* lipazları, *Bacillus* ve *Staphylococcus* lipazlarını içermektedir. İkinci grup yani Aile II, geleneksel pentapeptit (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) yapısı yerine Gly-Asp-Ser-(Leu) motifine sahiptir. *Streptomyces scabies*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* lipazlarını bu gruba örnek verebiliriz. Aile III’e baktığımızda *Streptomyces albus* ve *Moraxella* lipazlarını görmekteyiz. Aile IV üyeleri, memeli hormona duyarlı olan lipazlarla büyük oranda dizi homolojisine sahiptirler. Aile V’te, mezofilik bakterilerin yanı sıra soğuğa dayanıklı ve sıcakta

yaşayabilen bakteriler yer almaktadır. Aile VI, moleküler ağırlığı 23-26 kDa olan en küçük esterazlar olarak bilinirler. Aile VII’de ise daha büyük moleküler ağırlığa sahip bakteriyel esterazları görmekteyiz. Son olarak Aile VIII’i oluşturan üç enzim, yaklaşık 380 amino asit uzunluğundadır ve değişik C sınıfı β -laktamazlara büyük oranda benzerlik gösterirler (Arpigny ve Jaeger, 1999).

Tez çalışmasında biyolojik kaynak olarak kullanılan *Bacillus pumilus* L5 ve L21 soylarının ürettiği lipazlar, *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Staphylococcus* gibi gerçek lipazların yer aldığı Aile I içinde sınıflandırılırlar. Yapılan dizi analizi çalışmalarıyla elde edilen veriler çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak değerlendirilmiş ve L5 ile L21 *B. pumilus* soylarının lipaz gen dizilimlerinin aynı aile (Aile I) içinde yer alan ve 3 boyutlu yapısı çözülmüş olan *B. subtilis* Lip A ile karşılaştırma çalışmaları yapılmıştır. Her iki ebeveyn lipaz enziminin *B. subtilis* lipaz A (Pouderoyen ve ark., 2001) ile protein düzeyinde % 78 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Bakteriyel lipazlar sekiz aileye ayrılmış olsalar da yüksek yapısal homoloji göstermektedirler. Aydınlatılan farklı üç boyutlu yapıların tümünde α/β hidrolaz katlanması adı verilen karakteristik bir katlanma modeline (Şekil 4.1) rastlanmıştır (Ollis ve ark., 1992).



Şekil 4.1. α/β hidrolaz katlanmasının şematik gösterimi.

Lipaz çekirdeği, altı taneye varan α -sarmal ile birbirine bağlanan sekiz kadar farklı β -ipliğin oluşturduğu merkezi β -tabakayı içermektedir. Aktivite, genellikle bir serin, bir aspartat (ya da glutamat) ve bir histidinin bu sırayla dizilmesiyle oluşmuş bir katalitik üçlüye dayanmaktadır. Serin rezidüsü çoğu zaman Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly korunmuş pentapeptidinde bulunmaktadır ve nükleofilik dirsek adı verilen karakteristik β -dönüş- α -motifi ortaya çıkmaktadır. Substratın hidrolizi, serin rezidüsünün ester bağının karbonil karbon atomuna nükleofilik atağı ile başlayarak, ana zincir azot atomları ile hidrojen bağları kurmasıyla stabilize olan tetrahedral ara ürün oluşumu ile devam etmektedir. Bu rezidüler, katalizlenen tepkimenin geçiş fazını stabilize eden hidrojen bağı donörlerinin uzaysal dizilimleriyle oluşan ve oksianyon oyuğu adı verilen yapıyı oluşturmaktadır. Bir alkolün serbest bırakılmasıyla oluşan açıl-lipaz kompleksi, yağ asitinin serbest bırakılması ve enzimin rejenerasyonu ile hidrolize olur (Holmquist, 2000; Jaeger ve Reetz, 1998).

Endüstriyel olarak kullanılan çoğu lipaz enziminin aktivasyon için spesifik şaperonlara ihtiyaç duyması, heterolog konakçılarda ifade edilmelerini zorlaştırmaktadır. Homolog bir konakçının kullanımı ise, pek çok soyun (“generally recognised as safe” (GRAS)) niteliği taşımayan organizmalar olmasından dolayı genellikle tercih edilmemektedir. Ancak *Bacillus subtilis* lipaz A enzimi önemli bir istisnadır, özgül şaperonlara gereksinimi yoktur ve bir GRAS organizma olan *Bacillus*'da yüksek oranda üretilabilmektedir (Pouderoyen ve ark., 2001).

Bir gram pozitif bakteri olan *Bacillus subtilis*, aralarında lipaz A (LipA) ve lipaz B (LipB) olmak üzere iki lipolitik enzimin de yer aldığı bir kaç ekstraselüler enzim üretebilmektedir (Eggert ve ark., 2001). LipA geni ilk kez 1992'de Dartois ve arkadaşları tarafından homolog konakçıya klonlanarak dizilenmiştir. Kültür üst sıvısından enzimin saflaştırılması sonucu bu enzimin 181 amino asitten oluştuğu ve 19.3 kDa moleküler ağırlığında olduğu belirlenmiştir (Dartois ve ark., 1992). Dikkat çekici biçimde bu enzimin G-X-S-X-G korunmuş pentapeptidinin birinci pozisyonunda glisin yerine bir alanin bulunduğu belirlenmiştir.

LipA'nın alkali pH'da pH 12.0 değerine kadar maksimum kararlılığa sahip olduğu ve optimal pH'sının pH 10.0 olduğu gözlemlenmiştir. Katalitik üçlüsü S77, D133 ve H156'dan oluşmaktadır. Enzim *p*-nitrofenil esterleri hidroliz edebilmekte, öncelikli olarak kaprilat esterlere yönelmektedir (Pouderoyen ve ark., 2001; Dartois ve ark., 1994; Lesuisse ve ark., 1993).

B. subtilis Lip A'nın yapısına ve taşıdığı özelliklere bakıldığında bir çok noktada, L3-3 mutanti ile benzerlikler taşıdığı kanısına varılmıştır. Bu durumda elde edilen en büyük avantaj, *B. subtilis* Lip A'nın kristal yapısının aydınlatılmış olması ve bu nedenle de L3-3 hakkında daha detaylı tespitlerde bulunulabilmesidir.

GYTE Enzim Moleküler Genetiği Grubunun yaptığı klasik ve moleküler tiplendirme çalışmaları sonucunda elde edilen verilerden, lipaz kodlayan genlerin çoğaltılması çalışmalarında kullanılan oligonükleotitlerin tasarlanmasında yararlanılmıştır. Genomik DNA izolasyonunun ardından, bu primerler yardımıyla lipaz genleri çoğaltılarak, “InsTAclone PCR Cloning kit (Fermentas)” kiti yardımıyla TA klonlama yapılmıştır. Tez çalışmasının biyolojik kaynağını oluşturan yerel *Bacillus* sp. soyları primerler ile farklı PCR koşullarında çoğaltılmıştır. PCR çalışmalarıyla elde edilen 170 bp, 220 bp, 550 bp, 648 bp, 700 bp ve 900 bp büyüklüğündeki PCR ürünlerinin klonlanması aşamasında “InsTAclone PCR Cloning kit (Fermentas)” kullanılmıştır.

TA sistemi ile klonlama, araştırma laboratuvarlarındaki kullanımlarının yanı sıra, ticari anlamda da sıklıkla kullanılan bir stratejidir. TA klonlama, *Taq* DNA polimerazın terminal transferaz özelliğinden yararlanan bir sistemdir. Bu sistem PCR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan en etkili yöntemler arasında anılmaktadır. Literatürde bu yöntemle yapılmış, birçok klonlama çalışmasına rastlanmaktadır (Palatinszky ve ark., 2011; Peng ve ark., 2007).

Tez projesi kapsamında yapılan klonlama çalışmaları, ilk aşamada yapılan restriksiyon endonükleaz kesimleri ile doğrulanmıştır. Klon adaylarının nükleotit dizisi, CEQ 8000 otomatik dizi analiz sistemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar

NCBI GeneBank veritabanındaki sonuçlarla karşılaştırılarak klonlar doğrulanmıştır. Biyoinformatik çalışmaları sonucunda, klonlanan altı farklı büyüklükteki PCR ürünlerinden yalnızca 648 bp büyüklüğünde olan parçanın lipaz gen dizilimi taşıdığı belirlenmiştir. Sonrasında yapılan ekspresyon çalışmalarıyla da yalnızca 648 bp büyüklüğündeki parçayı taşıyan klonların lipaz aktivitesi verdiği doğrulanmıştır. Çalışmalarda hücre dışı ve hücre içinden alınan örneklerde lipaz aktivitesi bulunmuştur.

TA klonlamayı takiben, 648 bp büyüklüğündeki lipaz genleri pUC19 ekspresyon vektörüne alt klonlanmıştır. Yine bu klonlama çalışması, RE kesimleri ve ekspresyon çalışmaları ile doğrulanmıştır. pUC19 vektörüne yapılan klonlama sonucunda, hücre içinde kalan enzim miktarı neredeyse ihmal edilebilir bir düzeye gerilemiştir. Lipaz geninin bu vektör üzerindeki ifadesinde, enzimi tamamen besi yerine salgıladığı saptanmıştır.

Doktora tez çalışmasında iki farklı ligasyon bağımlı klonlama yöntemi kullanılmıştır. Bunlar ilk aşamada kullanılan TA klonlama ve ikinci aşamada (alt klonlama) kullanılan yapışkan uçlu klonlamadır. Alt klonlama çalışması, seçilmiş klonlarla yapılacak protein ekspresyon çalışmaları için pUC19 vektörü kullanılarak yapılmıştır. Yapışkan uçlu klonlamada, ilgili restriksiyon enzimleriyle kesim sonrası PCR ürünlerinin uçlarında yapışkan uçlar oluşturulur ve kesilmiş PCR ürünleri ile vektörler birleştirilebilir (Guo ve Bi, 2002).

pUC19 klonlamada yaygın olarak kullanılan bir *E. coli* vektörüdür. Halkasal, çift iplikli, 2686 baz çifti uzunluğundaki plazmit, pMB1 replikasyon orijini taşır ve pBR322'den türevlenmiştir. Yüksek kopya sayısından dolayı klonlamada oldukça sık tercih edilen pUC19, seçici belirteç olarak ampisilin direnç geni taşır (Yannish-Perron ve ark., 1985).

Doktora tez projesi kapsamında mutant kütüphanelerin hazırlanması çalışmalarında, bir yönlendirilmiş evrim yaklaşımı olan “DNA shuffling” DNA karıştırma, yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem son yıllarda enzimlerin özelliklerinin

iyileştirilmesinde etkin bir biçimde kullanılmaktadır. Lipaz gen dizilimleri doğrulanmış, enzim aktivitesi yönünden taranmış, 648 bç büyüklüğündeki gen parçasını taşıyan 10 farklı klon, DNA karıştırma çalışmalarına alınarak mutant kütüphaneler elde edilmiştir.

Enzimlerin biyokatalizde kullanımları çoğu zaman katalizledikleri doğal tepkimeler yerine doğal olmayan substratların kullanımına dayanmaktadır. Bununla birlikte reaksiyon sistemi, enzimin doğada evrildiği ortamda olduğu şeklinden büyük ölçüde farklılık gösterebilmektedir. Bu yüzden aktivite, kararlılık, substrat özgüllüğü ve enantiyoseçiciliğin iyileştirilmesi ihtiyacı oldukça sık ortaya çıkmaktadır (Borncheuer, 2005; Dalby, 2003). Enzimlerin yapı-işlev ilişkileri üzerinde derin bilgi gerektiren bir teknik olan akılcı tasarım, yeni enzim özellik ve işlevlerinin oluşturulmasında başvurulan bir yöntemdir. Son yıllarda, yabancı tip enzimlerin endüstriyel biyokatalizörler olarak kullanımlarının önündeki sınırlamaların giderilmesi amacıyla etkin bir yöntem olarak yönlendirilmiş evrim ortaya çıkmıştır (Farinas ve ark., 2001; Arnold ve Moore, 1997). Bu yöntemde, yapı bilgisine ihtiyaç duyulmadan enzimin özellik ve işlevleri kolaylıkla düzenlenebilmektedir. Yönlendirilmiş evrim yöntemi ile bir takım enzimlerin karakteristikleri değiştirilmiştir (Johannes ve Zhao, 2006).

Günümüze değin başlangıç genlerinde mutasyonlar oluşturmak için çok çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Farklı moleküler kütüphanelerin oluşturulmasına yönelik yöntemler ise çeşitlenmeye devam etmektedir. Bunlar nokta mutasyonlarını temel alanlar ve rekombinasyona dayananlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Oligonükleotide yönlendirilmiş randomizasyon ve hataya eğilimli PCR birinci kategorideki yöntemlere örnek olarak verilebilir. Kural olarak bu yöntemler, belirli bir pozisyonda 20 farklı amino asidin tümünü içeren bir mutant kütüphanesinin oluşturulmasını sağlamaktadır (Wong ve ark., 2006; Wang ve ark., 2006). Rekombinasyondan köken alan ikinci yöntemde ise, DNA'nın kesilip tekrar birleştirilmesi yoluyla yeni kombinasyonlar ortaya çıkarılmaktadır. DNA karıştırma yöntemi farklı genlerdeki yararlı mutasyonların biriktirilmesine izin vermektedir (Stemmer, 1994).

Geçtiğimiz son yıllarda enzimlerin sahip oldukları büyük endüstriyel potansiyel açık biçimde anlaşılmıştır. Enzimler sıradışı özgülükleri ve katalitik kuvvetleri ile en çok öne çıkan biyomoleküller arasındadır (Kaur ve Sharma, 2006). Belirli enzimatik transformasyonların özgülükleri ve seçicilikleri (enantiyo- ve bölge-) bunları ince kimyasalların ve farmasötik ara ürünlerin üretimi için elverişli kılmaktadır. Bugüne kadar geniş çeşitlilikteki uygulama alanlarında enzimler kullanılarak 500’den fazla ürünün üretimi gerçekleştirilmiştir. Bununla beraber pek çok durumda doğal enzimler, doğal evrim süreçleri boyunca endüstriyel prosesleri hızlandırmaktan çok, başka bir amaca hizmet ettiklerinden dolayı, kullanıldıkları uygulama alanında gerekli olan tüm nitelikleri taşımamaktadırlar. Yönlendirilmiş evrim, bu sınırlamaları aşmak için enzimlerin özelliklerinin sürecin gereksinimlerine adapte edilmesinde kullanılan güçlü ve çok amaçlı bir araçtır. Bu yöntemle, evrim deney tüpünde tekrar ederek, hedeflenen özelliklere sahip iyileştirilmiş varyantların belirlenmesi için mutagenез ve rekombinasyon ile seçim veya taramayı birleştirmektedir. Enzim özellik ve işlevlerinin yapı bilgisine ihtiyaç duyulmadan kolaylıkla düzenlenebilmesi bu yöntemin başlıca avantajıdır. Teknik, temelde iki basamaktan oluşmaktadır; birincisi, enzimi kodlayan genlerin mutagenезidir. Proteinin arzulanan özelliğinde iyileşme gösteren varyantın bulunabileceği genişlikte bir varyant kütüphanesinin oluşturulması için başlangıç geninde yeterli çeşitlilik oluşturulmalıdır. İkinci olarak, varyantlar arzulanan özelliği taşımaları açısından incelenirler veya bir sonraki yönlendirilmiş evrim turu için kaynak olarak kullanılırlar (Bornscheuer, 2005; Dalby, 2003). Bundan dolayı yönlendirilmiş evrimin nihai amacı tekrarlı mutagenез ve identifikasyon ile iyileştirmelerin biriktirilmesidir. Yönlendirilmiş evrim yöntemi ile bir takım enzimlerin karakteristikleri başarılı bir şekilde değiştirilmiştir (Johannes ve Zhao, 2006; Kaur ve Sharma, 2006).

Doktora tez çalışmasında yönlendirilmiş evrim yaklaşımlarından biri olan DNA karıştırma ile mutant kütüphaneler oluşturulmuş ve bu kütüphaneler artan lipaz enzim aktivitesi yönünden taranmıştır. Bu yöntemde, rastgele fragmanların oluşturulması için yapılan DNase I kesimi, Lorimer ve Pastan tarafından 1995’de yapılan bir çalışmada yer aldığı gibi Mn^{2+} varlığında gerçekleştirilmiştir (Lorimer ve Pastan, 1995). Bir sonraki aşama olan DNA karıştırma basamağında ise Stemmer

metodu izlenmiştir (Stemmer, 1994). “Self-reassembling” PCR ürünü, dilue edilerek, tam boy PCR ürününün elde edileceği PCR çalışmasında kalıp olarak kullanılmıştır (Zhao ve Arnold, 1997).

