

**AKTİNOMİSET KAYNAKLI LİPAZ GENİNİN
KLONLANMASI, DİZİLENMESİ VE
EKSPRESYONU**

Gizem ARIK
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Temmuz, 2012

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1005F114**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gizem ARIK'ın “**Aktinomiset Kaynaklı Lipazın Klonlanması, Dizilenmesi ve Ekspresyonu**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 18.07.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Doç. Dr. NALAN YILMAZ	
	SARIÖZLÜ	
Üye	: Prof. Dr. MERİH KIVANÇ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AKTİNOMİSET KAYNAKLI LİPAZ GENİNİN KLONLANMASI, DİZİLENMESİ VE EKSPRESYONU

Gizem ARIK

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ
2012, 53 sayfa

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda çeşitli toprak örneklerinden izole edilmiş 250 aktinomiset izolatu kullanılmıştır. Canlandırılabilen 149 izolatin kültürel ortamda derin difüzyon yöntemi ile lipaz aktiviteleri incelenmiş ve izolatların belirli derecelerde lipaz aktivitesi gösterdiği görülmüştür. Bunlardan 53 tanesi (% 36) 1 cm ve daha az, 92 tanesi (% 62) 2 cm ve daha az, 4 tanesi (% 2) ise 2 cm'den daha fazla derinlik oluşturmuştur. En yüksek lipaz aktivitesini gösteren izolatin 16S rRNA gen bölgesine dayalı moleküler identifikasyonu yapılmıştır. NCBI veri tabanında BLAST programı kullanılarak yapılan analiz sonucu izolatin veritabanındaki erişim numarası EU283368.1 olan 'uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene' e % 97 oranında benzediği görülmüştür. Bu izolatin genomik DNA'sının rastgele parçalanarak klonlanması sonucu 16 adet klon elde edilmiştir ve izolatin genomik DNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Elde edilen klonların kültürel ortamda lipaz aktiviteleri incelenmiş, fakat klonların lipaz aktivitesi göstermediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Aktinomiset, Lipaz, Klonlama, Genomik DNA Kütüphanesi

ABSTRACT**Master of Science Thesis****CLONING, SEQUENCING AND EXPRESSION OF ACTINOMYCETES
LIPASE GENE****Gizem ARIK****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Programme****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ
2012, 53 pages**

In this study there are 250 actinomycet isolates which were isolated from different soil samples were used. There were 149 isolates' lipase activities were analyzed which were able to be animated within 250 samples by using deep diffusion method. It was observed that the isolates show lipase activity. 53 of them (36 %) 1 cm and less, 92 of them (62 %) 2 cm and less, 4 of them (2 %) more than 2 cm depth produced too. The isolate's which showed the highest lipase activity molecular identification has been made which based on 16S rRNA gene. As a result of the study has been made on the NCBI database by using BLAST program, it was observed that, isolate showed 97% similarity 'uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene' which's access number on the database is EU283368.1. There are 16 clones derived from this isolate's DNA by breaking down randomly. Genomic DNA library of the isolate is constructed. The derived clones's lipase activities analyzed in the cultural medium, however the clones have not showed lipase activity.

Keywords: Actinomycete, Lipase, Cloning, Genomic DNA Library

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecince desteğini ve güler yüzlülüğünü esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ'ye;

Çalışmanın projelendirilmesinde yardımcı olan, bilimsel katkılar sağlayan Arş. Gör. Dr. Rasime DEMİREL'e ve çalışma süresince karşılaştığım sorunlarda yardımcı olan hocam Yard. Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ'a;

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm çalışmam süresince her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan canım aileme gösterdikleri sabır ve anlayıştan ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
 1. GİRİŞ	 1
1.1. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	2
1.2. Aktinomisetlerin Biyoteknolojik Önemi	3
1.3. Lipaz Enzimi	3
1.3.1. Lipazın Yapısal Özellikleri ve Mekanizması.....	5
1.3.2. Lipazın Kaynakları.	5
1.3.2.1. Fungal Lipazlar.....	6
1.3.2.2. Bakteriyel Lipazlar	6
1.4. Genomik DNA Kütüphaneleri.....	9
1.4.1. Klonlama Vektörleri.....	9
1.5. Lipaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları.....	11
1.5.1. Deterjan Endüstrisindeki Kullanımı	12
1.5.2. Yağ Endüstrisindeki Kullanımı	13
1.5.3. Tekstil Alanındaki Kullanımı.....	14
1.5.4. Biyodizel Üretimindeki Kullanımı.....	14
1.5.5. Diagnostik Araç Olarak Kullanımı	15
1.5.6. Diğer Alanlardaki Kullanımı.....	15
 2. MATERYAL ve METOT	 17
2.1. Materyal.....	17
2.1.1. Çalışılan Aktinomiset İzolatları	17
2.1.2. Klonlama Konakçısı EPI300™-T1®	17
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kontrol DNA.....	17
2.1.4. CopyControl pCC2FOS™ Klonlama Vektörü	18

2.1.5. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	18
2.1.5.1. Lipaz Besiyeri 1.....	18
2.1.5.2. Lipaz Besiyeri 2.....	19
2.1.5.3. LB (Luria-Bertani) Broth (Neogen)	19
2.1.5.4. LB (Luria-Bertani) Agar	
Kloramfenikol Besiyeri (Fluka)	20
2.1.5.5. LB Broth MgSO ₄ -Maltoz Besiyeri (Neogen)	20
2.1.5.6. Nutrient Agar (Oxoid).....	20
2.1.6. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	20
2.1.7. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	22
2.2. Metot	23
2.2.1. Lipaz Aktivitesi Gösteren Aktinomiset İzolatlarının Seçimi	23
2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu.....	23
2.2.3. Lipaz Yönünden Etkin Genlerin Belirlenmesi Amacı İle	
Klonlanma.....	24
2.2.3.1. Genomik DNA'nın Parçalanması.....	24
2.2.3.2. İnsert DNA'nın 5' Ucunun Tamiri	24
2.2.3.3. 5' Ucu Tamir Edilen DNA'nın	
Büyüklik Seçimi	25
2.2.3.4. İnsert DNA'nın Agaroza Jelden Geri Kazanımı	25
2.2.3.5. Ligasyon Reaksiyonu	26
2.2.3.6. Klonların Paketlenmesi	27
2.2.3.7. Paketlenmiş Klonların Dilüsyonu	27
2.2.4. Klonların Otoindüksiyonu.....	28
2.2.5. Klonların Kültürel Ortamda Lipolitik	
Aktivitelerinin İncelenmesi.....	28
2.2.6. Plazmid İzolasyonu	28
2.2.7. Yüksek Lipolitik Aktiviteye Sahip Aktinomisetin	
16S rRNA Bölgelerine Dayalı Moleküler İdentifikasyonu	30
2.2.7.1. PCR Ürünlerinin Agaroza Jelden Saflaştırılması	30
2.2.7.2. Dizi Analizi Polimeraz Zincir Reaksiyonu	31