DNase I ile DNA fragmanlarının rastgele kesilmesi aşamasında birçok optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda farklı enzim ve DNA konsantrasyonları ile rastgele fragmanlar oluşturulmuştur. Ayrıca enzim kesim sıcaklığı ve kesim sürelerinde de birçok parametre denenmiştir. Tüm bu çalışmalar büyük ölçekte DNA gereksinimi doğurduğu için, çalışmalarda plazmit DNA yerine, plazmit DNA üzerinden PCR aracılığıyla çoğaltılan DNA’lar kullanılmıştır.

İlgili DNA’ların, DNase I ile rastgele kesilmesinin ardından elde edilen fragmanlar jel elektroforez yöntemiyle ayrıldıktan sonra, jelde “smear” şeklinde bir profil gözlenmiştir. Bir belirteç eşliğinde yürütülen fragmanların <70 bp aralığındaki bölümü jelden izole edilmiştir. Sonrasında primersiz (PCR I) ve primerli (PCR II) olarak iki farklı PCR aşamasından geçilmiştir. PCR I ile, DNase I kesimi sonucunda oluşan fragmanlar birleştirilmekte, PCR II ile tam boy ürün elde edilmektedir. Her aşama örneklerin agaroz jel profilleriyle değerlendirilmiştir. PCR II sonucu elde edilen tam boy PCR ürünü yine çeşitli aşamalardan geçirilerek pUC19 vektörüne klonlanmıştır. Transformasyon adımı kompetan hücre olarak *E. coli* JM109 kullanılmıştır. Elde edilen koloniler tarama basamağında artan lipaz enzim aktivitesi yönünden irdelenmiştir.

Literatürde yönlendirilmiş evrim ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında bu alanda, birden fazla yönlendirilmiş evrim yönteminin kullanıldığı birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Fang ve arkadaşları, mutant kütüphanelerinin oluşturulmasında hataya eğilimli PCR ve DNA karıştırma yöntemlerini, Ahmad ve arkadaşları ise hataya eğilimli PCR ve bölge doyurma mutagenesi yöntemlerini kullanmıştır (Fang ve ark., 2009; Ahmad ve ark., 2008). Bunun yanı sıra literatürde sadece tek bir yönlendirilmiş evrim yönteminin kullanıldığı çalışmalar da yer almaktadır. Acharya ve arkadaşları varyant kütüphanelerin oluşturulması için yalnızca hataya eğilimli PCR yöntemi kullanmışlardır. Bu çalışmada birden fazla hataya eğilimli PCR döngüsü kullanılarak iyileştirilmiş varyantlara ulaşılmıştır (Acharya ve ark., 2004).

Gerek birden fazla yönlendirilmiş evrim yönteminin kullanılması, gerekse kullanılan her yöntemin çoklu döngülerinin uygulanmasındaki amaç, varyant çeşitliliğinin artırılmasıdır. Ancak Suen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya baktığımızda, yine tek bir yönlendirilmiş evrim yöntemi seçilerek başlanan çalışmada, aile karıştırma yöntemi tek döngüde gerçekleştirilerek elde edilen varyant kütüphaneleri taranmış ve taşıdığı özellikler yönünden oldukça geliştirilmiş mutantlar elde edilmiştir (Suen ve ark., 2004). Doktora tez projesinde yönlendirilmiş evrim yöntemi olan DNA karıştırma yaklaşımı kullanılmış ve tek DNA karıştırma döngüsü sonucunda elde edilen mutant kütüphane taranarak en iyi varyant seçilmiştir.

Yapılan dizi analizi çalışmaları en iyi varyantın elde edildiği L5 ve L21 ebeveyn lipazların DNA düzeyinde % 85, protein düzeyinde de % 89 oranında benzerlik taşıdığını göstermiştir. DNA karıştırma çalışmalarında daha düşük oranda dizi homolojisi gösteren genler kullanılabildiği gibi (Suen ve ark., 2004), yüksek oranda dizi homolojisi gösteren genlerde bu çalışmalarda kullanılmaktadır. *Bacillus licheniformis* kitinazın yüksek derecede benzerlik gösteren (% 99) iki geni ile hataya eğilimli PCR ve DNA karıştırma yöntemleri kullanılarak mutant kütüphaneler oluşturulmuştur (Songsiriritthigul ve ark., 2009). Yüksek dizi homolojisine sahip genlerin karıştırılmasının yanı sıra, tek bir gen kullanılarak da DNA karıştırma yapılabilmektedir. Stemmer bunu tekli dizi karıştırma olarak tanımlamıştır (Stemmer, 2002).

DNA düzeyinde % 85, protein düzeyinde % 89 oranında benzerlik taşıyan, L5 ve L21 ebeveyn lipazlarından tek döngülü DNA karıştırma ile elde edilen L3-3 varyantının, yapılan dizi analizleri sonucunda, 2 çapraz geçiş pozisyonuna sahip kimerik bir mutant olduğu belirlenmiştir. Yapılan dizi hizalama çalışmalarında L3-3 varyantının kimerik bir mutant olmanın yanısıra 3 nokta mutasyonu (G14S, A15G ve V109S) taşıdığı ortaya çıkmıştır. G15S, A15G, ve V109S nokta mutasyonlarının ebeveyn enzimlerden kaynaklanmadığı ve *B. subtilis* lipaz A'nın yapısında da yer almadığı belirlenmiştir. DNA karıştırma yöntemi sonucu elde edilen L3-3 lipazının, L5 ebeveyninden 6 pozisyonunda ve L21 ebeveyninden 14 pozisyonunda farklılık gösteren bir mutant olduğu belirlenmiştir. Bir kimera olan L3-3 lipazında yer alan nokta mutasyonları enzim özelliklerinin gelişimine ayrıca katkıda bulunmuştur. DNA

karıştırma deneylerinde elde edilen rastgele nokta mutasyonları genetik çeşitliliğe neden olmaktadır. Bu mutasyonlar başlangıç geninden farklı olarak bir, iki veya üç amino asit mutasyonları içermektedir (Stemmer, 2002).

DNA karıştırma, rekombinasyon yoluyla çeşitlilik oluşturulmasına ve bağımsız genlerdeki yararlı mutasyonların kombine edebilmesine imkan tanıdığı için yönlendirilmiş evrim çalışmaları arasında etkin bir yöntemdir. Bu yöntemle akraba gen havuzlarının rastgele fragmentasyonu ile elde edilen gen parçalarının primersiz bir PCR tepkimesinde birleştirilmesi sonucunda kimerik gen kütüphaneleri oluşturulabilmektedir. Dizi homolojisi gösteren bölgelerdeki kalıp değişimi farklı çapraz geçişler oluşmasını sağlamaktadır. Tarama ve seçmenin takip ettiği tekrarlı döngüsel DNA karıştırmanın, aktivitesi artırılmış, substrat seçiciliği değiştirilmiş, katlanması iyileştirilmiş tek gen ürünlerinin ve işlevleri geliştirilmiş operonların evrilmesinde faydalı bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir. Tek bir başlangıç dizisi kullanıldığında ortaya çıkan çeşitlilik, PCR tepkimesinde oluşan rastgele nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Çoğu nokta mutasyonu zararlı veya nötr olduğundan nokta mutasyonu oranı düşük tutulmakta ve bundan dolayı yararlı mutasyonların birikimi ve istenilen fonksiyonun evrilmesi yavaş gerçekleşmektedir (Stemmer, 1994; Zhang ve ark., 1997; Crameri ve ark., 1996; Crameri ve ark., 1997).

Doğal homolog genler alternatif bir çeşitlilik kaynağıdır ve işlevsel çeşitlilik sunmaktadırlar. Literatürde yer alan bir çalışmada, doğal çeşitliliğin evrim sürecinin hızını ne şekilde etkilediğinin değerlendirilmesi için, dört genin karışımından oluşan bir havuzdan ayrı ayrı evrilen dört farklı sefalosporinaz geninin moksalakamaz aktivitesi karşılaştırılmıştır. Tek karıştırma döngüsünde birbirinden ayrı olarak karıştırılan dört genin aktivitesi sekiz kat artarken, bu dört gen birlikte karıştırıldıklarında döngü başına 50 kat artış göstererek 270-540 kat iyileşme sağlanmıştır. En iyi klonun, dört genin üçünden gelen toplam sekiz segment taşıdığı ve 33 amino asit nokta mutasyonu içerdiği gözlemlenmiştir (Crameri ve ark., 1998).

İyileşmiş aktivite, değiştirilmiş substrat özgüllüğü veya gelişmiş protein katlanmasına sahip tek gen ürünleri ve işlevleri geliştirilmiş bütün bir operonun evriminde, tekrarlı karıştırma döngülerini izleyen tarama ve seçme yöntemlerinin

kullanımı etkili bir yaklaşımdır. Tek bir başlangıç dizisinin kullanıldığı durumlarda arzu edilen çeşitlilik polimeraz reaksiyonu sırasında oluşturulan rastgele nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Nokta mutasyonlarının çoğu durumda zararlı veya nötr olmalarından dolayı, rastgele nokta mutasyonu oranının düşük tutulduğu bu tip çalışmalarda yararlı mutasyonların biriktirilmesi ile istenilen işlevin geliştirilmesi yavaş gerçekleşmektedir. Örneğin, bir galaktozidazdan aktivitede 10 kata kadar gelişme sergileyen bir fukozidaz evrilmesi beş tur karıştırma ve seçme döngüsü gerektirmektedir. Milyarlarca yıllık evrimleri sırasında zararlı varyantlar seçilime uğratıldıklarından dolayı, doğal homolog diziler işlevsel çeşitlilik açısından zenginleştirilmiş kabul edilebilirler. Bu nedenle, gen ailelerinin karıştırılmalarının evrim sürecinin hızını ne şekilde etkilediği araştırılmıştır (Stemmer, 1994; Zhang ve ark., 1997; Cramer ve ark., 1996; Cramer ve ark., 1997; Moore ve Arnold, 1996; Zhao ve Arnold, 1997).

DNA karıştırma sonucunda oluşan mutant kütüphanenin taranması basamağı tez çalışmasının diğer bir kritik noktası olarak tanımlanmıştır. Tarama ve seçme yöntemleri yönlendirilmiş evrim deneylerinde oldukça sınırlayıcı bir basamaktır. Bu nedenle bu aşamanın, hızlı, tekrarlanabilir, güvenilir olması çalışma için oldukça büyük önem taşımaktadır. Tez çalışması kapsamında tarama aşaması üç basamaklı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu basamaklar; tribütirin agar plakları, 96-kuyulu mikropalaklar ve erlenmeyerde yapılan ekspresyon deneyleri olarak tanımlanmıştır. DNA karıştırma çalışmaları sonunda elde edilen mutant kütüphane, lipaz aktivitesindeki artış baz alınarak taranmıştır. Yapılan tarama çalışmaları sonunda L5 ve L21 *Bacillus pumilus* soylarından türeyen L3-3 mutanları ön plana çıkmıştır. Tez projesi kapsamında bu varyant üzerine gidilerek, DNA yapısında oluşturulan değişikliklerin, protein yapısı ve işlevine olan etkileri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Doktora tez projesinde oluşturulan mutant kütüphanelerin lipaz aktivitesindeki artış yönünden taranması tribütirin agar petrileriyle başlatılmıştır. Petrilerde oluşan tribütirin hidrolizi sonucu ortaya çıkan “halo” olarak isimlendirilen şeffaf, açık renkli zonlar değerlendirilmiştir. Transformasyon sonunda elde edilen kolonilerin tamamı tribütirin agar petrilerine aktarılmıştır. Tribütirin petrilerinde yapılan değerlendirme ile transformantların % 55 kadarının lipaz aktivitesi gösterdiği

belirlenmiştir. Her bir petride ebeveyn soylar kontrol olarak kullanılarak, bu soylara görece daha yüksek aktivite veren koloniler bir sonraki tarama basamağında değerlendirmeye alınmıştır. Tribütirin petrilerinde lipaz aktivitesi yönünden artış gösteren 10.000 koloninin 350 tanesi ikinci tarama basamağı için seçilmiştir.

İkinci tarama basamağı için seçilen 350 koloninin lipaz aktivitesi, mikroparka okuyucu kullanılarak belirlenmiştir. Artan enzim aktivitesinin tribütirin agar petrilerine görece daha hassas olarak belirlenebildiği bu yöntemde, aktivite 96 kuyulu plakalar kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Bu aşamada da ebeveyn soylar kontrol olarak kullanılmıştır. Kolonilerdeki lipaz aktivitesi artışı ebeveyn enzimlere görece değerlendirilmiştir. Görece daha yüksek aktivite gösteren 16 transforman seçilerek üçüncü tarama aşamasına geçilmiştir.

Üçüncü tarama aşamasında yapılan ekspresyon çalışmalarıyla 16 transformanın aktiviteleri belirli saat aralıklarıyla alınan örneklerle yapılan lipaz aktivite testleri ile, ebeveyn enzimlere görece değerlendirilmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen en iyi varyant olan L3-3 bu aşamanın sonunda seçilmiştir. Üç farklı basamakta gerçekleştirilen tarama çalışmaları, her adımda mutant kütüphanenin sınırlandırılmasıyla yapılmıştır. 10.000 koloni ile başlayan tarama 16 koloni ile son basamakta tekrar lipaz aktivitesi yönünden irdelenmiştir. Oluşturulan mutant kütüphanelerin hızlı ve güvenilir bir şekilde taranması, yönlendirilmiş evrim çalışmalarında kritik bir öneme sahiptir.

İyileştirilmiş varyantların seçilmesi için farklı stratejiler uygulanabilmektedir. Enzimler arzu edilen özellikler temelinde analiz edilmektedirler ancak enzimler kendilerini amplifiye edemeyeceklerinden dolayı, seçme sistemi aynı zamanda bu enzimleri kodlayan genlerin de seçimini sağlamalıdır. Daha sonra bu genler amplifiye edilerek, tekrar eden mutagenез, seçme ve amplifikasyon döngüsüne maruz bırakılmaktadırlar. Bundan dolayı fenotip ve genotip fiziksel bir yolla birbirine bağlanmalıdır (Matsuura ve Yomo, 2006). Faj gösterimi “phage display”, hücre yüzeyinde gösterim “cell surface display”, ribozom gösterim “ribosome display” ve büyümeye bağlı seçim “growth selection” gibi seçme sistemleri söz konusu bağlantıyı kurmaktadır.

Enzimler, sayısız endüstriyel süreçte kullanılan geleneksel katalizörlere cazip alternatifler oluşturmaktadır. Bununla birlikte enzimlerin özellikleri, uygulama alanlarında ihtiyaç duyulan kriterleri her zaman karşılamamaktadır. Yönlendirilmiş evrim enzim karakteristiklerinin gereksinimler doğrultusunda geliştirilmesi için güçlü bir araçtır; ancak iyileştirilmiş varyantların seçimi bu yöntemin kritik bir basamağını oluşturmaktadır. Bu durumun bir sonucu olarak geçtiğimiz on yıl içinde istenilen enzimatik aktivitenin seçilimini mümkün kılan yeni seçme stratejileri geliştirilmiştir.

Proteinlerin laboratuvar ortamında evrilmeleri çalışmalarında, geniş mutant kütüphanelerinden değerli varyantların hızlıca belirlenmelerini sağlayan yöntemlerin kullanılması oldukça önemlidir ve bu yöntemlerin her enzim ve reaksiyon için uyarlanmaları gerekmektedir. Analiz edilen varyant miktarı arttıkça, kütüphane içinde değerli bir varyantın bulunması ihtimali de doğal olarak artacaktır. Yüksek verimlilikte seçme veya tarama sisteminin bulunamayışı yönlendirilmiş evrim çalışmalarını sınırlandırmaktadır. Tüm tarama ve seçme stratejilerinin temelinde; enzimi kodlayan gen, enzim ve enzim aktivitesi sonucu ortaya çıkan ürün arasında bulunan bağlantı yatmaktadır. Tarama genler veya klonlar özelinde gerçekleştirilirken, seçmenin tüm varyant havuzu genelinde aynı anda uygulanıyor olması tarama ve seçme arasındaki ana farklılıktır. Tarama ve seçme yöntemleri belirli kriterleri karşılamalıdır. İlk olarak, eğer mümkünse ilgilenilen özellikle doğrudan bağlantılı olmalıdır. Substrat identik ya da en azından belirlenen substrata mümkün olduğunca benzer olmalı ve ürünün tespit edilmesi etkin katalizörün seçimini garantiye almak için çoklu “turnover” koşulları altında gerçekleştirilmelidir. İkinci olarak; yöntem, arzu edilen dinamik aralık dahilinde duyarlı olmalıdır. Yönlendirilmiş evrim çalışmalarının ilk turlarında tüm iyileşmiş mutantlar korunmalı, ilerleyen turlarda yalnızca en iyi mutantların ayrılması adına daha zorlayıcı şartlar uygulanmalıdır. Son olarak, tarama veya seçme prosedürü yüksek verimli bir biçimde uygulanabilir olmalıdır. Taramanın avantajı, bir enzimatik reaksiyonun substrat ve ürünü arasındaki farkın hemen her durumda doğrudan veya dolaylı olarak belirlenebiliyor olmasıdır. Çoğu tarama yöntemi, spektroskopik farklılık gösteren ürünlere dönüştürülen florojenik veya kromojenik substratların kullanımına dayanmaktadır (Otten ve Quax, 2005; Aharoni ve ark., 2005; Wahler ve

Reymond, 2001).