2.2.7.3. Dizi Analizi PCR Ürünlerinin	
Manyetik Boncukla Saflaştırılması	32
3. BULGULAR	34
3.1. Aktinomiset İzolatlarının Kültürel	
Ortamdaki Lipaz Aktiviteleri	34
3.2. Genomik DNA İzolasyonu,	
Parçalanması ve Büyüklük Seçimi	37
3.3. DNA'nın Ligasyonu ve Transfeksiyonu	39
3.4. Klonların Kültürel Ortamda Lipolitik Aktivitelerinin İncelenmesi	40
3.5. Plazmid İzolasyonu.....	41
3.6. Yüksek Lipolitik Aktiviteye Sahip Aktinomisetin	
16S rRNA Bölgelerine Dayalı Moleküler İdentifikasyonu.....	41
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	43
5. KAYNAKLAR	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Lipazın hidrolitik ve sentetik reaksiyonları	4
1.2. Lipaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	4
2.1. Vektörü kesen bazı restriksiyon enzimlerinin kesim noktaları, replikasyon orjinleri (ori bölgeleri), kloramfenikol antibiyotikine karşı direnç geni (ChlR) bölgeleri	18
3.1. A) 46 ve B) 47 numaralı izolatların makroskobik görüntüleri.....	37
3.2. A) 46 ve B) 47 numaralı izolatların Lipaz 1 besiyerinde oluşturdukları şeffaf derinlik.....	37
3.3. Genomik DNA'nın % 1'lik agaroz jelde UV altında görüntüsü M; Lambda DNA/HindIII (Fermentas).....	38
3.4. Genomik DNA'nın parçalanması (M; Lambda DNA/HindIII (Fermentas), F; Fosmid Kontrol DNA.....	38
3.5. Örneklerin yüklendiği kısmı kesilen jelin görüntüsü	39
3.6. 37°C'de bir gecelik inkübasyon sonucunda 12,5 µg/ml kloramfenikol içeren LB petrisinde görülen koloniler	40
3.7. Negatif kontrol ve tek bir klondan elde edilen agar bloğu içeren besiyerinin inkübasyon sonunda görüntüsü	40
3.8. Elde edilen bazı klonların plazmid izolasyonu sonuçları. M: Lambda DNA/HindIII (Fermentas) V: Boş vektör, 5: 5 numaralı klon, 15: 15 numaralı klon.....	41
3.9. 9F ve 1541R primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünü.....	42
3.10. Elde edilen dizi bilgisine en yakın dört dizi	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. Elde edilen izolatların lipolitik aktiviteleri sonucu oluşturdıkları şeffaf derinlik (cm).....	34
--	----

GİRİŞ

Biyosfer tıp, mühendislik ve zirai açıdan oldukça önemli olan mikroorganizmaları içermektedir. Bu mikroorganizmaların genetik ve biyolojik çeşitliliği ise bilim adamlarının öncelikli ilgi alanını oluşturmaktadır. Mikrobiyal toplulukların genetiği ve biyoçeşitliliği üzerine yapılan çalışmalarda biyoteknolojinin etkin bir yeri bulunmaktadır. Biyoteknoloji alanındaki en büyük talep ise yeni gen, enzim ve bileşenlerin keşfi üzerinedir. Günümüze kadar yeni moleküllerin keşfi üzerine oldukça fazla çalışma gerçekleştirilmiştir.

Enzimler endüstriyel uygulamalar için çok önemli bir yer tutmaktadır. Biyokatalist olarak katalizledikleri reaksiyonların çevre dostu olmasını sağladıkları gibi yan ürün oluşumunu da kullanılan diğer kimyasallara göre en aza indirmektedirler. Mikrobiyal enzimler de seri üretim kolaylığı ve uygulama alanının çokluğu nedeniyle biyoteknolojik olarak değerli bir enzim grubudur. Mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar uzun triaçilgliserol zincirlerinin hidrolizini katalizleyen ve biyoteknolojik önemi olan bir enzimdir.

Lipazlar yüksek sıcaklık ve pH aralıklarında ve çeşitli substratlarda aktif olmaları nedeniyle geleceğin biyokatalistleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle yeni lipazların keşfi ve bilinen lipazların da kullanımını daha etkin hale getirme çalışmaları büyük önem kazanmıştır (Gupta, 2004). Bu konu ile ilgili bir çalışma Henne ve ark. (2000) tarafından yapılmıştır. Farklı toprak örneklerinden elde ettikleri DNA klon kütüphaneleri lipaz aktivitesi yönünden araştırılmıştır. Pozitif klonlardan elde edilen diziler veritabanında karşılaştırılmış ve sonuç olarak dört yeni lipolitik enzim literatüre katılmıştır.

Aktinomisetler bakterilerden sonra çevrede en fazla sayıda bulunan gram pozitif prokaryotik canlılardır. Özellikle antibiyotik üretme yetenekleri ile tanınmakla beraber diğer intra ve ekstrasellüler metabolitleri ile de endüstri ve biyoteknolojide önemli yerler edinmişlerdir. Triaçilgliserollerin hidrolizini katalizyen lipaz enzimini üretme yeteneği de önemli kullanım alanlarından birisidir. Lipazlar keşfedildikleri tarihten bu yana deterjan, gıda ve farmasötik sanayi gibi başlıca endüstriyel kullanım alanlarına sahiptir.

Bu çalışma, laboratuvarımızda gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda farklı toprak örneklerinden izole edilmiş aktinomiset izolatlarının kültürel ortamda lipaz aktivitelerinin taranmasını ve en yüksek lipaz aktivitesine sahip izolatın genomik DNA kütüphanesini oluşturulmasını içermektedir. Oluşturulan genomik DNA kütüphanesindeki lipolitik aktiviteye sahip klonlar sayesinde izolatın sahip olduğu lipaz enzim bölgesinin klonlanması gerçekleştirilmiş olacaktır. Ayrıca oluşturulan klon kütüphanesi sayesinde izolatın diğer enzim aktiviteleri ya da antibiyotik üretimi gibi farklı özellikleri ve bunları sağlayan genleri de daha sonraki çalışmalarda incelenebilecektir. Ayrıca en yüksek lipaz aktivitesi gösteren izolatın 16S rRNA gen bölgesine göre moleküler identifikasyonunun yapılması da çalışmanın diğer bir amacıdır.

1.1. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Aktinomisetler filamentli, Gram pozitif çok geniş bir bakteri grubudur. Büyümenin ve dallanmanın sonucunda dallanmış bir filament ağı oluşur ki buna da misel adı verilir. Misel oluşumu iki farklı şekilde meydana gelebilir. Gelişip çoğaldığı ortamın üzerinde oluşan miseller havasal misellerdir. Gelişip çoğaldığı ortamın içerisinde oluşturulan misel tipi ise substrat miselidir (Waksman, 1959).