Doktora tez projesinde mutant kütüphanelerin oluşturulmasında kullanılan DNA karıştırma yöntemi başarılı bir şekilde optimize edilerek, elde edilen kütüphane üç basamaklı bir yöntemle taranmış ve lipaz aktivitesi yönünden en büyük iyileşmeyi gösteren varyant belirlenmiştir. Ancak mutant kütüphanenin taranması çalışmalarında farklı yöntemlerle ölçülen lipaz aktivite sonuçları bize aktivite aldığımız varyantın dizisiyle ilgili bir sonuç vermemektedir. Yapılan rastgele değişimlerin belirlenmesi ancak dizi analizi ile mümkün olmaktadır.

Yapıda meydana gelen değişiklikler, dizi analizi çalışmalarıyla belirlenmiştir. Tarama çalışmaları sonunda elde edilen en iyi varyant olan L3-3 daha ileri düzeyde irdelenmiştir. Dizi analizi sonuçları, mutant L3-3'ün 2 çapraz geçiş pozisyonuna sahip bir kimerik mutant olduğunu göstermiştir. Ayrıca L3-3 mutantının G14S, A15G ve V109S olmak üzere üç nokta mutasyonu taşıdığı da belirlenmiştir. Yapıda oluşan bu değişimler, homoloji modelleme ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca L3-3 mutantının taşıdığı değişikliklerin, mutant enzime kazandırdığı niteliklerin de belirlenmesi için saflaştırma ve nitelendirme çalışmaları yapılmıştır.

Tarama basamağında öne çıkan, lipaz aktivitesi yönünden iyileşmiş en iyi mutant olan L3-3, ebeveyn lipaz soylarıyla birlikte saflaştırılmış ve yapılan nitelendirme çalışmalarıyla lipaz enzimlerinin sahip oldukları biyokimyasal özellikler incelenmiştir. L5 ve L21 ebeveyn enzimleri ve L3-3 mutantı kültür üst sıvısı, ilk aşamada % 80 amonyum sülfat ile tek basamakta seçici olarak çöktürülmüştür. Sonrasında her üç lipaz enzimi, iyon değişim kromatografisi ile tek basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır.

Kromatografi basamağı sonrası elde edilen verim, başlangıç aktivitesine görece L5 için % 42, L21 için % 53 ve L3-3 için % 52 olarak belirlenmiştir. Spesifik aktivite artışı, her üç lipaz enzimi için de yaklaşık 9 kat olarak bulunmuştur. Enzim saflaştırma çalışmalarında tek basamaklı bir yöntem kullanılması saflaştırma çalışmasının kısmi olarak başarılmasını sağlayabilmiştir. Kısmi saflaştırma, çeşitli

safsızlıkları da beraberinde getirebileceği ve bu safsızlıkların yapılan aktivite ve protein miktar tayini analizlerini olumsuz bir şekilde etkileyebileceği göz önüne alınarak, enzimlerin saflaştırma dereceleri SDS-PAGE jel profilinin kullanıldığı densitometrik analiz ile tekrar hesaplanmıştır. Elde edilen saflık dereceleri, L5 için % 40, L21 için % 25 ve L3-3 için % 60 olarak belirlenmiştir. Doğrulanmış spesifik aktivite değerleri Tablo 3.2’de verilmiştir. Bu sonuçlar, L3-3 mutantının spesifik aktivitesinin, L5 lipazına görece 6.4 kat ve L21 lipazına görece 8.2 kat artığını göstermiştir.

Yapılan SDS-PAGE jel elektroforezi ile saflaştırılan enzimlerin moleküler büyüklükleri 19 kDa olarak belirlenmiştir. Bu büyüklük beklenen bir sonuç olarak, aynı ailede yer alan (Aile I) *B. subtilis* Lip A enziminin moleküler büyüklüğüyle uyumlu bulunmuştur. 19 kDa büyüklüğünde ve bilinen en küçük lipaz olan *B. subtilis* Lip A, Alt ile V’de yer alan büyük moleküler ağırlığa sahip *B. thermocatenulatus* ve *B. stearothermophilus* gibi diğer *Bacillus* lipazlarıyla % 15 gibi çok düşük oranda dizi benzerliği göstermektedir. Bununla birlikte aynı alt ailede yer alan ve aynı moleküler ağırlığa sahip *B. pumilus* lipazlarıyla % 74-77 dizi benzerliği taşımaktadır (Pouderoyen ve ark., 2001).

Tek basamakta iyon değişim kromatografisinin kullanıldığı kısmi saflaştırma çalışması sonrasında, enzim aktivitesinin en iyi bulunduğu, farklı protein bantları yönünden görece daha iyi arındırılmış fraksiyonlar ile “havuz” oluşturularak, enzimlerin biyokimyasal özelliklerini irdelemek üzere nitelendirme çalışmaları yapılmıştır.

Doktora tez çalışması kapsamında saflaştırılarak nitelendirilen lipaz enzimlerinin optimal reaksiyon sıcaklığı 37 °C olarak bulunmuştur. Her üç enzimin yükselen sıcaklık değerlerinde aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. 45 °C’taki aktivite değerlerine bakıldığında ancak % 40’ının korunabildiği belirlenmiştir. Literatürde, benzer niteliklere sahip *B. subtilis* 168 lipazının maksimum enzimatik aktivitesi yaklaşık 35 °C olarak rapor edilmiştir (Lesuisse ve ark., 1993).

Optimal pH belirleme deneylerinde pH 4.0-11.0 arasındaki tamponlar kullanılmıştır. Yapılan lipaz aktivite testleriyle her üç enzim için optimal pH değeri 8.0 olarak belirlenmiştir. Optimal pH değerleri, optimal sıcaklık testlerinde olduğu gibi ebeveyn ve mutant enzimlerde benzer sonuçlar vermiştir. Enzimlerin farklı pH değerlerindeki tamponlarda, 4 °C'ta 1 hafta süreyle inkübasyonunun ardından, optimal pH tamponunda pH kararlılığını belirlemek üzere yapılan lipaz aktivitesi sonucunda, pH 6.5-10.0 aralığında enzimlerin aktivitelerini % 80-100 oranında korudukları belirlenmiştir. Sonuçlar ebeveyn ve mutant enzimlerin pH kararlılığı testlerinde yine benzer değerler verdiğini göstermiştir.

Lesuisse ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılan bir çalışma ile *B. subtilis* 168 lipazı saflaştırılarak nitelendirilmiştir. Saflaştırılmış lipaz pH 10.0'da optimal aktivite gösterirken, pH 10.5'in üstündeki ve pH 6.5'in altındaki pH değerlerinde enzim aktivitesi büyük ölçüde düşmüştür. Enzim alkali pH değerlerinde dikkate değer kararlılığa sahiptir; pH 12.0'de maksimum kararlılık sergilerken pH 13.0'de 24 saatin ardından enzim aktivitesinin % 65'i korunmuştur. Lipaz aktivitesinde düşük pH değerlerinde 24 saat inkübasyon sonunda gözlemlenen düşüş, pH'nın 12.0'ye yükseltilmesi ile geri kazanılmaktadır ve bu durum kısmen protein agregasyon/deagregasyonundan kaynaklanmaktadır. pH'ya bağlı lipaz elektriksel yük değişimlerinin bilgisayar ortamında analiz edilmesi sonucunda, 9.5-12.0 pH aralığındaki küçük pH değişimlerinin proteinin elektriksel yükünde büyük farklılıklar oluşturduğu görülmüştür (pH'nın 10.0'dan 12.0'ye yükselişi, net negatif yükün 17'ye yükselmesine neden olmuştur). Elektriksel yükteki bu değişimlerin proteinin yığın oluşturma eğilimini artırdığı düşünülmektedir (Lesuisse ve ark., 1993).

Tez projesinde, 5-55 °C aralığında yapılan sıcaklık kararlılığı testleri ile ebeveyn ve mutant enzimler arasındaki farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu durumda mutant enzimin 50 °C'ta aktivitesinin % 70'ini, L5 ve L21'in ise sırasıyla, aktivitelerinin ancak % 28 ve % 19'unu koruduğu gözlemlenmiştir. Mutant enzimin sıcaklık kararlılığı değeri, *B. subtilis* 168 lipazıyla karşılaştırıldığında ciddi anlamda bir fark göstermektedir. *B. subtilis* 168 lipaz enzimi 40° C'ta 30 dakika sonunda kararlılığını korumuştur. Bu sıcaklığın üstündeki değerlerde enzimin kararlılığı net biçimde düşmüş, 55° C'ta 30 dakika inkübasyon sonunda aktivite tamamen yok

olmuştur (Lesuisse ve ark., 1993). L3-3 mutanıtı 55 °C'ta aktivitesinin neredeyse % 20'sini korumuştur.

L3-3 mutanıtı ve ebeveyn enzimlerin 50 °C'ta $T_{1/2}$ değeri, 7 saat süresince aralıklı olarak alınan örneklerin lipaz aktivitesi yönünden değeriendirilmesiyle belirlenmiştir. L3-3 mutant enziminin, ebeveyn enzimlere görece 9 kat daha yüksek sıcaklık kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık kararlılığı lipazlar için, endüstriyel proseslerde kullanılan en önemli özelliklerden biri olarak kabul edilmektedir.

Her enzim, karakteristik sıcaklık aralığında optimal aktivite gösterir. Enzim aktivite/sıcaklık profili laboratuvarda ya da doğada gerçekleşen evrimle değeriir. Evrim moleküler mühendisliği, enzim aktivitesini etkilemeden, termostabiliteyi artıran etkili ve verimli bir yaklaşımdır. Endüstriyel proseslerde yüksek sıcaklık; substrat çözünürlüğünün artırılması, ortam viskozitesinin ve mikrobiyal kontaminasyon riskinin ve eşzamanlı oluşan enzimatik olmayan reaksiyonların oranının azaltılmasında büyük bir paya sahiptir (Chirumamilla ve ark., 2001).

Tez kapsamında endüstriyel uygulamalarda kullanılan çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkileri de irdelenmiştir. Çeşitli metal iyonları varlığında L3-3 mutanıtı üzerinde en önemli etkiyi $FeCl_2$, $CoCl_2$ ya da $CuCl_2$ göstermiştir. Farklı metallerin 10 mM konsantrasyonda kullanıldığı çalışmada en belirgin sonuç $CuCl_2$ varlığında elde edilmiştir. Bu durumda ebeveyn enzimler inhibe olurken, mutant enzimin aktivitesinde artış olmuştur. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında birçok lipaz enziminin aktivitesinin bu metallerin varlığında inhibe olduğu görülmüştür (Gaur ve ark., 2008; Nthangeni ve ark., 2001; Sharma ve ark., 2001). Enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etki gösteren metal iyonlarının, enzimlerin konformasyonunu değeriştirdiği fikrini ön plana çıkartmaktadır (Sharon ve ark., 1998). Metallerin enzim aktivitesini, doğrudan aktif merkeze etki ederek ya da metal iyonları ile iyonize yağ asitleri arasındaki komplekslerin çözünürlüğünü ve ara yüzeydeki davranışını değeriştirerek yaptığı ileri sürülmüştür (Kambourova ve ark., 2003).

EDTA ve PMSF (1 ve 10 mM) ile yapılan testlerde, metal kelatlayıcı bir ajan olan EDTA'nın her üç enzim için de aktiviteyi azaltıcı bir etki göstermediği, bu nedenle her üç lipaz enziminin de metal bağlama bölgesine sahip olmadığı sonucu çıkarılmıştır. Tersine PMSF'in enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. PMSF varlığındaki aktivite kaybı enzimin aktif bölgesinde, beklendiği üzere serin rezidüsü taşıdığını göstermiştir. PMSF varlığındaki güçlü inhibisyon, tez çalışmasında kullanılan lipaz enzimlerinin serin hidrolaz sınıfında yer aldığı gerçeğini doğrulamıştır. PMSF'in lipazlar üzerindeki inhibe edici etkisi literatürde birçok çalışmada rapor edilmiştir (Sinhaikul ve ark., 2001; Kambourova ve ark., 2003). Ancak literatürde bunun tersi durumlara da rastlanmaktadır. Lotrakul ve Dharmsthiti tarafından yapılan bir çalışmada, *A. Sobria* LP004 lipazı aktivitesinin PMSF'ten etkilenmediği rapor edilmiştir. Bu durum enzimin aktif bölgesinde serin rezidüsünün yer almadığı yorumuyla açıklanabileceği gibi aynı zamanda serin rezidüsünün, molekülün içinde derin bir bölgede yer almasından dolayı, PMSF ile ilişki kuramamasına da bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (Lotrakul ve Dharmsthiti, 1997).

Enzim nitelendirme çalışmaları kapsamında, farklı deterjanlar kullanılarak enzim aktiviteleri üzerine etkileri irdelenmiştir. % 0.1 ve % 1 konsantrasyonlarda kullanılan deterjanlardan, iyonik bir deterjan olan Na-deoksikolat dışındaki tüm deterjanların % 1'lik konsantrasyonlarda mutant ve ebeveyn enzimleri inhibe ettiği saptanmıştır. Mutant enzimin CTAB, Tween 20, Triton X-100 gibi deterjanlar varlığında ebeveyn enzime görece aktivitesini koruduğu ya da daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Endüstriyel uygulamalarda mutant lipazların faydaları, metal iyonları, deterjanlar ve organik çözücülerin etkisine bağlıdır. Örneğin deterjan varlığında enzim aktivitesi ve stabilitesi, deterjan uygulamalarında istenen bir özelliktir (Gaur ve ark., 2008). L3-3 mutantının deterjanlara olan toleransı özellikle, % 0.1 SDS varlığında, ebeveyn enzimlere görece yüksek olmuştur. Bu durum açılmaya daha iyi direnç gösterdiğini işaret etmiştir. Protein mühendisliği çalışmalarıyla sağlanan, surfaktan ve ağartıcıların varlığında kararlılık, lipazların deterjan formülasyonlarında aktivitelerini sürdürebilmeleri açısından istenen bir özelliktir. Surfaktanlar, katalitik reaksiyonların gerçekleştiği bölgeyi stabilize ederek substratın enzime erişimini kolaylaştırır (Gaur ve ark., 2008).

Tez projesi kapsamında % 10 ve % 30 konsantrasyonda kullanılan çeşitli organik çözücülerin enzimler üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Birçok durumda mutant enzimin ebeveyn enzimlere görece aktivitesini yüksek oranda koruduğu gözlenmiştir. Dahası organik çözücülere olan tolerans, enzimlerin susuz ortamda biyokatalist olarak kullanımına imkan tanımaktadır. Bu durum, organik fazdaki ürünlerin ya da substratların çözülmesi ya da geri kazanılmasında, istenmeyen substratların veya ürün inhibisyonunun azaltılmasında büyük avantaj sağlamaktadır (Hun ve ark., 2003). Bazı durumlarda oluşan ürünün kendisi bir organik bileşiktir. Örneğin biyodizel üretiminde metanol böyle bir özelliğe sahiptir (Li ve ark., 2012). Organik çözücülerde kararlılık lipazlar için istenilen bir nitelikler. Özellikle sentez reaksiyonları için oldukça önemlidir (Kim ve ark., 2005). Yapılan testlerle, organik çözücülerin varlığında L3-3 mutant enziminin daha yüksek direnç gösterdiği belirlenmiştir.