Birçok aktinomiset spor oluşturur ve bu mekanizmadaki çeşitlilik sınıflandırma açısından önemlidir. Bilinen tüm bakterilerden daha yüksek GC (Guanin-Sitozin) oranına sahiptirler. DNA baz kompozisyonları % 63-78 oranında GC içermektedir (Madigan ve Martinko, 2009).

Aktinomiset türleri toprak, kompostlar, tatlı su depoları, besin maddeleri ve atmosfer gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunabilirler. Asit topraklardan ve turbalardan çok bazik ve nötral topraklarda ve turbalarda yayılış göstermektedirler. *Micromonospora* türleri göl tabanlarında daha çok bulunurken, *Streptomyces* türleri ise toprakta daha yaygındır. Aktinomisetler toprağın mikrobiyal popülasyonunun yaklaşık % 20-60'ını oluştururlar. Topraktaki sayıları toprak tipine, organik madde miktarına ve pH değerine bağlı olarak değişmektedir. Bir gram toprakta 10^5 - 10^7 oranında bulundukları bilinmektedir. Toprakta en fazla bulunan canlı gruplarından (Boyd, 1988).

Büyük bölümü aerob ve heterotroftur. Sıcaklık istekleri ise 25-35°C arasındadır. Termofil türlerde ise sıcaklık isteği 50°C'nin üzerine çıkabilmektedir. Optimum nem istekleri su tutma kapasitesinin % 55-60'ı kadardır (Çengel, 2006).

Aktinomiset hifleri ve spor çapları genelde 1.0 mikron boyutundadır. Birçok aktinomiset gerçek bir havasal misel oluşturmaz. Bazı aktinomisetler asit-fast'tir. Morfoloji ve fizyoloji bakımından *Mycobacteria*'ya benzerler. Bu durum özellikle *Nocardia* için geçerlidir. Aktinomiset hücreleri kitin ve selüloz içermez. Dallı doymuş yağ asitleri *Streptomyces*'in çok iyi tanımlanmış türlerinde ve birçok gram pozitif bakterinin lipidlerinde gösterilmiştir.

Başlangıçta aktinomisetleri inceleyenler onları bakteriyel formlar olarak tanımlamıştır. Botanikçiler ise funguslara yakın olduklarına inanmaktaydı. Fakat son bilgiler doğrultusunda bu grubun Bacteria domainine ait olduğu doğrulanmıştır (Waksman, 1989).

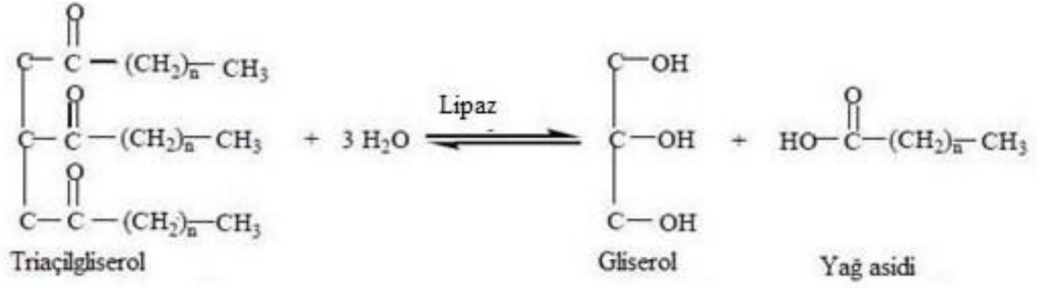
1.2. Aktinomisetlerin Biyoteknolojik Önemi

Aktinomisetler özellikle antibiyotik üretme yetenekleri ile bilinen bir bakteri grubudur. Bunun yanı sıra ürettikleri enzimler, enzim inhibitörleri, çeşitli vitaminler ve benzeri biyoaktif moleküller sayesinde biyoteknolojik öneme sahiptirler. Sahip oldukları enzimler sayesinde suyun ve toprağın biyolojik olarak temizlenmesinde kullanılmaktadırlar (Polti ve ark., 2009).

Aktinomisetlerin biyoteknolojik olarak geniş kullanım alanına sahip enzimlerinden biri lipaz enzimidir.

1.3. Lipaz Enzimi

Lipazlar uzun triaçilgliserol zincirlerinin tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 1.1). Hidroliz sonucu sulu faz ve organik faz arasında diaçilgliserol, monoaçilgliserol, gliserol ve yağ asitleri oluşturmaktadır (Salleh ve ark., 2006).



Şekil 1.1. Lipazın hidrolitik ve sentetik reaksiyonu (Salleh ve ark., 2006)

Esterazların tersine lipazlar sadece yağ-su ara yüzeyine adsorbe olduklarında aktif hale geçerler. Çözünebilir substrat içeren solüsyonlarda çok az aktivite göstermeleri de esterazlardan farklıdır. Lipaz triolein ve tripalmitin gibi uzun yağ asitlerinin ve gliserinin esterlerini kıran serin hidrolazlarıdır (Sharma ve ark., 2001).

Lipazlar hidrolizin yanı sıra esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını da katalizlemektedirler (Şekil 1.2).

Hidroliz	
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \text{H}_2\text{O} $	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{OH} \end{array} + \text{R}_2 - \text{OH} $
Ester sentezi	
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{OH} \end{array} + \text{R}_2 - \text{OH} $	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \text{H}_2\text{O} $
Transesterifikasyon	
Alkoliz	
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \text{R}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH} $	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_3 \end{array} + \text{R}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH} $
İnteresterifikasyon	
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_3 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_4 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_4 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_3 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} $
Asidoliz	
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_3 - \text{C} - \text{OH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_3 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{OH} \end{array} $

Şekil 1.2. Lipaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar (Salleh ve ark., 2006)

1.3.1. Lipazın Yapısal Özellikleri ve Mekanizması

Lipazların primer dizilerindeki amino asit sayıları farklı olsa da, tüm lipazların ortak özelliği aktif bölgelerinde serin, aspartat, glutamat ve histidin amino asitleri (katalitik triad) bulundurmalarıdır. Tüm lipazların üç boyutlu yapısında ortak bir motif bulunur. Birbirine paralel sekiz β -sheet ve bunları çevreleyen α -helikslerden oluşur (Schmid ve Verger, 1998). Katalitik triadın ve birkaç oksianyon kalıntılarının aktif merkezini oluşturduğu düşünülmektedir. Aktif merkezi bloklayan helikal segment, lipazı proteaz ve esteraz gibi diğer hidrolazlardan ayıran ara yüzey aktivasyonunun karakteristik özelliklerinden sorumludur. Lipazın substrata bağlanmadan önceki ve bağlandıktan sonraki yapısı X ray kristalografi ile incelenmiş ve enzimin biyokimyasal transformasyon reaksiyonlarında yer almadan önce aktif hale geldiği görülmüştür. Su/yağ ara yüzeyi olmadığında enzimin bir bölümü aktif bölgeyi kapatır ve enzim inaktif hale geçmektedir. Bifazik su/yağ sisteminin ara yüzeyi ile temas haline geçtiğinde kısa α heliks (kapak) tekrar katlanarak enzimin aktivasyonunu sağlamaktadır. İlk basamakta serin amino asitinden hidrojen iyonları ayrışır ve aktif hale geçer. Yani substrat olmadığında kapak kapanır ve enzim inaktif hale geçmektedir. Substrat varlığında su/yağ ara yüzeyinde kapak açılır ve enzim aktif hale gelir. (Sharma ve ark., 2001; Reis ve ark., 2009).

1.3.2. Lipaz Kaynakları

Lipaz enzimi tüm organizmalar için gerekli bir enzim olduğundan bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Mikroorganizmalarda ise bakteri, küf ve mayalarda bulunmaktadır.

Bitkilerde lipolitik enzimler yaygın olmasına rağmen, mikrobiyal ve memeli lipazlarıyla karşılaştırıldığında bitki lipazlarıyla ilgili bilgiler kısıtlıdır. Birçoğu membrana bağlı halde bulunmaktadır.

Memelilerde ise üç grup lipolitik enzim ayırt edilir: Bazı özel organlar tarafından sindirim sistemine salınan lipazlar, doku lipazları ve süt lipazları.

Memelilerin beyin, kalp ve böbrek gibi birçok organında lipaz bulunmaktadır (Salleh ve ark., 2006).

Mikrobiyal lipazlar stabilite, seçicilik ve geniş substrat spektrumu gibi özelliklerinden ötürü biyoteknolojik uygulamalar için önem taşımaktadır. Ekstraselüler bir enzim olması nedeniyle yüksek miktarlarda üretilmektedir. Bakteri, fungi ve aktinomisetler ekstraselüler lipaz üretici mikroorganizmalardır (Treichel ve ark., 2010). Biyoteknolojik önemleri nedeniyle birçok mikrobiyal lipaz geni klonlanmış ve ticari olarak kullanılmıştır (Dannert, 1999).

1.3.2.1. Fungal Lipazlar

Fungal lipazlar stabiliteleri, selektiviteleri ve geniş substrat spesifitesine sahip olmaları özellikleri ile endüstride önemli bir yer tutmaktadırlar.

Lipaz üreticisi olduğu bilinen başlıca fungi cinsleri arasında *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Candida*, ve *Penicillium* sayılabilir. Termofilik *Mucor pusillus*, *Rhizopus homothallicus* ve *Aspergillus terreus* türleri termostabil ekstraselüler lipaz üreticisi türler olarak bilinmektedir. Yüksek alkali ve yüksek sıcaklık koşullarında stabil olan lipaz enzimi ender bulunmaktadır. *Mucor* sp.'nin ürettiği ekstraselüler lipaz enzimi alkalofilik, termostabil ve indüklenebilir bir enzim olması nedeniyle önemli bir enzimdir.

Candida rugosa lipazları izoform çeşitliliği nedeniyle yüksek biyoteknolojik potansiyele sahiptir. *Yarrowia lipolytica*'dan elde edilen LIP2 lipazı ise düşük pH değerlerinde yüksek aktivite göstermesi nedeniyle önemli bir enzimdir (Singh ve ark., 2012).

1.3.2.2. Bakteriyel Lipazlar

Bakteriyel lipolitik enzimler 8 familyaya ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma korunmuş dizi motiflerine ve enzimlerin biyolojik özelliklerine göre yapılmıştır. Gerçek lipazlar adı verilen familya I üyeleri; *Pseudomonas*, *Staphylococcus* ve

Bacillus lipazlarıdır. Familya II'de *Streptomyces*, *Aeromonas* ve *Salmonella* esterazları yer almaktadır. *Streptomyces* lipazları familya III' te bulunur ve *Streptomyces* esterazlarının aksine ekstraselüler enzimlerdir. Familya IV memeli lipazlarıyla benzerlik gösteren lipazlardan oluşurken, familya V üyeleri mezofilik bakteri lipazlarından oluşmaktadır. Familya VI'da küçük esterazlar bulunur ve aktif olan enzimler dimeriktir. Amino asit dizileri ökaryotik asetil kolin esterazlarla homoloji gösteren esterazlar familya VII üyeleridir. Familya VIII üyeleri ise β -laktamazlar ile benzerlik göstermektedir (Sangeetha, 2011).

Bakteriyel lipazlar ilk olarak 1901 yılında *Serratia marcescens* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da tespit edilmiştir. Bu tarihten beri sürekli olarak farklı bakteri türlerinin lipazları çalışılmaktadır. Özellikle *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Bacillus pumilus*, *B. thermocatenulatus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. halodurans* gibi türlerin lipazları çalışılmıştır. Bu türlerin yanı sıra *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Arthrobacter*, *Chromobacterium*, *Achromobacterium* türleri de çok çalışılan bakteri türleri arasındadır (Sangeetha, 2011).

Bakteriyel lipazlar genellikle nötral ya da alkalik pH'larda optimum çalışmaktadır. *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipazı ise pH 4.8'de optimum çalıştığı için bir istisna olarak kabul edilebilir (Sangeetha, 2011).

Aktinomisetlerden *Streptomyces* türleri çok çalışılan türlerdendir. Cardenas ve ark. (2001) çeşitli toprak örneklerinden izole ettikleri 526 aktinomisetin lipaz aktivitesini incelemiştir. *Streptomyces* cinsi mikroorganizmalar tarafından üretilen lipazlar doğal olmayan substratlar kullanılarak birkaç reaksiyonda test edilmiştir. Sonuçta *Candida rugosa*'dan elde edilen ticari lipazlardan daha iyi aktivite gösteren üç lipaz elde edilmiştir. *Streptomyces halstedii*'den elde edilen lipazın sekonder alkollerin resolüsyonunda iyi aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Sommer ve ark. (1997) tarafından *Streptomyces cinnameus* Tü89 üretilen 50 kDa molekül ağırlığındaki lipazı kodlayan *lipA* geninin *Streptomyces lividans* TK23'e klonlanması gerçekleştirilmiştir. Vektör olarak pIJ702 kullanılmıştır. İki pozitif klon tanımlanmış ve her iki klonun da 5,2 kb insert (*lipA*) taşıdığı belirlenmiştir. *lipA* sinyal peptidi 30 amino asit uzunluğundadır.

Olgun lipaz dizisi ise 254 amino asit uzunluğundadır ve altı sistein kalıntısı taşımaktadır. *lipA* geni *lacZ* promotorunun kontrolü altında *E.coli*'de de ekspres edilmiştir.