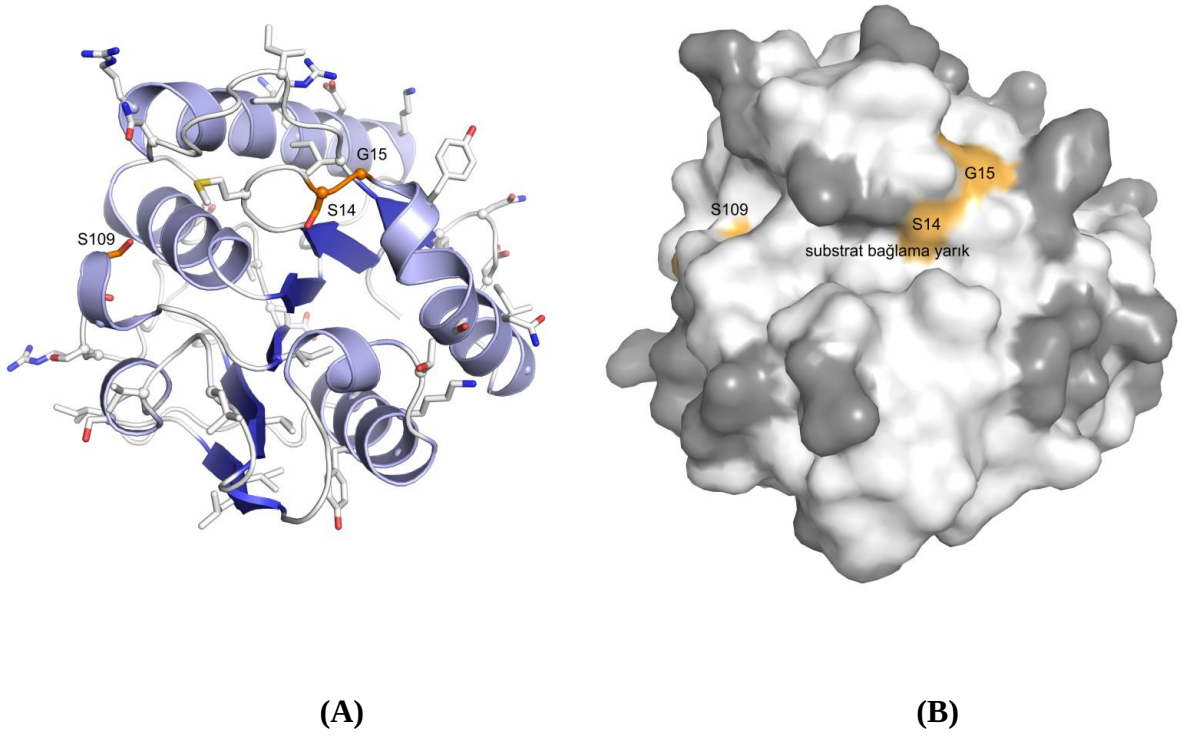
Enzimlerin substrat özgüllüklerinin belirlenmesi çalışmalarında farklı zincir uzunluğundaki (C2-C18) *p*NP yağ açıl esterleri kullanılmıştır. Mutant ve ebeveyn enzimlerin substrat özgüllükleri arasında belirgin bir fark bulunamamıştır. Ancak yinede mutant enzimin, ebeveyn enzimlere görece uzun zincirli triaçilgliserollere biraz daha yüksek oranda tercih gösterdiği belirlenmiştir. Substrat özgüllüğü için yapılan testlerden alınan sonuçlar doğrultusunda, L3-3 mutantının tıpkı ebeveyn enzimlerde olduğu gibi uzun zincirli triaçilgliserol yağ asitlerine gösterdiği yüksek aktivite, enzimlerin gerçek lipaz olarak tanımlanabileceğini doğrulamıştır. Zeytinyağı, çözünmeyen triesterler ve uzun zincirli yağ asitlerini hidroliz etme yeteneği, enzimlerin lipaz olarak tanımlanmasında kriter olarak kabul edilmiştir (Kambourova ve ark., 2003).

Farklı bileşiklerle yapılan testler ile elde ettiğimiz sonuçlar L3-3 mutantının, ebeveyn enzimlere görece aktivitesini oldukça iyi bir şekilde koruduğu ya da göreceli yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle L3-3 mutantının, geliştirilen özellikleri ile iyi bir biyokatalist olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Doğada çok sayıda termofilik protein bulunmaktadır; bu proteinlerin yüksek kararlılıkları sahip oldukları bir takım dizi/yapı özellikleri ile ilişkilendirilmektedir (Kumar ve ark., 2000). Aynı özelliklerin, kor protein yapısının

katlanması, polar yüzey alanı, helikal içerik/eğilim, tuz köprüsü ve diğer hidrojen bağı etkileşimleri, prolin substitüsyonları, insersiyon veya delesyonlar, lup kararlılığı ve protein oligomerizasyonu gibi akılcı mutagenез ve yönlendirilmiş evrim çalışmaları ile elde edilen mutant proteinlerin sıcaklık kararlılıklarının artırılmasında rol oynadıkları düşünülmektedir.

B. pumilus L3-3 mutanıtı, evrildiğı ebeveynlerine oranla daha yüksek sıcaklık kararlılığı ve aktivite sergilemiştir. Mutant enzimde gözlemlenen bu gelişmelerin temelinde kimerik farklılıklar ve üç nokta mutasyonu yatmaktadır. Literatürde L3-3 mutanıtının haricinde, *B. pumilus* lipazlarına ait deneysel yapı çalışması yer almadığı için, *B. subtilis* lipaz A (van Pouderoyen ve ark., 2001) kristal yapısına dayanılarak, *B. pumilus* ebeveyn ve mutant enzimleri için 3 boyutlu homoloji modelleri hazırlanmıştır. Elde edilen bu modellerle kimerik farklılıklar ve nokta mutasyonlarının yapısal etkileri araştırılmış ve gözlemlenen biyofizik karakteristikler açıklanmıştır. *B. pumilus* lipazları ve *B. subtilis* lipaz A arasında bulunan yüksek dizi benzerliği (% 78-79) ile bu diziler arasındaki yaklaşık 40 farklılığın dağılımı ve doğasına bakıldığında, oluşturulan homoloji modellerinin oldukça güvenilir olduğu gözlemlenmiştir. Chothia ve Lesk (1986) tarafından bildirilen dizi benzerliği ve yapısal doğruluk arasındaki ilişkiye dayanarak, omurga atomları arasındaki tahmini ortalama karekök sapması (estimated root mean square deviation) 0.6 Å olarak hesaplanmıştır.

B. subtilis Lip A ve *B. pumilus* L3-3 arasındaki farklılıklar genellikle lup bölgelerinde ve 3/10 helikslerde yoğunlaşmıştır. Farklılıkların büyük bir bölümü yüzeyde yer aldığı için ana zincir bu durumdan neredeyse hiç etkilenmez (Şekil 4.2). *B. pumilus* lipazı homoloji modellerinin ve özellikle *B. subtilis* lipaz A ile olan farklılıklarının incelenmesi, yalnızca bir durumda (L3-3'deki rezidü S14) istenmeyen bir yan zincir rotamer konformasyonunu düzeltmek amacıyla müdahale edilmesini zorunlu kılmıştır.



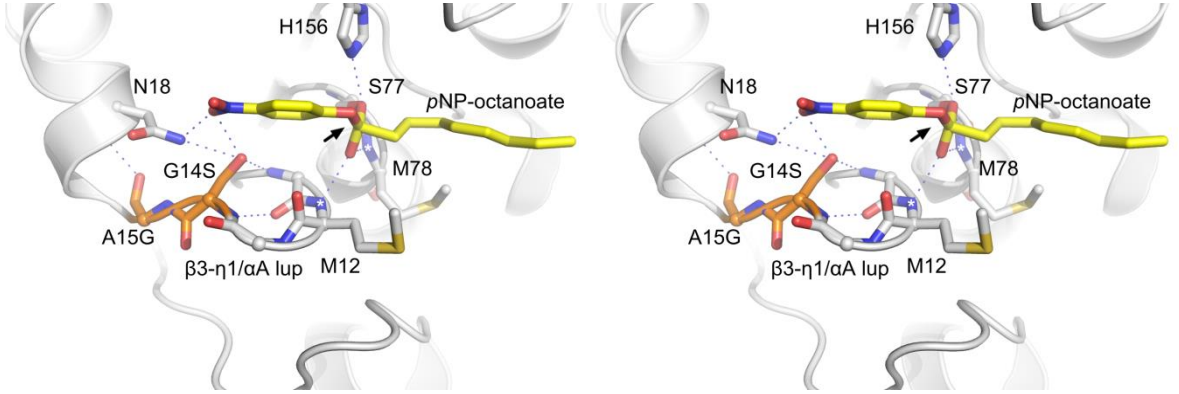
Şekil 4.2. *B. subtilis* Lip A ve *B. pumilus* L3-3 mutant arasında farklılık gösteren rezidülerin konumları. (a) Protein modelinin üstten görünümünden substrat bağlayıcı oyuğa bakış; farklılıklar “stick representation” formunda gösterilmiştir. 3 nokta mutasyonu turuncu karbon atomları ile belirtilmiştir. (b) *B. pumilus* L3-3 mutant modelinin “surface representation” gösterimi; *B. subtilis* LipA ile olan farklılıklar gri renk, üç nokta mutasyonu turuncu renk ile belirtilmiştir.

Yapılan analizlerle, L3-3 mutantının iki ebeveyn lipaza kıyasla daha yüksek sıcaklık kararlılığına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Mutant L3-3 ve ebeveyn L5 arasındaki altı farklılıktan üçünün (F20A, V109S, I169V) enzim yapısının tamamına yayıldığı (Şekil 3.16) ve bunların aktif bölgeden uzakta konumlandıkları, bununla birlikte diğer üç farklılığın ise (I12M, G14S, A15G) $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lupunda yerleştikleri görülmüştür. $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lup (10-15. rezidüler, Şekil 3.17 ve 3.18) substrat bağlayan dar bir hidrofobik yarığın bir “duvarını” oluşturmaktadır (Dröge ve ark., 2006). I12M kimerik değişikliği ve A15G nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkan düşük yüzey hidrofobisitesi, L3-3’ün yükselen sıcaklık kararlılığı ile ilişkilendirilebilir. Benzer bir yorum, *B. subtilis* lipaz A mutantları 3-3A9, 4D3 ve 6B’de gözlemlenen A15S mutasyonu için yapılmıştır (Ahmad ve ark., 2008; Kamal ve ark., 2011). $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$

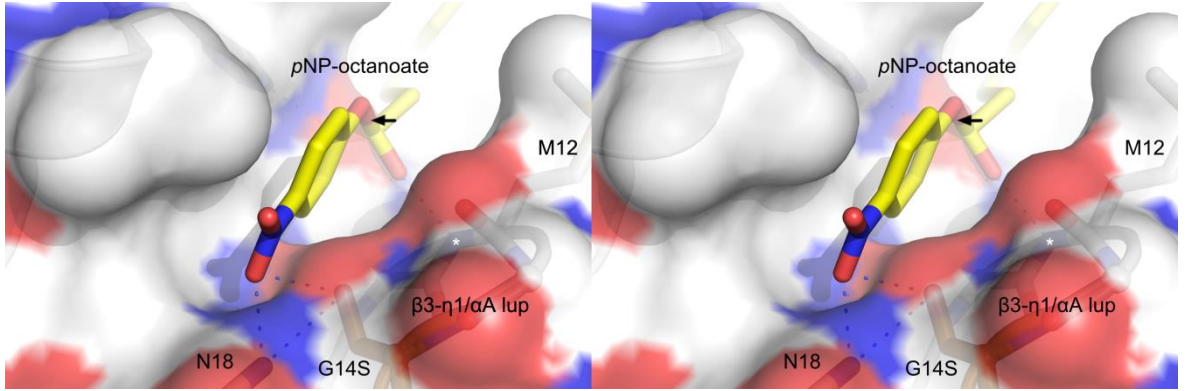
lupunda bulunan üçüncü farklılık olan G14S, I.4 ailesi için bu pozisyonda bildirilen ilk mutasyondur. Bu noktada yapıya katılan küçük bir polar yan zincir, $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lup ile rezidü G11 arasında ilave bir hidrojen bağı etkileşimi kurulmasını sağlamak yoluyla sıcaklık kararlılığını artırmış olabileceği düşünülmüştür (Şekil 3.17). Ortaya çıkan bu hidrojen bağı etkileşimi $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lup konformasyonunu stabilize ederek, lupa giren üçüncü bir glisinin (A15G mutasyonu) esnekliği artırıcı etkisine karşı koyabilir. $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lupunda bulunan üç farklılık ve mutasyonların termostabiliteyi artırıcı etkileri, azalan yüzey hidrofobisitesi ve lup konformasyonunun stabilizasyonuna bağlanabilir.

L3-3 mutantının substratı olan *pNP*-palmitat'a karşı sergilediği yükselen aktivitesi, $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lupunda bulunan mutasyonlardan özellikle G14S ve I12M'ne bağlanabilir. *B. subtilis* lipaz A ile farklı fosfonat inhibitörleri (Dröge ve ark., 2006) (PDB IDs: 1R4Z, 1R50) komplekslerinde, inhibitörün 1,2-O-isopropylidene-*sn*-glycerol (IPG) parçası, I12-G13-G14 ($\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lup içerisinde) ve H156-I157 rezidüleri arasında bulunmakta olan dar hidrofobik oyuğa bağlanmaktadır. Ayrıca, $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lupun başka α/β -hidrolaz katlanmalı enzimlerden orijinlenen luplar ile değiştirilmesi sonucu IPG esterlerine karşı olan enantiyo seçiciliğin değiştirildiği bir lup ekleme çalışması ile *B. subtilis* lipaz A'nın $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ lup rezidülerinin önemi gösterilmiştir (Boersma ve ark., 2008). *B. pumilus* L3-3 mutant lipazının substrat bağlamasının aydınlatılması amacıyla, *B. subtilis* lipaz A fosfonat inhibitor kompleksi yapısından yola çıkılarak, L3-3 *pNP*-oktanoat kompleksi modeli (Şekil 4.3 (A)) oluşturulmuştur. Elde edilen model, substratın *pNP* parçasının *B. pumilus* lipaz L3-3'de, *B. subtilis* lipaz A'daki IPG parçasıyla aynı boşluğu doldurduğunu göstermiştir. Rezidü 14'ün yan zinciri substrat bağlayıcı oyuğa yönelmekte ve substratla etkileşmekte olabilir. G14S mutasyonunun bir başka sonucu ise lipaz reaksiyonu sırasında kesilecek bağı "scissile bond" etrafında polarite artışına yol açarak, kovalent tetrahedral reaksiyon ara ürününün hidrolizini olumlu yönde etkilemesi olabilir. Bu ara ürün 12 ve 78. rezidülerce (Jaeger ve ark., 1999) oluşturulmakta ve oksianyon oyuğu tarafından stabilize edilmektedir; rezidü 12, L3-3'deki kimerik farklılıklardan bir tanesidir. *B. pumilus* L3-3 mutant lipazındaki I12M ve G14S mutasyonları substrat afinitesi ve tepkime kinetikleri üzerinde etkili olabileceklerinden dolayı bu mutasyonların enzim aktivitesinde artış sağladıkları

düşünülmektedir. L3-3'ün substrat özgüllüğü ebeveyn enzimlere oranla mutasyonlardan daha az etkilenmiştir (Şekil 3.15).



(A)



(B)

Şekil 4.3. *B. pumilus* L3-3 mutant enziminin *pNP*-oktanoat substratı (sarı karbon atomları) ile bağlanmış modelinin stereo figürü; aktif merkez serin rezidüsü S77'ye bağlanmış kovalent ara ürün gösterilmiştir. *pNP* parçası oluşturduğu hidrojen bağı etkileşimleri ile $\beta 3\text{-}\eta 1/\alpha A$ lup rezidülerinin yakınındadır. (A) Ana zincir azot atomlarının (beyaz yıldızlar) oksianyon oyuğu kurmalarını sağlayan M12 ve M78 rezidüleri ve kesilen bağ (scissile bond) (ok ile belirtilmiştir). (B) Aynı modelin yüzey gösterimi.

Yukarıda bahsedilen nokta mutasyonları ve kimerik farklılıkların tersine, aktif merkez serin rezidüsünden 12 ve 16 Å uzaklıklarda bulunan V190S nokta mutasyonu ile F20A ve I169V kimerik farklılıklarının L3-3 mutantının aktivitesini etkilemediği,

etkiliyor olsa bile bu etkinin kısa mesafe etkileşimleri üzerinden gerçekleşmediği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu üç mutasyon termostabiliteyi artırıyor gibi görünmektedir. I169V kimerik farklılığında, valin rezidüsünün küçük yan zinciri, enzimin iç hidrofobik katlanmasını hafifçe değiştirerek termostabiliteyi etkilemekte olabilir. F20A ve V109S mutasyonlarının sıcaklık kararlılığı üzerine olan etkileri daha büyüktür. F20A kimerik değişikliğine bakıldığında, solventle temas eden non-polar fenil grubunun ortadan kalkmasının enzim yüzeyindeki hidrofobisiteyi dikkate değer biçimde düşürdüğü görülmektedir. Benzer şekilde V109S nokta mutasyonu da non-polar bir yan zincirin polar bir yan zincir ile değişmesine neden olduğundan dolayı yüzey hidrofobisitesini azaltmaktadır. V109S mutasyonunun ayrıca stabilize edici bir etkisi de bulunmaktadır. *B. subtilis* lipaz A örneğinde olduğu üzere iki hidrojen bağı S109 (lipaz A'da T109)'u α B heliksi üzerindeki N48 ve α C heliksi üzerinde bulunan A81 ile bağlayabilir. Uzun 109-123 lüpe bu etkileşimler sayesinde "core" ikincil yapı birimlerine tutunmaktadır. Her iki ebeveyn enzimde de bulunmayan S109-N48 hidrojen bağı etkileşimi bunların haricinde, yalnızca bir hidrojen bağı etkileşimine (S56-D91) sahip uzun α B heliksinin N-terminal ucunu sabitlemektedir. Bundan dolayı, L3-3 mutantındaki V109S mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan stabilize edici etkileşimler daha rijit bir enzim yapısı oluşturmuştur. Bu durum L3-3 mutantının SDS'e karşı daha dirençli olmasıyla bağdaşmaktadır. Bu etkileşimlerle birlikte, 20 ve 109. rezidülerin metil gruplarından çözücüyle temas eden bir fenil grubunun uzaklaşmış olması termostabiliteyi artırmıştır. F20A ve V109S mutasyonları yüzey hidrofobisitesini düşürmek veya ebeveyn enzimlerde bulunmayan bir takım stabilize edici etkileşimler kurmak yoluyla sıcaklık kararlılığını yükseltmiştir.