Zhang ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada ise *Streptomyces fradiae* var. k11'den yeni bir lipaz enzimi, *lipS221*, klonlanmıştır. 930 baz çiftlik dizi 309 amino asit kodlamaktadır ve molekül ağırlığı 28,5 kDa ağırlığındadır. *lipS221*, *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin putativ lipazı ile % 82 benzerlik göstermektedir. Lipaz geni *E.coli* BL21 (DE3)'de ekspres edilmiştir. Fakat lipaz aktivitesi oldukça düşüktür ve SDS-PAGE jelinde kayda değer bir bant gözlenmemiştir. Genin *P.pastoris*'te ekspresyonu daha başarılıdır. Enzim en yüksek aktivitesini 55°C ve pH 9,8'de göstermektedir. Lipazın alkali ve nötral proteazlara karşı stabil olduğu görülmüştür.

Vujaklija ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada *Streptomyces rimosus*'tan ekstraselüler lipaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Klonlanan DNA, 804 baz çiftlik açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir. Bu bölge 268 amino asit kodlar ve dizinin amino ucunda olgun proteinde olmayan 34 amino asit kalıntısına sahiptir. Bu lipaz veritabanındaki diğer lipazlarla dizi benzerliği göstermemiştir. Fakat iki putativ protein, *Streptomyces coelicolor* A3(2) ile % 66 ve % 33 benzerlik göstermiştir. Bu çalışmada *S. rimosus*'tan elde edilen yeni lipaz GDS(L)-benzeri bir konsensus motifi içermektedir. Bu da daha önceden *Streptomyces* cinsinde bilinmeyen, lipolitik enzim ailesi II'ye dâhildir. Lipaz geninin, yüksek kopya sayılı vektör taşıyan lipaz negatif *S. rimosus*'da ekspresyonu yapılmıştır. Sonuçta orijinal strainden 22 kat daha fazla lipaz aktivitesi gösterdiği görülmüştür.

Cote ve Shareck (2008a) tarafından *Streptomyces coelicolor* A3(2) lipazının klonlanması, saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. *S. rimosus*'un iki putativ hidrolazının *S. coelicolor* A3(2) ile dizi benzerliği gösterdiği bilinmektedir. Bu iki enzimin karakterizasyonu çalışmalarında SCO1725 (SCI11.14c) enziminin 7,5-9 pH aralığında, SCO7513 (SC25F8.05) enziminin ise daha alkali pH'da (8,5-10) aktif olduğu görülmüştür. İlk enzimin sıcaklık aralığı 20-30°C iken, ikinci enzim ise en yüksek aktiviteyi 45-55°C arasında göstermiştir. Karakterizasyonu yapılan enzimlerin klonlama

alışmalarında vektör olarak pIAF933 kullanılmış ve konak olarak *S. lividans* seçilmiştir. Enzimin konakta yüksek derecede ekspres edilmesiyle enzimin saflaştırılması ve ileri karakterizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

1.4. Genomik DNA Kütüphaneleri

Genomik DNA kütüphaneleri bir genomdaki her DNA dizisinden bir kopya içerdiği düşünölen klonlar toplamıdır. Farklı yöntemlerle oluşturulabilirler. İlk olarak DNA bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve kesilen parçalar klonlanır. Bu teknikte bazı dezavantajlar vardır. Örneğın, kütüphane oluşturmak için kullanılan enzimin ilgilenilen gen içinde tanıma bölgeleri bulunabilir. Bu durumda gen iki ya da daha fazla parçaya ayrılacak ve ayrı ayrı klonlanacaktır. Böyle bir durumda klonlarda ilgilenilen genin aktivitesini görmek mümkün olmayabilir. Ayrıca bazı genomik DNA'ların restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu oluşın parçalar çok küçüktür. Bu da çok fazla klonun taranması yani iş yükü ve maliyet demektir.

Bu nedenle az sayıda klon içeren ve genlerin olabildiğince tek bir klona yerleştiğı bir kütüphane için genomik DNA *Sau3A* ya da *MboI* gibi 4 baz çifti tanıma bölgesine sahip restriksiyon enzimleri ile kesilir. Bu şekilde nispeten daha uzun DNA fragmentleri oluşturulmuş olur. Ayrıca genomik DNA'yı pipetleme ya da hidrodinamik olarak parçalamak kullanılan yöntemler arasındadır (Joneja ve Huang, 2009). Elde edilen DNA fragmentleri uygun vektör seçilerek klonlanır (Sözen ve ark., 2007).

1.4.1. Klonlama Vektörleri

Restriksiyon enzimleriyle ya da rastgele parçalama sonucu oluşturulan DNA fragmentlerinin konak hücreye girebilmesi için, konakta bağımsız oğalabilecek başka bir DNA molekülüne eklenmesi gerekir. Seçilen klonlama vektörünün bakteriden izolasyonu kolay olması için küçük olmalıdır. Replikasyon orjini sayesinde bakteri içinde oğalabilmelidir. Vektör DNA'sında birçok enzimin tek bir tanıma bölgesi bulunmalıdır. Bu şekilde aynı enzim ile kesilen gen parçası vektöre eklenebilmektedir. Ayrıca vektör DNA'sı içeren ve içermeyen

hücreleri ayırt etmek için konak hücrede bulunmayan seçici belirteç bir gene (antibiyotik direnç geni gibi) sahip olmalıdır (Sözen ve ark., 2007).

Klonlanan DNA büyüklüğüne ve amaca uygun birçok klonlama vektörü bulunmaktadır.

Plazmitler

Plazmitler bakteri içinde kendilerini konak hücreden bağımsız olarak çoğaltabilen çift zincirli ve halkasal DNA molekülleridir. Bakterilerde doğal olarak bulunan ve bakteriye genom dışı özellikler kazandıran bu DNA molekülleri klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere doğal plazmitlerden türetilerek klonlama çalışmalarında kullanılmaktadır. En çok kullanılan plazmitler pBR322 ve pUC vektörleridir (Sözen ve ark., 2007).

Viral Vektörler

Plazmit vektörler 10 kb'den daha büyük DNA parçalarının klonlanmasında etkili olamadığından viral vektörler geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan vektör ise bakteriyofaj lambda vektörüdür. Lambda genomu doğrusal olmasına rağmen *cos* bölgesi (yapışkan uç) adı verilen genomun iki ucundaki tek kollu uçlar tamamlayıcı diziler taşır ve halkasal yapı oluşmasını sağlamaktadır. Böylece plazmit ile aynı şekilde kullanılabilir. Kullanılan viral vektörlere örnek olarak M13 bakteriyofajı verilebilir (Sözen ve ark., 2007).

Kozmid Vektörler

Lambda fajı ve plazmit DNA parçalarından oluşturulmuştur. İçerdikleri *cos* bölgeleri sayesinde DNA faj içine paketlenir. 35-50 kb büyüklüğünde DNA parçalarının klonlamasını sağlayabilmektedir. Bu da tüm genomu temsil edecek klon sayısını azaltma imkanı sunmaktadır (Madigan, Martinko, 2010).

Fosmid Vektörler

Fosmid vektörler ise *E.coli*'nin F-faktör plazmitinin tek kopyasından türetilmiştir. Kozmid boyutta (yaklaşık 40 kb) DNA fragmentlerinin klonlanmasında ve kararlı kütüphaneler oluşturulmasında etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Anonim, 2003).

BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) Vektörleri

Özellikle ökaryotik genomların analizini kolaylaştırmak amacıyla daha büyük DNA fragmentlerin klonlanmasını sağlayan BAC vektörleri geliştirilmiştir. Bu vektörler fosmid vektörler gibi *E.coli* F-faktör plazmiti temel alınarak oluşturulmuştur. 100-300 kb büyüklüğündeki DNA fragmentlerin klonlanmasını gerçekleştirebilirler (Madigan, Martinko, 2010).

YAC (Yeast Artificial Chromosomes) Vektörleri

Bu vektörler maya içerisinde normal kromozomlar gibi replike olabilmektedir. Bunun için replikasyon orjinine, kromozom uçlarında DNA replikasyonunun gerçekleşebilmesi için telomerlere ve sentromere sahip olmaları gerekmektedir. 200-800 kb büyüklüğündeki DNA fragmentlerin klonlanmasını gerçekleştirebilirler.

1.5. Lipaz Enziminin Endüstriyel Kullanım Alanları

Lipazlar uzun triaçilgliserol zincirlerinin hidrolizini gerçekleştirmelerinin yanı sıra esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını da katalizledikleri için biyoteknolojik proseslerde kullanım potansiyeline sahiptirler.

Endüstriyel uygulamalarda lipazın kullanımında en önemli noktalardan biri enzimin substrata spesifikliğidir. Lipazın substrat spesifikliği üç ana grupta incelenebilir:

1. Spesifik olmayan lipazlar: Açılglicerol moleküllerinden rastgele yağ asitleri, gliserol ya da mono-digliceridleri oluştururlar. Kimyasal katalistlerle oluşturulan ürünlere benzer olan bu ürünlerin farkı reaksiyon için düşük sıcaklığa ihtiyaç duymalarıdır.
2. 1,3-spesifik lipazlar: 1 ve 3 pozisyonlarından yağ asitlerini serbest bırakır. Bu nedenle farklı kompozisyonlarda ürünler oluşturulur.
3. Yağ asitlerine spesifik lipazlar: Esterlerin hidrolizinde rol oynarlar. Bunlar cis konumundaki karbon 9'da çift bağları bulunan uzun zincirli yağ asitleridir. Bu tür bir spesifiklik lipazlar arasında yaygın değildir. Bu türden en çok çalışılan enzim *Geotrichum candidum*'dan elde edilen lipaz enzimidir (Ribeiro ve ark., 2011).

Geniş substrat spektrumu lipaz enzimini biyoteknolojik uygulamalar için önemli bir biyokatalist haline getirmektedir. Bu nedenle de gıda, deterjan, farmasötik endüstrisinden biyodizel üretimine birçok farklı alanda kullanılmaktadır (Hasan ve ark., 2006a).

1.5.1. Deterjan Endüstrisindeki Kullanımı

Deterjanlarda kullanılan lipazlar bazı özelliklerine göre seçilmektedir. Bunlar; düşük sıcaklık ve yüksek pH'ta çalışabilmek, düşük substrat miktarında çeşitli yağların hidrolizini gerçekleştirebilmek ve deterjan formülasyonlarındaki diğer enzim ve sürfektanlara karşı dayanıklı olmaktır (Sharma ve ark., 2011). Geleneksel deterjanlara göre lipaz içeren deterjanlar daha az çevresel atık içermektedir. Bu deterjanlar biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan, zararlı atıkları olmayan deterjanlardır. Lipazlar ev ve endüstriyel çamaşır, bulaşık deterjanlarında yağ kalıntılarının uzaklaştırılmasında ve tıkanmış giderlerin temizliğinde kullanılmaktadır. Lipazlar triaçilgliserollerini daha kolay çözünebilen monogliserid, digliserid, yağ asitleri ve gliserole parçalar. Biyoteknolojik temelli deterjanların kullanımı özellikle endüstride çok yaygındır. Çünkü spesifik temizleme gücüne sahiptirler. Düşük sıcaklıklarda kullanılabilirliği nedeniyle enerji tasarrufu da sağlamaktadır. Alkalın pH'larda (pH: 8-11) çalışabilen lipazların deterjan endüstrisinde kullanım potansiyeli yüksektir (Hasan, 2010b).

İlk ticari lipaz enzimi 1988 yılında, Novo Nordisk tarafından deterjan endüstrisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. *Humicola* sp. tarafından üretilen bu enzimin ticari açıdan yeterli olmayışı nedeniyle lipaz enzimini kodlayan gen bölgesi *Aspergillus oryzae*' ye aktarılmıştır. Bu sayede enzim yüksek miktarda üretilmiş ve performansı da artmıştır. Piyasaya Lipolase adı ile sunulan enzimin optimum pH'sı 10,5- 11,0'dır. Optimum sıcaklığı ise 40°C'dir. Oksidasyon stabilitesi göstermektedir ve proteolitik solüsyonlara karşı da kararlıdır. Lipolase'ın daha sonra farklı varyasyonları da piyasaya sunulmuştur. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen lipaz *Thermomyces lanuginosus*'tan orjinlenmiştir ve *A. oryzae*'de ekspres edilmiştir (Houde ve ark., 2004). 1995 yılında Genenco International tarafından iki rekombinant lipaz enzimi geliştirilmiştir. Lumafast adlı enzim *Pseudomonas mendocina*'dan, Lipomax adlı enzim ise *Pseudomonas alcaligenes*' ten orjinlenmiş ve *Bacillus* sp.'de ekspres edilmiştir (<http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html>).