DNA karıştırma yönteminin kullanıldığı doktora tez çalışmasında elde edilen L3-3 mutantının enzim aktivitesi ve sıcaklık kararlılığı aynı anda artırılmıştır. Çalışmada tek DNA karıştırma döngüsü kullanılmıştır. Benzer bir durum, *Candida antarctica* lipase B ile yapılan çalışmayla elde edilmiştir. Bu çalışmada iki yönlü tarama yaklaşımı kullanılarak, varyantlar hem aktivite artışı hem de sıcaklık kararlılığı artışı yönünden taranarak, iyileşmiş varyantlar seçilmiştir. Varyantlardaki iyileşmenin 11-20 kat olduğu rapor edilmiştir (Suen ve ark., 2004).

SONUÇ

Doktora tez çalışmasında, DNA karıştırma yöntemi ile yerel *Bacillus pumilus* soylarının ürettiği lipaz enziminin özellikleri iyileştirilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalara bakıldığında, DNA karıştırma yönteminin *Bacillus pumilus* lipazlarına ilk kez uygulandığı görülmüştür.

Tez projesinin genetik materyali olan yerel *Bacillus pumilus* lipaz genleri, primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve klonlanmıştır. Klonlanan L5 ve L21 *B. pumilus* soylarının kromozomal DNA'larının PCR ile çoğaltılan açık okuma çerçevesi 648 bç büyüklüğünde bulunmuştur. TA klonlama yöntemiyle gerçekleştirilen klonlama basamağında pTZ57R/T vektörü kullanılmıştır. 648 bç büyüklüğündeki ORF dizileme çalışmaları ile doğrulanmıştır. Öncül lipazı kodlayan 645 bç büyüklüğündeki parça, 215 amino asit içermektedir. DNA translasyonu, kodlanmış enzimlerin 34-rezidümlük sinyal peptit içerdiğini göstermiştir. Olgun enzimin kesilmesinden sonra, 181 amino asit rezidüsü taşıyan, yaklaşık 19 kDa moleküler büyüklükteki bir protein olduğu belirlenmiştir. Dizi analizi çalışmaları, L5 ve L21 ebeveyn lipazların DNA düzeyinde % 85, protein düzeyinde de % 89 oranında benzerlik taşıdığını göstermiştir. Her iki ebeveyn lipazın, yapısal analizlerde referans olarak kullanılan *B. subtilis* lipase A (ref) ile protein düzeyinde % 78 oranında benzerlik taşıdığı bulunmuştur.

L5 ve L21 olmak üzere iki *B. pumilus* ebeveyn lipazı ile gerçekleştirilen tek döngü DNA karıştırma uygulanması sonucunda, spesifik aktivitesi 8 kat, yarı ömrü (50 °C'ta) 9 kata kadar artış gösteren kimerik mutant (L3-3) elde edilmiştir. Mutant L3-3'ün çeşitli deterjanlar ve organik çözücüler karşısında, ebeveyn enzimlere görece gösterdiği yüksek tolerans, enzimin biyokatalizör olarak kullanılması olasılığını güçlendirmektedir.

Hazırlanan güvenilir homoloji modellerine dayanarak, L3-3'ün sıcaklık kararlılığında gözlemlenen artışın;

(a) yapısal birimler arasındaki etkileşimlerin (hidrojen bağlanmaları) güçlenmesi sonucu enzim yapısının rijidifikasyonu ve

(b) enzim yüzeyindeki hidrofobik bölgelerin (A15G, F20A, V109S) uzaklaştırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Benzer faktörlerin *Bacillus subtilis* lipaz A mutantlarının (Ahmad ve ark., 2008; Kamal ve ark., 2011) yükselen sıcaklık kararlılıklarıyla ilişkilendirildiği bilinmektedir.

Enzimatik aktivitede kaydedilen yükselişin, mutant L3-3 ve ebeveyn L5 arasında bulunduğu gözlemlenen altı farklılığın substrat bağlayıcı bölge yakınında bir lup içinde yerleşmiş olan üç tanesinden (I12M, G14S, A15G) ileri geldiği düşünülmektedir. Bu mutasyonların, enzimin substrat bağlamasını etkilediği ve kovalent reaksiyon ara ürün hidrolizini artırdığı ancak substrat özgüllüğünü etkilemediği kanısına varılmıştır. Mutasyonların sinerjistik etkileri olabileceği göz önünde bulundurularak gerçekleştirilen analiz ile L3-3 mutantında bulunan her mutasyonun tek başına, gözlemlenen gelişmeleri destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, tek bir evrimsel döngüde oluşturulan görece az sayıda mutasyon ile aktivite ve sıcaklık kararlılığında iyileşme gösteren varyantların evrilebilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir. Evrimsel döngü sayısının artırılması ve yüksek aktivite ile sıcaklık kararlılığını hedefleyen tarama yöntemlerinin bir arada kullanılması *B. pumilus* lipazlarının daha ileri evrimlerini mümkün kılacaktır.

Yapılan dizi analizi çalışmaları sonucunda ebeveyn enzimlerin lipaz gen dizisi, **JX163855** (L5) ve **JX163856** (L21) erişim numaralarıyla GenBank veritabanına depo edilmiştir.

Doktora tez çalışması “Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution” başlığıyla, “Journal of Biotechnology 10.1016/j.jbiotec.2012.12.016” dergisinde yayınlanmıştır. İlgili yayın tez ekinde yer almaktadır.

KAYNAKLAR

1. Acharya, P., Rajakumara, E., Sankaranarayanan, R., Rao, N.M. Structural Basis of Selection and Thermostability of Laboratory Evolved *Bacillus subtilis* Lipase. J. Mol. Biol. 2004;341:1271-1281.
2. Aharoni, A., Griffiths, A.D., & Tawfik, D.S. High-throughput screens and selections of enzyme encoding genes. Curr Opin Chem Biol. 2005;9:210-216.
3. Ahmad, S., Kamal, M. Z., Sankaranarayanan, R., & Rao, N. M. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: In vitro evolution and structural insight. J. Mol. Biol. 2008;381:324-340
4. Arnold, F.H. and Georgiou, G. Directed enzyme evolution: screening and selection methods. Humana Pres 2003; Totowa, N.J.
5. Arnold, F.H. & Moore, J.C. Optimizing industrial enzymes by directed evolution. Adv Biochem Eng Biotechnol. 1997;58:1-14.
6. Arpigny, J.L. and Jaeger, K.E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J. 1999;343:177-183.
7. Beilen, J. B. V. and Li, Z. Enzyme technology: an overview. Current Opinion in Biotechnology 2002;13:338-344.
8. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. Biochemistry 5th Edition, New York: W. H. Freeman and Co., 2002.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-254.

10. Boersma, Y. L., Dröge, M. J., Quax, W. J. Selection Strategies for Improved Biocatalysts. *FEBS Journal*. 2007;274:2181-2195.
11. Boersma, Y.L., Pijning, T., Bosma, M.S., van der Sloot, A.M., Godinho, L.F., Dröge, M.J., Winter, R.T., van Pouderooyen, G., Dijkstra, B.W., Quax, W.J. Loop grafting of *Bacillus subtilis* lipase A: inversion of enantioselectivity. *Chem. Biol*. 2008;15:782-789.
12. Bornscheuer, U.T. Trends and challenges in enzyme technology. *Adv Biochem Engin Biotechnol*. 2005;100:181-203.
13. Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R., and Krishna, S.H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol*. 2002;20:1-5.
14. Bornscheuer, U.T., Pohl, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design Review Article *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001;5:137-143.
15. Cadwell, C. and Joyce, G.F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl*. 1992;2:28-33.
16. Cohen N., Abramov S., Dror Y., Freeman A., “In vitro enzyme evolution:the screening challenge of isolating the one in a million”, *TRENDS in Biotechnology*. 2001;19:307-310.
17. Chirumamilla, R.R., Muralidhar, R., Marchant, R., Nigam, P. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2001;224:159-168.
18. Chothia, C. and Lesk, A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in Proteins. *The EMBO Journal*. 1986;5:823-826.

19. Cramer, A., Whitehorn, E., Tate, E. & Stemmer, W. P. C. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotech.* 1996;14:315-319.
20. Cramer, A., Dawes, G., Rodriguez, E., Silver, S. & Stemmer, W. P. C. Molecular Evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. *Nature Biotech.* 1997;15:436-438.
21. Cramer, A., Sun-Ai Raillard, Ericka Bermudez & Willem P. C. Stemmer. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *NATURE.* 1998;391:288-291.
22. Dalby, P.A. Optimising enzyme function by directed evolution. *Curr Opin Struc Biol.* 2003;13:500-505.
23. Dartois, V., Coppée, J.Y., Colson, C., & Baulard, A. Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:1670-1673.
24. del Rio, G., Rodriguez, M.-E., Munguia, M.-E., Lopez-Munguia, A. and Soberon, X. Mutant *Escherichia coli* penicillin acylase with enhanced stability at alkaline pH. *Biotechnology and Bioengineering.* 1995;48:141-148.
25. Dennison C., A guide to protein isolation, USA: Kluwer Academic Publishers, 2002.
26. Dröge, M. J., Boersma, Y. L., van Pouderoyen, G., Vrenken, T. E., Ruggeberg, C. J., Reetz, M. T., Dijkstra, B. W., & Quax, W. J. Directed evolution of *Bacillus subtilis* lipase A by use of enantiomeric phosphonate inhibitors: Crystal structures and phage display selection. *ChemBioChem.* 2006;7:149-157.
27. Eggert, T., Pouderoyen G. V., Pencreac'h G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B.W., Jaeger, K-E. Biochemical properties and three-dimensional

- structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2002;26:37-46.
28. Eggert, T., Pouderoyen, G. V., Dijkstra, B. W., & Jaeger, K.-E. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties and three-dimensional structure. *FEBS letters*. 2001;502:89-92.
29. Eom, G. T., Song, J. H., Ahn, J. A., Seo, Y. S., and Rhee, J. S. Enhancement of the Efficiency of Secretion of Heterologous Lipase in *Escherichia coli* by Directed Evolution of the ABC Transporter system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005;71:3468-3474.
30. Fang, Y., Lu, Y., Lv, F., Bie, X., Zhao, H., Wang, Y., Lu, Z. Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 by directed evolution. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009;44:84-88.
31. Farinas, E. T., Bulter, T., & Arnold, F. H. Directed enzyme evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 2001;12:545-551.
32. Fernandez-Gacio, A., Uguen, M., Fastrez, J., Phage Display as A Tool for The Directed Evolution of Enzymes, *TRENDS in Biotechnology*. 2003;21:408-14.
33. Frederick, M. *Current protocols in molecular biology*, 1993.
34. Gaur, R., Gupta, A., & Khare, S. K., 2008. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochem*. 2008;43:1040-1046.
35. Guo, B. and Bi, Y., *PCR Cloning Protocols*, Humana Press., 2002.

36. Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;64:763-781.
37. Gümüşel, F., İşsever Öztürk, S., Tuzlakoğlu, M., Akbulut, N., Kayman, Ş.S. Seçilmiş yerel *Bacillus* soylarının moleküler tiplendirme yöntemleriyle tanımlanması. Tübitak TBAG105T188, 2008.
38. Hanes, J. and Pluckthun, A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:4937-4942.
39. Harwood, C.R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. Tıbtch 1992;10:247-526.
40. Hibbert E.G., Baganz F., Hailes H.C., Ward J.M., Lye G.J., Woodley J.M., Dalby P. A. Directed evolution of biocatalytic processes. Biomolecular Engineering. 2005;22:11-19.
41. Hibbert, E.G., Dalby, P.A., Directed Evolution Strategies for Improved Enzymatic Performance, Microbial Cell Factories. 2005;4:1-6
42. Holmquist, M. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. Curr Prot Pept Sci. 2000;1:209-235.
43. Houde, A., Kademi, A. and Leblanc, D. Lipases and their industrial applications. Applied Biochemistry And Biotechnology 2003;118:155-170.
44. Hun, C. J., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M., 2003. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. Biochem. Eng. J. 2003;15:147-151.
45. Jaeger, K.E., Ransac, A., Dijkstra, B.W., Colson, C., Heuvel, M. and Misset, O. Bacterial lipases. FEMS Microbiology 1994;15:29-63.

46. Jaeger, Karl-Erich and Reetz, M.T. Microbial Lipases form versatile tools for biotechnology. *TIPTECH* 1998;16:396-403.
47. Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol* 1999;53:315-351.
48. Jaeger, K-E., Reetz, M.T., Dijkstra, B.W. Directed Evolution To Produce Enantioselective Biocatalysts. *ASM News*. 2002;68:556-562.
49. Jaeger, K.-E. & Eggert, T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotech.* 2002;13:390-397.
50. Jaroszewski, L., Li, Z., Cai, X-H, Weber, C., Godzik, A. FFAS server: novel features and applications. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:38-44.
51. Joern, J.M., Meinhold, P., and Arnold F. Analysis of shuffled gene libraries. *J. Mol. Biol.* 2002;316:643-656.
52. Johannes, T.W. & Zhao, H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9:261-267.
53. Jung, H-C., Ko, S., Ju, S-J., Kim, E-J., Kim, M-K., Pan, J-G., Bacterial Cell Surface Display of Lipase and Its Randomly Mutated Library Facilitates High-Throughput Screening of Mutants Showing Higher Specific Activities, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2003;26:177-184.
54. İşsever Öztürk, S., T. Öztürk, M., Akbulut, N., Kayman S., Gümüşel, F., “Endüstriyel Enzim Üreticisi *Bacillus* İzolatlarının Moleküler Tiplendirme Yöntemleriyle Tanımlanması, “5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 25-28 Haziran 2008.

55. Kabsch, W., Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 1983;22:2577-2637.
56. Kamal, M.Z., Ahmad, S., Molugu, T.R., Vijayalakshmi, A., Deshmukh, M.V., Sankaranarayanan, R., & Rao, N.M. In vitro evolved non-aggregating and thermostable lipase: Structural and thermodynamic investigation. *J. Mol. Biol.* 2011;413:726-741.
57. Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A., Purification and properties of thermosable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2003;22:307-313.
58. Kaur, J. and Sharma, R. Directed Evolution: An Approach to Engineer Enzymes. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2006;26:165-199.
59. Kay, B.K., Winter, J. and McCafferty, J. Phage display of peptides and proteins : a laboratory manual. Academic Press, San Diego.1996.
60. Kelley, LA, Sternberg MJ (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*. 2009;4:363-371.
61. Kikuchi, M., Ohnishi, K., Harayama, S. An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene*. 2000;243:133-137.
62. Kim, K.R., Kwon, D.Y., Yoon, S.H., Kim, W.Y., Kim, K.H. Purification, refolding and characterization of recombination *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Protein Expression and Purification* 2005;39:124-129.
63. Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002;13:345-351.

64. Kuchner, O., Arnold, F.H. Directed evolution of enzyme catalysts Review Article Trends in Biotechnology. 1997;15:523-530.
65. Kumar, S., Tsai, C., & Nussinov, R. Factors enhancing protein thermostability. Protein Eng. 2000;13:179-191.
66. Krieger, E., Nabuurs, S.B. and Vriend, G. HOMOLOGY MODELING. *Structural Bioinformatics* Edited by Philip E. Bourne and Helge Weissig ISBN 0-471-20199-5 Copyright 2003 by Wiley-Liss, Inc.
67. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685.
68. Kelley, L.A., & Sternberg, M.J.E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. NATURE PROTOCOLS. 2009;4:363-371.
69. Lee S.Y., Rhee J.S., Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3 SK. Enzyme Microbial Technology. 1993;15:617-623
70. Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. Eur. J. Biochem. 1993;216:155-160.
71. Li, J., Chen, S., Li, L., Yu, Y., Fei, Z., Qiao, D., & Cao, Y., 2012. Approach of directed evolution of microbial lipases and biodiesel catalysis. Afr. J. Microbiol. Res. 2012;6:637-642.
72. Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., and Jaeger, K.-E. Directed evolution of an enantioselective lipase. Chemistry & Biology 2000;7:709-718.
73. Lin-Goerke, J.L., Robbins, D.L., and Burczak, J.D. PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. BioTechniques. 1997;23:409-412.