1.5.2. Yağ Endüstrisindeki Kullanımı

Hidrolaz enzim ailesinin bir üyesi olan lipazlar triağılgliceroller gliserole kadar hidroliz edebilirler. Bunun yanı sıra esterifikasyon, interesterifikasyon ve transesterifikasyon gibi reaksiyonları katalizlemektedirler. Bu da birçok endüstride potansiyel kullanım alanı yaratmaktadır (Hasan ve ark., 2006a). Özellikle yağ endüstrisinde yararlı olmayan yağların, oleik asit bakımından zengin yağlar ya da besinsel olarak önemli triağılgliceroller gibi daha yararlı yağlara dönüştürülmesi reaksiyonlarında lipazlar önemli rol oynamaktadır. Örneğin farmasötik olarak önemli çoklu doymamış yağ asitlerinin, insan sütünün içerdiği yağın dengi olan 'betapol' adlı maddenin ve kakao yağının dengi olan yağların üretimi gibi transesterifikasyon reaksiyonlarını lipazlar katalizlemektedir (Gupta ve ark., 2003). *Mucor miehei* ve *Candida antarctica* lipazları organik çözücü yokluğunda yağ asitlerinin esterifikasyonunda kullanılmıştır. Bir organik çözücüde immobilize edilmiş *M. miehei* lipazı ayçiçeği, zeytin yağı gibi yağların interesterifikasyonunu katalizlemektedir (Hasan ve ark., 2006a). İmmobilize

edilmiş *Rhizomucor miehei* lipazı palmitik asitteki palm yağının stearik asit ile değişimi reaksiyonunu katalizlemekte kullanılmıştır. İmmobilize *Candida antarctica*, *C. cylindracea* AY30, *Humicola lanuginosa*, *Pseudomonas* sp. ve *Geotrichum candidum* lipazları ayçiçeği yağının üretiminde kullanılabilecek lipofilik antioksidantların sentezinde yer alan fenollerin esterifikasyonunda kullanılmıştır (Sharma ve ark., 2011).

1.5.3. Tekstil Alanındaki Kullanımı

Lipaz tekstil endüstrisinde genellikle kumaşlardan haşıl yağının uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu da kumaşın boyayı emmesini kolaylaştırmaktadır. Özellikle kot kumaşlarının aşındırılması işlemi sırasında oluşabilecek çatlakların ya da düzensiz çizgilerin oluşumu en aza indirilmektedir (Hasan ve ark., 2006a).

Polietilen tereftalat (PET) yaygın olarak kullanılan sentetik fiberlerden biridir. Dayanıklılık, esneklik, yıkanabilirlik, kırılganlığa ve aşınmaya karşı dayanıklı olması gibi avantajlarının yanında hidrofobik özelliğinden ötürü boyanabilirliği azdır. Polyester kumaşların modifiye edilmesinde en çok kullanılan yöntem alkalın uygulamasıdır. Ancak bu yöntem kumaşın dayanıklılığı azaltmaktadır. Bu nedenle çevre dostu ve avantajlı bir uygulama olarak polyester kumaşların modifiyesinde lipaz enzimi kullanılmaktadır (Kim ve Song, 2006).

1.5.4. Biyodizel Üretimindeki Kullanımı

Çeşitli bitkisel yağlardan yakıt üretimi konusu, fosil yakıtlarının sınırlı olması, var olan yakıtların fiyatlarının pahalılığı ve çevre kirliliği gibi sebepler nedeniyle çok güncel bir konudur.

Biyodizel sülfür oksit açığa çıkarmaz ve kurum oluşumu diğer yakıtlarla karşılaştırıldığında oldukça azdır. Çevre dostu bir yakıt olarak büyük kullanım potansiyeline sahiptir ve çeşitli kimyasalların ya da lipaz enziminin katalizlediği yağların transesterifikasyonu ile üretilmektedir (Tan ve ark., 2010).

Biyodizel kullanımının sağladığı avantajlar arasında düşük enerji tüketimi, substratların ve ürünlerin düşük termal degradasyonu, kullanılan ham materyallerin çeşitliliği, verim kaybı olmadan asit yağların kullanılabilirliği, immobilize enzim ya da hücre kullanıldığında ürünün ve yan ürünlerin saflaştırılmasının kolaylığı, katalistin biyolojik olarak ayrışabilir olması sayılabilir (Ribeiro ve ark., 2011).

1.5.5. Diagnostik Araç Olarak Kullanımı

Klinik diagnozda ve gıda endüstrisinde lipidlerin nicel olarak belirlenmesi önemlidir. Triaçilgliserollerin kimyasal yöntemlerle belirlenmesi ile biyokimyasal bir biyosensör ile belirlenmesi karşılaştırıldığında biyosensörler diğer yöntemlere göre hem ucuzdur hem de daha hızlı sonuç vermektedirler. Klinik diagnozda lipidleri tespit etmek üzere bir biyosensör tasarlanmıştır. Lipazlar örnekteki triaçilgliserollerden gliserol oluşturmada kullanılmış ve oluşan gliserol enzimatik ve kimyasal yöntemlerle ölçülmüştür (Sharma ve ark., 2011). Lipazların glukoz oksidaz ile birlikte pH/oksijen problemlerine immobilize edilmesiyle triaçilgliserollerdeki ve kandaki kolesterol miktarını ölçmekte kullanılabilir (Hasan ve ark., 2006a).

1.5.6. Diğer Alanlardaki Kullanımı

Çayın işlenmesi sürecinde de lipazlardan faydalanılır. Üretim sırasında membran lipidlerinin enzimatik olarak parçalanmasıyla çaya karakteristik aromasını veren uçucu ürünler ortaya çıkmaktadır. *Rhizomucor miehei*'den elde edilen lipazın çoklu doymamış yağ oranını arttırdığı bildirilmiştir (Hasan ve ark., 2006a).

Kağıt yapımında kullanılan odunların içerdiği triaçilgliserol ve balmumu gibi hidrofobik bileşenlerin üretimde sorun oluşturduğu bilinmektedir. *Candida rugosa*'dan elde edilen lipaz Japonya'da bir kağıt üretim şirketi tarafından kullanılmış ve odun triaçilgliserollerinin hidrolizinde yaklaşık % 90 oranında bir başarı elde edilmiştir (Bajpai, 1999).

Lipazlar sürfektanlar ve aroma üzerinde etkili olduğundan kozmetik ve parfüm endüstrisinde potansiyel uygulama alanı vardır. Gliserollerin esterifikasyonu ile elde edilen mono ve diaçilgliserol bu endüstride sürfektan olarak kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2011). Unichem International (İspanya) güneş koruyucu kremleri, cilt kremleri ve duş yağlarında kullanılan isopropil miristat, isopropil palmitat ve 2-etilheksilpalmitat gibi maddelerin üretim reaksiyonlarının katalizinde *Rhizomucor meihei*'den elde edilen lipaz enzimini kullandıklarını açıklamışlardır. Lipaz enziminin katalizlediği reaksiyon sayesinde diğer kimyasal katalistlerin kullanıldığı reaksiyonlara göre daha kaliteli ürün elde edildiği ve ürün saflaştırma sürecini en aza indirdiği bildirilmiştir (<http://www.aubkc.org/beta/bioproj2/uses.html>).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Çalışılan Aktinomiset İzolatları

Çalışmada, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında daha önceki çalışmalarda çeşitli toprak örneklerinden izole edilmiş toplam 250 aktinomiset izolatı lipaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. En yüksek lipaz aktivitesi gösteren aktinomiset izolatının genomik DNA'sı lipaz geninin klonlanması ve genomik DNA kütüphanesi oluşturulması amacıyla kullanılmıştır.