74. Lotrakul, P., Dharmsthiti, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *Journal of Biotechnology*. 1997;54:113-120.
75. Lorimer IA, Pastan I. Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNase I in the presence of Mn^{2+} . *Nucl Acids Res*. 1995;23:3067-8.
76. Martinez,C., Nicolas A., Tilbeurgh, H.V., Egloff, M.P., Cudrey, C., Verger, R., & Cambillau, C. Cutinase,a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry*. 1994;33:83-89.
77. Matsuura, T. & Yomo, T. In vitro evolution of proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;101:449-456.
78. Maxam, E.M and Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Biochemistry* 1977;74:560-564.
79. Miyazaki, K. and Takenouchi, M. Short Technical Reports *BioTechniques*. 2002;33:5.
80. Moore, J. C. & Arnold, F. H. Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nature Biotech*. 1996;14:458-467.
81. Nardini, M., Lang, D.A., Liebeton, K. Karl-Erich Jaeger, K.E., and Dijkstra, B.W. Crystal Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Lipase in the Open Conformation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2000;40: 31219-31225.
82. Nthangeni, M. B., Patterson, H., van Tonder, A., Vergeer, W. P., & Litthauer, D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: A comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microb. Tech*. 2001;28:705-712.

83. Olsen, M., Iverson, B. and Georgiou, G. High-throughput screening enzyme libraries. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000;11:331-337.
84. Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B.W., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J.D., & et al The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 1992;5:197-211.
85. Otten, L.G. & Quax, W.J. Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol Engineer.* 2005;22:1-9.
86. Palatinszky, M., Nikolausz, M., Svab, D., Marialigeti, K. Preferential ligation during TA-cloning of multitemplate PCR products-A factor causing bias in microbial community structure analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 2011;85:131-136.
87. Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemistry* 1999;29:119-131.
88. Peng, R-H., Xiong, A-S, Liu, J-G, Xu, F., Bin, C., Zhu, H., Yao, Q-H. Adenosine added on the primer 5'end improved TA cloning efficiency of polymerase chain reaction products. *Analytical Biochemistry*. 2007;363:163-165.
89. Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.E. and Dijkstra, B.W. The crystal structure of *Bacillus Subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* 2001;309:215-226.
90. Reetz, M.T. Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol.* 2002;6:145-150.
91. Rosenau, F., Tommassen, J. and Jaeger, K.E. Lipase-specific foldases. *ChemBioChem* 2004;5:152-161.

92. Rost, B. Twilight zone of protein sequence alignments *Protein Engineering*. 1999;12:85-94.
93. Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
94. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry*. 1977;74:5463-5467.
95. Schuster, S., Enzelberger, M., Trauthwein, H., Schmid, R.D. and Urlacher, V.B. pHluorin-based in vivo assay for hydrolase screening. *Analytical chemistry*. 2005;77:2727-2732.
96. Shafikhani, S., Siegel, R. A., Ferrari, E., and Schellenberger, V. Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *Bio Techniques*. 1997;23:304-310.
97. Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H.I., Kato, Y. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 1998;20:304-307.
98. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. Production, Purification, Characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 2001;19:627-662.
99. Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. and Gulati, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science* 1999;77:101-125.
100. Schmid, R.D. and Verger, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998;37:1608-1633.

101. Schmidt-Dannert, C. Directed Evolution of Single Proteins, Metabolic Pathways, and Viruses, *Biochemistry*. 2001;40:13125-36.
102. Schmidt, M., Bornscheuer, U.T. High-Throughput Assays For Lipases And Esterases, *Biomolecular Engineering*. 2005;22:51-56.
103. Scopes, K.R, *Protein Purification, Principles and Practise* 3rd Edition, New york: Springer-Verlag New York Inc. 1994.
104. Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F-M. Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, purification, and characterization. *Protein Expression and Purification* 2001;22:388-398.
105. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. Production, Purification, Characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 2001;19:627-662.
106. Sneath, Peter H. A. Endospore-Forming Gram-Positive Rod and Cocci, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, Williams and Wilkins, 1986.
107. Songsiriritthigul, C., Pesatcha, P., Eijsink, V. G. H. and Yamabhai, M. Directed evolution of a *Bacillus chitinase*. *Biotechnol. J.* 2009;4:501-509.
108. Stemmer, WPC. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Nature* 1994;370:389-91.
109. Stemmer, W.P.C. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*. 1994;370:389-391.
110. Stemmer, W.P.C. Molecular Breeding of Genes, Pathways and Genomes by DNA Shuffling. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2002;7:121-129.

111. Suen, W-C, Zhang, N., Xiao, L., Madison, V., and Zaks, A. Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Engineering, Design & Selection*. 2004;17:133-140.
112. Turner, N.J. Directed evolution of enzyme for applied biocatalysis. *Trends in Biotechnology*. 2003;21:474-478.
113. Tuzlakoglu, M., Balci, H., Battal, M., Gokmen, F., I. Ozturk, S., Artunkal, S., Gumusel, F. Yerel kaynaklardan endüstriyel enzim üreticisi bakteri soylarının seçilmesi ve tanımlanmasına yönelik çalışmalar., XIII. Biyoteknoloji Kongresi; Bildiriler kitabı, Çanakkale, 2003, pp: 326-331.
114. van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger. KE, Dijkstra, BW. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol* 2001;309:215-226.
115. Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L., Denolf, P. Reducing mutational bias in random protein libraries. *Analytical Biochemistry*. 2005;339:9-14.
116. Verger, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *TIBTECH*. 1997;15:32-38.
117. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors, and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18, and pUC19 vectors. *Gene* 1985;33:103-119.
118. Wahler, D. and Reymond J.L. Novel methods for biocatalyst screening. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001;5:152-158.
119. Wahler, D. & Reymond, J.L. High-throughput screening for biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12:535-544.

120. Wang, T., Zhu, H., Ma, X., Zhang, T., Ma, Y., Wei, D. "Mutant library construction in directed molecular evolution", *Molecular Biotechnology*. 2006;34:55-68.
121. Winkler, U.K., & Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 1979;138:663-670.
122. Wong, T.S., Tee, K.L., Hauer, B., and Schwaneberg, U. Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:1-8.
123. Wong, T.S., Zhurina, D., & Schwaneberg, U. The diversity challenge in directed protein evolution. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2006;9:271-288.
124. Zha, D., Eipper, A., and Reetz, M. T. Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: A new tool in directed evolution. *Chem Bio Chem.* 2003;4:34-39.
125. Zhang, J., Dawes, G. & Stemmer, W.P.C. Evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997;94:4504-4509.
126. Zhao, H. and Arnold, F. H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Research*, 1997;25:1307-1308.
127. Zhao, H. and Arnold, F.H. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein engineering.* 1999;12:47-53.

ÖZGEÇMİŞ

Nagihan Akbulut 1978 yılında Trabzon’da doğdu. 1997 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2002 yılında tamamlayarak, 2003 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2006 yılında tamamlayarak, aynı yıl Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda doktora programına başladı. 2004 yılından itibaren Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.



Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution

Nagihan Akbulut^{a,*}, Merve Tuzlakoğlu Öztürk^a, Tjaard Pijning^b, Saliha İşsever Öztürk^a, Füsün Gümüsel^{a,1}

^a Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Institute of Technology (GIT), 41400 Kocaeli, Türkiye

^b Laboratory of Biophysical Chemistry, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute (GBB), University of Groningen, Nijenborgh 7, 9747 AG Groningen, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2012

Received in revised form

20 December 2012

Accepted 21 December 2012

Available online 11 January 2013

Keywords:

Bacillus pumilus lipase

Biocatalyst

Directed evolution

DNA shuffling

Thermostability

3D homology model

ABSTRACT

To improve enzymatic activity of *Bacillus pumilus* lipases, DNA shuffling was applied to two lipase genes from local *B. pumilus* isolates. Using a high-throughput activity assay, the mutant with highest activity was selected. This chimeric mutant (L3-3), carrying two crossover positions and three point mutations, has a specific activity 6.4 and 8.2 times higher than the two parent enzymes. The mutant also is more tolerant to various detergents and organic solvents, and has a 9 times longer half-life at 50 °C. Homology modeling of mutant L3-3, based on the highly homologous *B. subtilis* lipase A, shows that the increased thermostability is likely due to structural rigidification and reduced surface hydrophobicity. Increased specific activity may result from the location of mutations close to the active site. Together, our results show that it is possible to evolve, by DNA shuffling, *B. pumilus* lipase variants with improved applicability as biocatalysts, even if the two parent enzymes are highly similar.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis and synthesis of esters of glycerol and long-chain fatty acids. Microbial lipases are of commercial interest for chemical, food, pharmaceutical, detergent and other industrial applications (Jaeger and Eggert, 2002; Pandey et al., 1999; Sharma et al., 2001). Among them, *Bacillus pumilus* lipases have been classified as members of subfamily I.4, sharing sequence identities of 74–77% (Arpigny and Jaeger, 1999; Jaeger et al., 1999); also the well-characterized *Bacillus subtilis* lipases belong to this family. The subfamily I.4 lipases are the smallest lipases known, having a minimal α/β hydrolase fold (van Pouderooyen et al., 2001) and a solvent-exposed substrate-binding site.

In order to use lipases as biocatalysts in industrial applications, it is often desirable to improve properties such as activity (in aqueous or organic solvent environments), thermostability, substrate specificity and enantioselectivity (Arnold and Volkov, 1999; Reetz,

2004). Directed evolution is a powerful approach to achieve such improvements. Rapid generation of molecular diversity is essential, and one of the best methods to achieve this is homologous recombination through DNA shuffling (Cramer et al., 1998). When coupled with high-throughput screening, DNA shuffling and other directed evolution methods have often resulted in remarkable improvements of activity, thermostability or enantioselectivity (Cramer et al., 1998; Reetz, 2004; Schmidt-Dannert and Arnold, 1999). The lipase A from *B. subtilis* has been the subject of several such studies (Acharya et al., 2004; Ahmad et al., 2008; Augustyniak et al., 2012; Dröge et al., 2006; Kamal et al., 2011). In contrast, a directed evolution approach for *B. pumilus* lipase has only been reported by Huang et al. (2008) who used error-prone PCR to evolve mutants with increased activity.

We applied the DNA shuffling method, coupled with a high-throughput screening assay, to improve the activity of lipases of subfamily I.4 produced by local isolates of *B. pumilus*. The lipase mutant (L3-3) showing the highest activity was sequenced and purified, and biochemically characterized. Obtained after a single round of DNA shuffling from two parents sharing 89% identity, this chimeric mutant has two cross-over positions and carries three point mutations. Its activity was 6.4 and 8.2 times higher than that of the two parent enzymes. Surprisingly, L3-3 also displayed a remarkable increase in thermostability, with a 9 times longer half-life ($T_{1/2}$) at 50 °C. Taking advantage of the high sequence similarity

* Corresponding author. Tel.: +90 2626052540; fax: +90 2626052505.

E-mail addresses: nakbulut@gyte.edu.tr, nagihanakbulut@gmail.com (N. Akbulut).

¹ During this work, Prof. Dr. Füsün Gümüsel passed away; we remember her with respect.

with *B. subtilis* lipase A, a 3D homology model was constructed for L3-3, and the role of sequence differences between the mutant and the parents on enzyme activity and thermostability is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and identification

Bacterial strains L5 and L21 had been isolated by traditional bacteriological methods from hot springs at Balıkesir and Bursa, Türkiye (Tuzlakoglu et al., 2003). Characterization of the strains was done using biochemical tests, microscopical observations (Sneath, 1984) and 16S rRNA gene sequencing (İşsever Öztürk et al., 2008). Database homology searches were performed with BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2. Cloning and expression of parent lipase genes

Chromosomal DNA was isolated from *B. pumilus* strains L5 and L21 (Tuzlakoglu et al., 2003; İşsever Öztürk et al., 2008) and used to amplify by PCR the lipase-encoding genes, using a pair of degenerate primers (forward: 21F, reverse: 22R). After 30 amplification cycles, a 0.65-kb PCR product was recovered from an agarose gel. Cloning was carried out with InstAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas). The purified PCR products were ligated in pTZ57R/T, and *E. coli* JM109 cells were transformed with this ligation product. The resulting plasmids were named pTZ-L5 and pTZ-L21. For expression studies, *Hind*III–*Eco*RI fragments from the plasmids pTZ-L5 and pTZ-L21 were subcloned into the expression vector pUC19 previously digested with the same enzymes, separately. *E. coli* JM109 cells carrying recombinant vectors were grown for 24 h in the presence of ampicillin (100 µg/ml) and gene expression was induced with a final concentration of 0.1 mM IPTG.

2.3. DNA shuffling library construction

A library of random fragments was constructed using modified DNA shuffling methods (Lorimer and Pastan, 1995; Stemmer, 1994; Zhao and Arnold, 1997). Two 0.65 kb DNA fragments containing lipase genes from L5 and L21 were amplified by using primers 21F and 22R. Fragments of 0.65 kb were purified from 1% agarose gel. Parent DNA fragments were digested with bovine pancreas DNase I in the presence of Mn²⁺. A mixture of 50 µl (containing 1.5 µg of each parent DNA) and 5 µl 10× digestion buffer (50 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)–HCl, 10 mM MnCl₂) was equilibrated at 25 °C for 5 min; 0.45 U of DNase I (diluted in 1× digestion buffer) was added. Digestion was performed at 25 °C and terminated after 11 min by heating at 90 °C for 10 min. The digested fragments were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis; fragments of <70 bp were isolated and purified from the gel.

PCR without primers. The reaction volume (50 µl) contained 20 µl purified fragments, 0.4 mM dNTP mix, 2.5 U *Pfu* DNA polymerase, 1× *Pfu* DNA polymerase reaction buffer. The following PCR protocol was applied: 3 min at 96 °C, 40 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 1 min + 5 s/cycle at 72 °C, 10 min at 72 °C.

PCR with primers. The reaction mixture containing reassembled DNA-fragments (1 µl) along with primers 21F and 22R was used to amplify the full-length genes, using the same PCR cycling program as described in *PCR without primers*. PCR conditions (50 µl final volume): 80 pmol of each primer, 1× *Taq* polymerase reaction buffer, 0.2 mM dNTP mix (Roche) and 2.5 U *Taq/Pfu* (1:1) polymerase mixture.

The purified PCR product was digested with *Hind*III–*Eco*RI and ligated into plasmid pUC19, which had been digested with corresponding restriction enzymes to create the recombination library. Freshly prepared *E. coli* JM109 cells were transformed with the

resulting DNA mixture. Cells were plated on LB-agar containing 1.5% agar and 1% ampicillin, and incubated overnight.

2.4. Enzyme expression and library screening

Active transformants were assessed by a three-step screening protocol. First, transformant colonies were replicated on tributyrin-agar plates containing 0.15% Gum Arabic and 1.5% tributyrin in LB-agar (Liebeton et al., 2000), supplemented with 1% ampicillin. After incubation for 16 h, enzyme secretion into the medium was induced by incubation for 6 h at 4 °C. Transformants showing lipase activity (resulting in clear halos surrounding the colonies) were selected.

In the second step, selected variants were inoculated into the individual wells of 96-well plates containing 250 µl LB with 1% ampicillin. After overnight growth (37 °C), lipase activity in the culture supernatant was assayed quantitatively using pNP-palmitate as substrate, according to the method of Eom et al. (2005) with slight modifications; absorbance at 405 nm was measured with a Fluostar Omega Microplate Reader (BMG Labtech). Measured activities were normalized for culture density; variants showing a higher normalized activity than parent strains were selected.

Selected variants were further confirmed and analyzed in a third step by growing them in shake flask cultures at 37 °C. Ten milliliters of LB medium containing 1% ampicillin were inoculated with 0.1 ml pre-culture; gene expression was induced with 0.1 mM IPTG. Normalized lipase activity was assayed according to the method of Winkler and Stuckmann (1979).

2.5. DNA sequencing, purification and characterization of parents and mutant lipase

The plasmid DNA of parents L5 and L21 and of the transformant with highest activity was isolated and sequenced (see Supplementary Material, Section 1.3). The expressed lipase enzymes were subjected to a single-step purification; their purity was determined from an SDS-PAGE gel. Purification details and characterization of the purified enzymes by determination of temperature and pH profiles and stability, the effect of various detergents, organic solvents, metal ions and inhibitors on activity, and analysis of substrate specificity are described in Supplementary Material (Section 1.4).

2.6. Modeling studies

After analysis of the *B. pumilus* L3-3 mutant sequence by the FFAS03 server (Jaroszewski et al., 2011) the structure with the highest sequence identity (78%), *B. subtilis* lipase A (PDB ID: 116W (van Pouderoyen et al., 2001)), was used as a template in the “One-to-one threading” protocol of the Phyre2 server (Kelley and Sternberg, 2009) to obtain 3D models of mutant L3-3 and parents L5 and L21. Differences and mutation positions of the models were evaluated in PyMOL (Schrödinger, LLC, version 1.2r1) by looking at interaction possibilities and clash problems. Secondary structure assignment was calculated with DSSP (Kabsch and Sander, 1983); hydrogen-bonding was assessed within PyMOL. Structural figures were prepared with PyMOL.

3. Results

3.1. Isolation and identification of lipase-producing strains

Characterization of the bacterial strains previously isolated from hot springs near Balıkesir and Bursa (Türkiye) showed that they are Gram-positive, rod shaped, aerobic, catalase-positive and spore

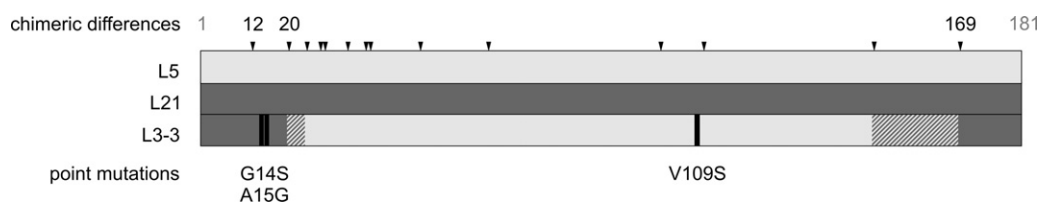


Fig. 1. Schematic representation of the sequences of the two *Bacillus pumilus* parents (L5, light gray, and L21, dark gray) and mutant L3-3. Dark gray and light gray colors in the L3-3 mutant indicate from which parent the L3-3 mutant derived its sequence. Because of local homology at the DNA level, the crossover positions in L3-3 cannot be determined exactly; the first crossover position is between residues 20/21 and 23/24, and the second crossover position is between residues 149/150 and 168/169, as indicated by the shaded parts. Chimeric differences between the two parents are indicated with black triangles; the 3 point mutations in the L3-3 mutant are indicated with black bars. A more detailed alignment is given in [Supplementary Material Fig. S2](#).

forming. Biochemical tests and 16S rDNA gene analysis identified the strains as *B. pumilus*, and they were designated as L5 and L21.

3.2. Cloning, sequencing and expression of the parent lipases

The 0.65 kbp lipase open reading frames (ORFs) of the two *B. pumilus* strains L5 and L21 were amplified from the chromosomal DNA ([Supplementary Material Fig. S1](#)). Cloning into pTZ57R/T and subsequent DNA isolation and sequencing confirmed the presence of ORFs of 645 bp, encoding precursor lipases of 215 amino acid residues. DNA translation showed that the encoded enzymes contain a 34-residue signal peptide (SignalP 4.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>); after cleavage, the mature enzymes thus contain 181 amino acid residues. Sequence analysis revealed that the L5 and L21 parent lipases share 89% identity with each other (at the protein level), and 78% identity with *B. subtilis* lipase A ([Supplementary Material Fig. S2](#)). The parent lipase gene sequences have been deposited in GenBank with accession numbers JX163855 (L5) and JX163856 (L21).

The L5 and L21 lipase genes were successfully subcloned into a pUC19 vector, as confirmed by digestion of the recombinant plasmid and identification of the 645 bp DNA fragments. Transformation of *E. coli* JM109 cells with the recombinant plasmids resulted in active expression of the lipases, as was confirmed by lipase activity assays.

3.3. DNA shuffling and screening of the library

A random *B. pumilus* lipase library was generated by DNA shuffling, using <70 bp fragments obtained from the two *B. pumilus* lipase parent genes L5 and L21. Reassembled products ran as single bands with the correct size on agarose gels ([Supplementary Material Fig. S1](#)). These were used to transform *E. coli* JM109 cells; 5500 transformants (55%) expressed a functional lipase, forming clear halos due to the hydrolysis of tributyrin. The 350 transformants with highest activity (as judged by eye) were selected for the second screening step. From these, the 16 transformants showing a higher activity than the parent strains were selected for a third screening step, in which more favorable conditions for bacterial growth were applied. The transformant showing the highest normalized activity was further characterized by comparison with the two parent lipases. Sequencing revealed that the lipase expressed by this transformant (L3-3) is a chimeric mutant with 2 crossover positions, resulting in a large middle fragment originating from the L5 parent, and shorter N- and C-terminal fragments derived from the L21 parent ([Fig. 1](#) and [Supplementary Material Fig. S2](#)). There are 11 “chimeric differences” (residues that differ between the two parent enzymes) in the middle fragment and 3 such differences in the terminal fragments. In addition, L3-3 carries 3 point mutations (G14S, A15G and V109S); they do not stem from either parent, nor are they present in *B. subtilis* lipase A. Consequently, L3-3 is

Table 1

Specific activity and half-life of the partially purified parent (L5, L21) and mutant (L3-3) enzymes. The specific activity is given before (raw) and after correction for purity (40, 25 and 60% for L5, L21 and L3-3, respectively).

	L5	L21	L3-3
Raw specific activity (U/mg)	1150 ± 3	558 ± 4	11,012 ± 4
Corrected specific activity (U/mg)	2878 ± 8	2238 ± 16	18,332 ± 7
$T_{1/2, 50^\circ\text{C}}$ (min)	4.20 ± 0.12	4.40 ± 0.03	38.5 ± 0.7

different from parent L5 at 6 positions, and different from parent L21 at 14 positions.

3.4. Purification and characterization of parent and mutant *B. pumilus* lipases

Results of the purification of the two parent *B. pumilus* lipases and mutant L3-3 are summarized in [Supplementary Material Table S1](#). Typically, the final yield of enzyme was about 50% of the initial activity, with a 9-fold increase in specific activity compared to the culture lysate supernatant. On SDS-PAGE, the purified enzymes were observed at about 19 kDa ([Supplementary Material Fig. S3](#)), with purities of about 40, 25 and 60% for L5, L21 and L3-3, respectively. We did not succeed in purifying the enzymes further.

For both parent and mutant lipases, the optimum temperature was 37 °C ([Supplementary Material Fig. S4](#)), but, after correction for the differences in purity, the specific activity of mutant L3-3 was about 6.4 and 8.2 times higher than that of the parents L5 and L21, respectively ([Table 1](#)). At higher temperatures, activity decreased fast to near-zero values at 55 °C, but the L3-3 mutant clearly retained more activity than the parent enzymes ([Fig. 2](#)). The

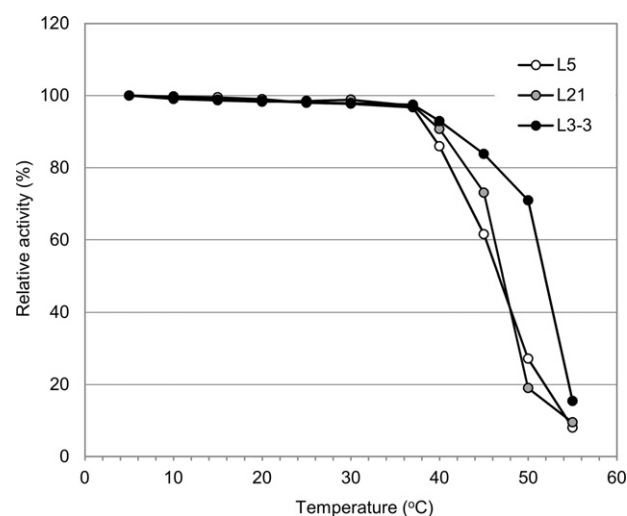


Fig. 2. Relative residual activity of parents (L5, L21) and L3-3 after pre-incubation at different temperatures for 30 min.

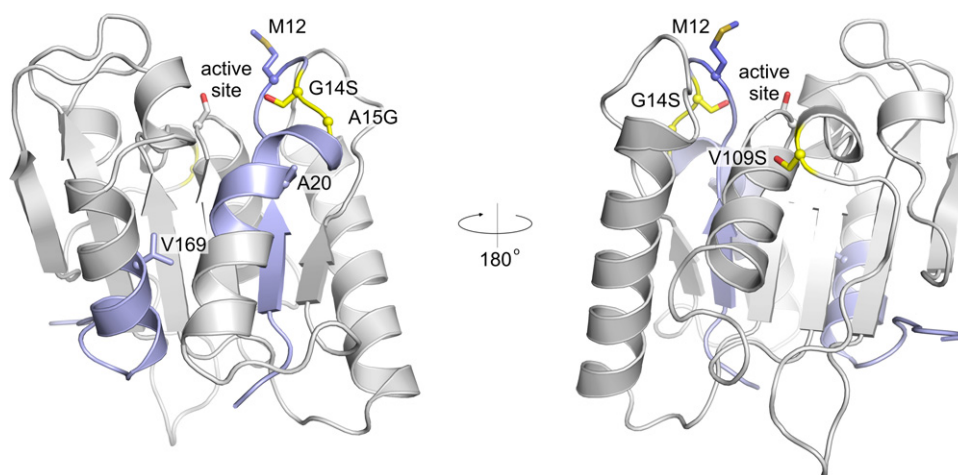


Fig. 3. 3D homology model of the *B. pumilus* L3-3 mutant, generated with Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009) based on the crystal structure of *B. subtilis* lipase A (van Pouderooyen et al., 2001). The N- and C-terminal polypeptide segments derived from parent L21, containing the 3 chimeric differences (M12, A20 and V169) are shown in blue; the middle segment derived from parent L5 is shown in gray. The three point mutations G14S, A15G and V109S are shown with yellow carbon atoms. The catalytic residue S77 in the active site is also shown. (For interpretation of the references to color in figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

half-life (at 50 °C) of mutant L3-3 was 9 times longer than that of the parent enzymes (Table 1).

The pH-activity profiles of both parents and mutant L3-3 were very similar (Supplementary Material Fig. S5a), with an optimum pH of 8.0. The residual activity profiles after 1 week of incubation at 4 °C were also similar, with 80–100% activity retained between pH 6.5 and 10.0 (Supplementary Material Fig. S5b).

Metal ions (10 mM) in general had modest effects (Supplementary Material Fig. S6, left panel); relative activities were in the range of 50–163%. The most prominent effect was observed for CuCl₂, which showed an increased activity for L3-3 while the parent lipases were inhibited. In addition, CoCl₂ and FeCl₂ increased activity of L3-3 significantly. The presence of CaCl₂ slightly inhibited the mutant, while the presence of EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) (1 or 10 mM) hardly affected activity; PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) strongly inhibited activity of both parent enzymes and the mutant (Supplementary Material Fig. S6, right panel).

All tested detergents, except for Na-deoxycholate, inhibited the activity of parent and mutant lipases at the highest tested concentration; CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) (1%) and SDS (sodium dodecyl sulfate) (1%) almost completely inactivated the enzymes (Supplementary Material Fig. S7a). However, in several cases mutant L3-3 retained a significantly higher activity than the parents, or was even stimulated.

Most of the tested organic solvents had a slightly inhibiting effect on the activity of parent enzymes at 10% concentration; this effect was stronger at higher concentration (30%) (Supplementary Material Fig. S7b). Notably, the L3-3 mutant showed a tolerance to all tested organic solvents at 10% concentration except isoamyl alcohol.

Analysis of the substrate specificity of parent and mutant lipases revealed only small variations (Supplementary Material Fig. S8); mutant L3-3 showed a slightly higher activity toward long chain triacylglycerol fatty acids than the parent enzymes.

3.5. Structural observations

The 3D models generated for the *B. pumilus* lipase L3-3 mutant (Fig. 3) and its L5 and L21 parents showed high Phyre confidence values. Of the 40 sequence differences between the *B. subtilis* lipase A and the *B. pumilus* L3-3 mutant (Supplementary Material Fig. S2), almost half are homologous substitutions. For 35 of these, the side

chains are at the surface and exposed to the solvent; the remaining differences are located in the hydrophobic core, and comprise at most one methylene or methyl group. About half (19) of the differences occur in non-regular secondary structure elements such as loops and 3_{10} helices. For the G14S mutation, a different side chain rotamer was chosen to avoid a close contact with the side chain of N18. For all other changed residues, no severe clash problems were observed. The three chimeric differences of L3-3 with parent L5 and the three point mutations in L3-3 are described below.

The chimeric differences (M12, A20 and V169). Residue 12 is located at the tip of a 6-residue loop (residues 10–15) connecting strand β 3 and helix η 1/ α A (Fig. 4a). Its side chain is exposed to the solvent, and the chimeric change from isoleucine to methionine may increase hydrophobic and van der Waals interactions with the substrate. Residue 20, at the start of helix α A, is located about 16 Å from the active site, and has a solvent-exposed side chain. Changing a phenylalanine to alanine at this position will considerably reduce the hydrophobicity at the surface, and the tendency to aggregate at higher temperatures. Residue 169 is in helix α F; its side chain is located in the hydrophobic interior of the enzyme (Fig. 3), far from the active site. The change from isoleucine to valine at this position (one methyl group) may slightly change local packing in the enzyme's interior.

The point mutations (G14S, A15G and V109S). Residue 14 is located in the β 3- η 1/ α A loop (residues 10–15), adjacent to the substrate binding cleft (Fig. 4a). The introduction of the serine side chain has no effect on the main chain torsion angles ($\varphi = -86^\circ$, $\psi = -171^\circ$), but it increases the local surface polarity. In addition, it provides the possibility of the formation of two additional hydrogen bonds within the loop. The β -turn hydrogen bond interaction between the main chain oxygen atom of G11 and the main chain nitrogen atom of S14 is preserved. Mutation of residue 15 introduces a third glycine residue in the β 3- η 1/ α A loop (Fig. 4a). In the parent *B. pumilus* enzymes (like in *B. subtilis* LipA), the alanine side chain at position 15 points into the solvent, forming a hydrophobic surface patch together with the side chain of Y17, at the rim of the substrate binding cleft. The absence of the methyl group in mutant L3-3 reduces local surface hydrophobicity. Residue 109 is positioned at the surface, just after 3_{10} helix η 4 (Fig. 4b). In both parent *B. pumilus* lipases L5 and L21 residue 109 is a valine, and its mutation to serine reduces the local surface hydrophobicity. In mutant L3-3, this methyl group is absent, and local surface hydrophobicity is reduced. Moreover, the serine hydroxyl group is

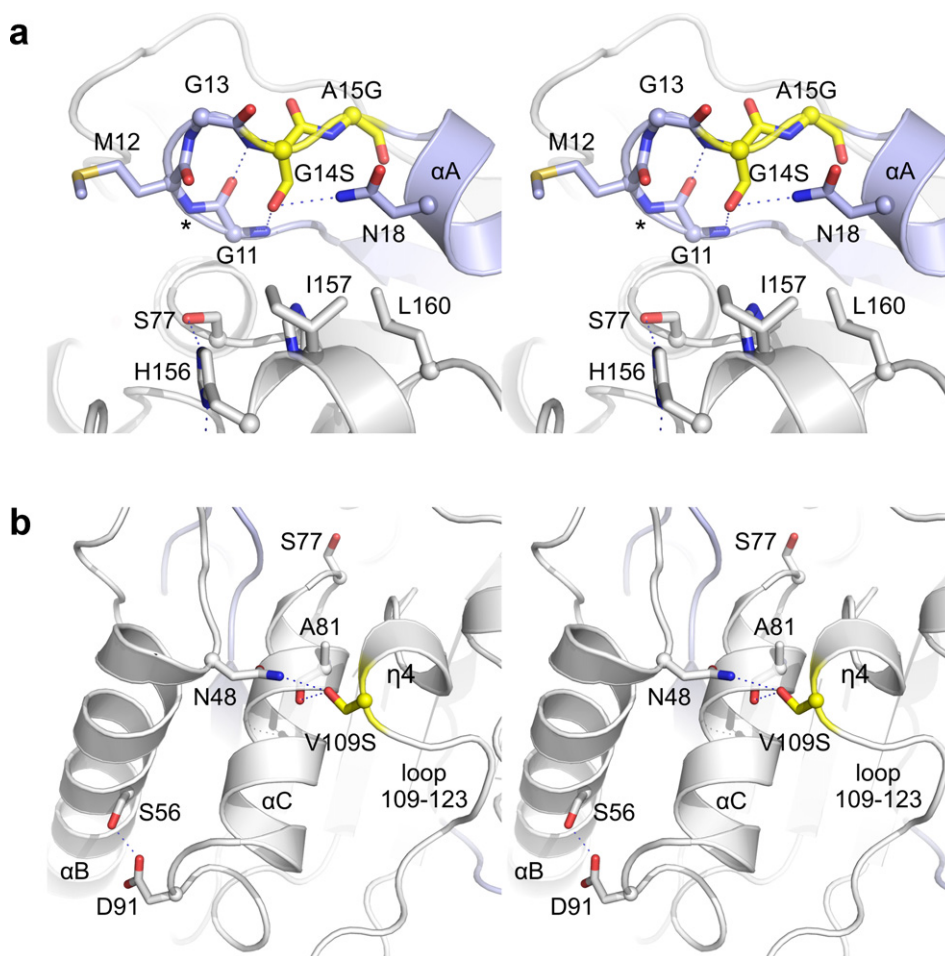


Fig. 4. Stereo figures of the L3-3 mutant homology model. Point mutations are shown with yellow carbon atoms. Hydrogen bond interactions are shown as blue dashed lines. (a) Point mutations G14S and A15G located in the β 3- η 1/ α A loop (residues 10–15) that connects strand β 1 and helix α A. The S14 O γ atom has hydrogen bonding interactions with the N δ 2 atom of N18 from helix α A and the main chain nitrogen atom of G11. The β -turn hydrogen bond interaction between G11 O and G14 N is also shown. The β 3- η 1/ α A loop is on one side of the substrate binding cleft, where the leaving group of a substrate would be bound. Some residues lining this part of the active site (I157, L160) are also shown in stick representation as well as the nucleophilic serine (S77). The main chain nitrogen atom of residue M12 that forms part of the oxyanion hole is indicated with an asterisk (*). (b) The V109S point mutation; its side chain makes direct hydrogen bonds to the N δ 2 atom of N48, the N-terminal residue of helix α B, and to the main chain oxygen of A81 (in helix α C). The long α B helix can make only one other direct hydrogen bond, between S56 and D91. (For interpretation of the references to color in figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

able to form two hydrogen bonds, similar to the equivalent threonine in *B. subtilis* lipase A. It can make one hydrogen bond to the main chain oxygen atom of residue A81 (in helix α C), and a second hydrogen bond to the N δ 2 atom of N48, the N-terminal residue of helix α B.

4. Discussion

4.1. Activity and thermostability of mutant L3-3

Mutant L3-3 was selected from the shuffling library by screening for lipase activity. Our approach did not account for differences in lipase expression levels in the library and therefore may be biased. Nevertheless, our selection strategy resulted in a mutant with significantly improved specific activity. This mutant (L3-3) shows a 6.4- and 8.2-fold increase in specific activity, respectively when compared to its parent enzymes L5 and L21. The usefulness of (mutant) lipases in industrial applications also depends on the effects of metal ions, detergents and organic solvents. For example, enzyme activity and stability in the presence of detergents is a requirement for laundry applications (Gaur et al., 2008). Furthermore, tolerance to organic solvents facilitates the use of enzymes

as biocatalysts in non-aqueous media, e.g. when it is necessary to dissolve or recover substrates or products in an organic phase, to decrease unwanted substrate or product inhibition (Hun et al., 2003), or when the product itself is an organic compound (e.g. methanol in the production of biodiesel) (Li et al., 2012). Our results indicate that for many of the compounds tested, mutant L3-3 retains a comparable or higher relative activity than the parent enzymes, and therefore has improved characteristics as a possible biocatalyst. With respect to substrate specificity, L3-3 remains a true lipase, with the highest activity observed for long chain triacylglycerol fatty acids, like the parent enzymes L5 and L21.

The significant stimulating effect of the presence of (10 mM) FeCl₂, CoCl₂ or CuCl₂ on L3-3 is remarkable, since many lipases are inhibited by these metal salts (Gaur et al., 2008; Nthangeni et al., 2001; Sharma et al., 2001). The minimal effect of the metal-chelating agent EDTA on the activity of the parent enzymes and L3-3 suggests that no metal binding sites exist, in agreement with previous studies. The strong inhibition by PMSF confirms that the enzymes under study are of the serine hydrolase class. Secondly, the tolerance of L3-3 to detergents is comparable to or slightly better than that of the parent enzymes. Notably, the higher retained activity of L3-3 in the presence of 0.1% SDS compared to the parent enzymes, indicates that it is more resistant to unfolding. Thirdly,

the higher retained activity of L3-3 for most organic solvents when compared to the parents indicates an increased tolerance to such compounds.

Surprisingly, although we screened for activity as the desired property to be increased, L3-3 also displays a remarkable increase in thermostability. Its half-life ($T_{1/2}$) at 50 °C of 38.5 min is a 9.2- and 8.8-fold improvement with respect to the parent enzymes. This is also reflected by a higher resistance to thermal inactivation: 70% of the initial activity of L3-3 is retained after a 30 min incubation at 50 °C, a 2.5- and 3.7-fold increase compared to the parent enzymes (Fig. 2). The fact that we obtained a mutant with both increased thermostability and activity indicates that it is possible to improve these properties at the same time. A similar case has been reported for *Candida antarctica* lipase B (Suen et al., 2004); therefore a 'dual' screening approach involving both thermostability and activity may be generally beneficial for the directed evolution of lipase enzymes. In addition, further improvement of thermostability and activity may be obtained by increasing the number of DNA-shuffling cycles.

4.2. Structural implications

It has been proposed that several sequence/structural features contribute to the greater stability of thermophilic proteins (Kumar et al., 2000). These features include packing (of the core structure), polar surface area, helical content/propensity, salt bridge and other hydrogen bond interactions, proline substitutions, insertions or deletions, loop stabilization and protein oligomerization. In the case of the *B. pumilus* L3-3 mutant, the basis of enhanced thermostability and activity (with respect to the parent enzymes) must lie, in one way or another, in the chimeric differences and point mutations. To study their structural effects, we constructed 3D homology models for the *B. pumilus* L5 and L21 parent lipases and mutant L3-3 (Figs. 3 and 4), based on the crystal structure of *B. subtilis* lipase A (van Pouderooyen et al., 2001). Given the high sequence identity (78%) between the *B. pumilus* lipases and the *B. subtilis* lipase A, and the nature and distribution of the about 40 differences between them, the homology models can be regarded as fairly reliable with an estimated root mean square deviation for backbone atoms of 0.6 Å (Chothia and Lesk, 1986). Even in regions where differences are concentrated (mostly in loops and 3_{10} helices), the main chain need hardly be affected because most of the differences are at the surface. In only one case (residue S14 in L3-3) the model was manually adjusted to a more favorable side chain rotamer.

Three of the six differences between mutant L3-3 and parent L5 occur in the $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ loop (residues 10–15, Fig. 4a), which forms one 'wall' of a narrow hydrophobic substrate binding cleft (Dröge et al., 2006). Both the chimeric I12M difference and A15G point mutation result in a reduced surface hydrophobicity, which may contribute to an increase in thermostability of L3-3. A similar proposal has been made for the A15S mutation in *B. subtilis* lipase A mutants 3-3A9, 4D3 and 6B (Ahmad et al., 2008; Kamal et al., 2011). The third difference, G14S, is the first reported mutation at this position for a family I.4 lipase. The introduction of the serine side chain may increase thermostability by facilitating an additional intra-loop hydrogen bond interaction with residue G11. This interaction would stabilize the conformation of the $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ loop, counteracting the flexibility-increasing effect of the introduction of a third glycine in this loop (mutation A15G). Together, the thermostability enhancing effects of mutations in the $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ loop may be attributed to a combination of reduced surface hydrophobicity and stabilization of loop conformation.

The observed enhanced activity of L3-3 on pNP-palmitate as a substrate most likely stems from the G14S and I12M mutations in the substrate binding cleft. In the complexes of *B. subtilis* lipase A with different phosphonate inhibitors (Dröge et al., 2006) (PDB

IDs: 1R4Z, 1R50), the IPG moiety of the inhibitor binds in a narrow hydrophobic groove between residues I12–G13–G14 (in the $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ loop) and H156–I157. The importance of residues in the $\beta 3$ - $\eta 1/\alpha A$ loop of *B. subtilis* lipase A has been shown previously in a loop-grafting study (Boersma et al., 2008), where enantioselectivity toward IPG esters could be inverted by replacing this loop with loops originating from other α/β -hydrolases. A superposition (not shown) of L3-3 with *B. subtilis* lipase A reveals that in L3-3 the pNP moiety of the substrate would occupy the same space as the IPG moiety in *B. subtilis* lipase A. The side chain of a serine residue at position 14 would point into the binding groove and could interact with the substrate. The increased polarity of the environment of the scissile bond may favorably affect the hydrolysis of the covalent tetrahedral reaction intermediate. This reaction intermediate is stabilized by two peptide NH groups (the oxyanion hole) formed by residues 12 and 78 (Jaeger et al., 1999). Thus, the I12M and G14S mutations may affect both substrate affinity and reaction kinetics, apparently leading to a more active enzyme. On the other hand, substrate specificity is hardly affected (Supplementary Material Fig. S8).

In contrast to the above mentioned mutations, point mutation V109S and the chimeric differences F20A and I169V, located at distances between 12 and 16 Å from the active site serine, likely will not affect the activity of L3-3, at least not through short range effects. Instead, the F20A and V109S mutations appear to increase thermostability by reducing surface hydrophobicity, or by stabilizing interactions that are absent in the parent enzymes. Like in *B. subtilis* lipase A, two hydrogen bonds can link S109 (T109 in lipase A) to N48 on helix αB and to A81 on helix αC , thereby anchoring this part of the long 109–123 loop to the core secondary structure elements. The S109–N48 hydrogen bond interaction also fixes the N-terminal end of the long αB helix (Fig. 4b), which has only one other hydrogen bond interaction (S56–D91). Likely, the stabilizing interactions due to the V109S mutation result in a more rigid enzyme structure, in agreement with the observation that the L3-3 mutant is more resistant to unfolding by SDS. Together with the removal of a solvent-exposed non-polar phenyl or methyl group of residues 20 and 109, respectively, this results in enhanced thermostability. Finally, the I169V difference may affect thermostability by slightly changing the interior hydrophobic packing of the enzyme.

5. Conclusions

To the best of our knowledge, our study describes the first application of DNA-shuffling to lipases from *B. pumilus*. From a single round of DNA-shuffling with two *B. pumilus* parent lipases, we have obtained a chimeric mutant (L3-3) with an up to 8-fold increased specific activity and a 9-fold increased half-life (at 50 °C). The increased tolerance of L3-3 to various detergents and organic solvents further enhances its application possibilities as a biocatalyst. Based on a reliable homology model, we conclude that the observed enhancement of thermostability of L3-3 is likely the consequence of (a) rigidification of enzyme structure by strengthening (hydrogen bonding) interactions between structural elements, and (b) the removal of hydrophobic patches on the enzyme surface (A15G, F20A, V109S). The same factors have been proposed to account for increased thermostability of evolved *B. subtilis* lipase A mutants (Ahmad et al., 2008; Kamal et al., 2011). The effect on enzyme activity is likely due to the fact that three of the six differences between mutant L3-3 and parent L5 (I12M, G14S, A15G) are in a loop adjacent to the substrate-binding site. These mutations may affect substrate binding and increase the reaction rate for the hydrolysis of the covalent reaction intermediate, but do not alter the substrate specificity. Although synergistic effects of mutations

may occur, an analysis of the effect of each single mutation in L3-3 would provide support for the observed beneficial effects. Our results show that it is possible to evolve variants with improved activity and thermostability with relatively few mutations, in a single evolution cycle. This opens up possibilities to further evolve *B. pumilus* lipases by increasing the number of cycles, and by using screening methods aimed at higher activity and thermostability at the same time.

Acknowledgements

The authors would like to thank MSc. Lalehan Akbulut Salar for excellent technical assistance, Dr. Alp Kibaroglu for his contribution to DNA sequencing analysis, and Prof. Dr. Tamer Yağcı, Assoc. Prof. Dr. Ayhan Çelik and Dr. Yusuf Öztürk for providing materials. Prof. Dr. Bauke W. Dijkstra is greatly acknowledged for essential discussions and valuable comments on the manuscript. This work was partly supported by the Research Fund of Gebze Institute of Technology (BAP 2008A11).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.12.016>.

References

- Acharya, P., Rajakumara, E., Sankaranarayanan, R., Rao, N.M., 2004. Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase. *Journal of Molecular Biology* 341, 1271–1281.
- Ahmad, S., Kamal, M.Z., Sankaranarayanan, R., Rao, N.M., 2008. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: *in vitro* evolution and structural insight. *Journal of Molecular Biology* 381, 324–340.
- Arnold, F.H., Volkov, A.A., 1999. Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 3, 54–59.
- Arpigny, J.L., Jaeger, K.E., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal* 343 (Pt 1), 177–183.
- Augustyniak, W., Brzezinska, A.A., Pijning, T., Wienk, H., Boelens, R., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., 2012. Biophysical characterization of mutants of *Bacillus subtilis* lipase evolved for thermostability: factors contributing to increased activity retention. *Protein Science* 21, 487–497.
- Boersma, Y.L., Pijning, T., Bosma, M.S., van der Sloot, A.M., Godinho, L.F., Dröge, M.J., Winter, R.T., van Pouderooyen, G., Dijkstra, B.W., Quax, W.J., 2008. Loop grafting of *Bacillus subtilis* lipase A: inversion of enantioselectivity. *Chemistry and Biology* 15 (8), 782–789.
- Chothia, C., Lesk, A.M., 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO Journal* 5, 823–826.
- Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., Stemmer, W.P., 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391, 288–291.
- Dröge, M.J., Boersma, Y.L., van Pouderooyen, G., Vrenken, T.E., Ruggeberg, C.J., Reetz, M.T., Dijkstra, B.W., Quax, W.J., 2006. Directed evolution of *Bacillus subtilis* lipase A by use of enantiomeric phosphonate inhibitors: crystal structures and phage display selection. *ChemBioChem* 7, 149–157.
- Eom, G.T., Song, J.K., Ahn, J.H., Seo, Y.S., Rhee, J.S., 2005. Enhancement of the efficiency of secretion of heterologous lipase in *Escherichia coli* by directed evolution of the ABC transporter system. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3468–3474.
- Gaur, R., Gupta, A., Khare, S.K., 2008. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry* 43, 1040–1046.
- Huang, Y., Cai, Y., Yang, J., Yan, Y., 2008. Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24, 445–451.
- Hun, C.J., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Basri, M., 2003. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal* 15, 147–151.
- İşsever Öztürk, S., Tuzlakoglu Öztürk, M., Akbulut, N., Kayman, Ş.S., Gümüsel, F., 2008. Identification of industrial enzyme producing local *Bacillus* isolates by molecular typing methods. In: 5th National Molecular and Diagnostic Microbiology Congress, Ankara, Türkiye.
- Jaeger, K.E., Eggert, T., 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 390–397.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology* 53, 315–351.
- Jaroszowski, L., Li, Z., Cai, X.H., Weber, C., Godzik, A., 2011. FFAS server: novel features and applications. *Nucleic Acids Research* 39, W38–W44.
- Kabsch, W., Sander, C., 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- Kamal, M.Z., Ahmad, S., Molugu, T.R., Vijayalakshmi, A., Deshmukh, M.V., Sankaranarayanan, R., Rao, N.M., 2011. *In vitro* evolved non-aggregating and thermostable lipase: structural and thermodynamic investigation. *Journal of Molecular Biology* 413, 726–741.
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J., 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4, 363–371.
- Kumar, S., Tsai, C., Nussinov, R., 2000. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering* 13, 179–191.
- Li, J., Chen, S., Li, L., Yu, Y., Fei, Z., Qiao, D., Cao, Y., 2012. Approach of directed evolution of microbial lipases and biodiesel catalysis. *African Journal of Microbiology Research* 6 (3), 637–642.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., Jaeger, K.E., 2000. Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chemistry and Biology* 7, 709–718.
- Lorimer, I.A., Pastan, I., 1995. Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNase I in the presence of Mn²⁺. *Nucleic Acids Research* 23, 3067–3068.
- Nthangeni, M.B., Patterson, H., van Tonder, A., Vergeer, W.P., Lithauer, D., 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: A comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 705–712.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29 (Pt 2), 119–131.
- Reetz, M.T., 2004. Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5716–5722.
- Schmidt-Dannert, C., Arnold, F.H., 1999. Directed evolution of industrial enzymes. *Trends in Biotechnology* 17, 135–136.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19, 627–662.
- Sneath, P.A., 1984. Section 13: endospore-forming Gram-positive rods cocci. Section 16: identification of unknown bacteria. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1104–1986.
- Stemmer, W.P., 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10747–10751.
- Suen, W.C., Zhang, N., Xiao, L., Madison, V., Zaks, A., 2004. Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Engineering, Design and Selection* 17, 133–140.
- Tuzlakoglu, M., Balci, H., Battal, M., Gökmen, F., İşsever Öztürk, S., Artunkal, S., Gümüsel, F., 2003. Studies on the screening and identification of industrial enzyme producing local bacterial isolates. In: 13th Biotechnology Congress, Çanakkale, Türkiye.
- van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., 2001. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *Journal of Molecular Biology* 309, 215–226.
- Winkler, U.K., Stuckmann, M., 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 138, 663–670.
- Zhao, H., Arnold, F.H., 1997. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Research* 25, 1307–1308.