2.1.2. Klonlama Konakçısı EPI300™-T1®

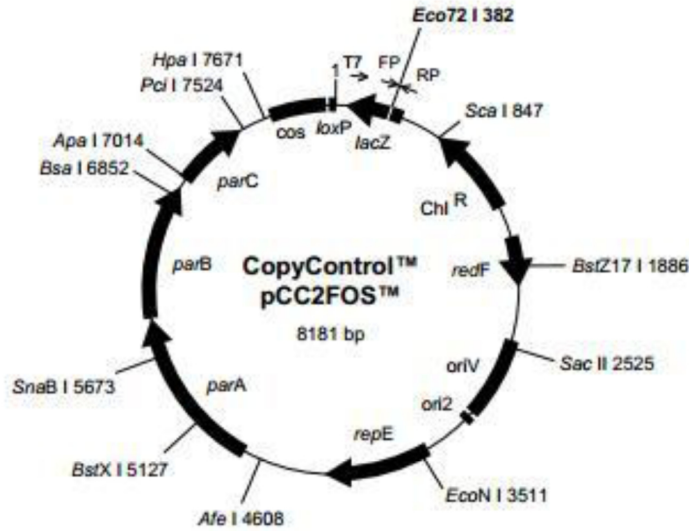
Klonlama konakçısı olarak fosmid kütüphane oluşturma kitinin (Epicentre, CCFOS110) içerdiği reaktiflerden biri olan EPI300™-T1® kullanılmıştır ve genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için gereken büyük insert DNA'ları alabilmektedir. Konakçı T1 bakteriyofajına dirençlidir. Mutant *trfA* geni içermektedir ve gen klonların kopya sayısının kontrolü için indüklenebilir bir promotorun kontrolü altındadır. Standart LB (Luria-Bertani) ya da SOC besiyerinde *trfA* geni baskılanır. Besiyerine indükleyici solüsyon eklendiğinde *trfA* geninin ekspresyonu indüklenir ve gen ürünü ise *oriV* replikasyon orjininden replikasyonun başlamasını sağlamaktadır. Bu şekilde klonlardaki kopya sayısı artmaktadır.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kontrol DNA

Kullanılan kontrol DNA fosmid kütüphane oluşturma kitiyle (Epicentre, pCCFOS110) birlikte temin edilmiştir.

2.1.4. CopyControl pCC2FOS™ Klonlama Vektörü

pCC2FOS™ fosmid kütüphane oluşturma kitinde *Eco72* I ile kesilerek linerize edilmiş ve defosforilize halde bulunmaktadır. Küt uç klonlama (blunt end) için hazır haldedir. Vektörün önemli bir özelliği antibiyotik seçici marker olarak kloramfenikole dirençli olmasıdır. Bu sayede sadece plazmid içeren koloniler kloramfenikol içeren besiyerinde gelişebilmektedir. *E.coli* F faktör tabanlı tek kopya replikasyon orjinine sahiptir. Bu replikasyon orjini nedeniyle fosmid klonlar tek kopya ile insert stabilitesini sağlar. Ayrıca sahip olduğu *oriV* replikasyon orjini sayesinde kopya sayısı hücrede 50 kopyaya kadar arttırılabilmektedir. Lambda paketleme için bakteriyofaj lambda *cos* bölgesi içermektedir. Bu da faj ile transformasyonu sağlamaktadır.



Şekil 2.1. Vektörü kesen bazı restriksiyon enzimlerinin kesim noktaları, replikasyon orjinleri (ori bölgeleri), kloramfenikol antibiyotiğine karşı direnç geni (*Chl^R*) bölgeleri

2.1.5. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.5.1. Lipaz Besiyeri 1

Pepton	5 g
Yeast ekstrakt	3 g

Tributrin	10 ml
Agar	10 g

Yukarıda verilen bileşenler tartılmış ve hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlanarak, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.5.2. Lipaz Besiyeri 2

Tributrin	% 1
Gumarabic	% 0,1
Kloramfenikol	12,5 µg/ml
Arabinoz	% 0,001
LB Agar	37 g

Kloramfenikol dışında yukarıda verilen bileşenler tartılmış ve hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Kloramfenikol antibiyotiği ise 12,5 µg/ml olacak şekilde hazırlanmış ve 0,4 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril ettikten sonra besiyerine eklenmiştir (Couto ve ark., 2010).

2.1.5.3. LB (Luria-Bertani) Broth (Neogen)

Kazein	10 g
Yeast ekstrakt	5 g
Sodyum klorür	5 g

Besiyerinden 20 g tartılmış ve 1000 ml distile su ile çözülmüştür. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.5.4. LB (Luria-Bertani) Agar Kloramfenikol Besiyeri (Fluka)

Kazein	10 g
Yeast ekstrakt	5 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	15 g

Besiyerinden 37 g tartılmış ve 1000 ml distile su ile çözülmüştür. 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Kloramfenikol antibiyotiği ise 12,5 µg/ml olacak şekilde hazırlanmış ve 0,4 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildikten sonra besiyerine eklenmiştir.

2.1.5.5. LB Broth MgSO₄-Maltoz Besiyeri (Neogen)

Besiyerinden 1 g tartılmış ve 50 ml distile su ile çözülmüştür. 10 mM MgSO₄ ve % 0,2 maltoz olacak şekilde besiyerine eklenmiştir. 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.5.6. Nutrient Agar (Oxoid)

Pepton	5 g
Meat ekstrakt	3 g
Agar agar	12 g

Besiyerinden 75 g tartılarak 1000 ml distile su ile çözülmüş ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.6. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Kloramfenikol 12,5 µg/ml
- Etidyum bromür 10 mg/ml
- Gliserol, % 15 ve % 80 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

- Trizma Base
- Trizma Hidroklorid (TrisHCl)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)
- N-Lauroylsarcosine (Sarkozyl)
- NaCl
- Sodyum dodesil sülfat (SDS)
- Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1)
- Sodyum Asetat
- İsoopropanol
- Etanol
- Tributrin
- Agaroza,
- MetaPhorAgaroza,
- Kloroform
- 1 X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA): 48,4 gram trizma base ve 7,44 gram EDTA tartıldıktan sonra 11,42 ml asetik asit eklenmiş ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
- Faj Dilüsyon Tamponu: 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 100 mM NaCl ve 10 mM MgCl₂ 10 ml distile su ile çözölmüştür.
- TE Tamponu: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8) 100 ml distile su ile çözölmüştür.
- Solüsyon I: % 1 sarcosyl, 0,5 M NaCl, % 1 SDS hesaplanarak 100 ml distile su ile çözölmüştür.
- Stop Solüsyonu: 20 µl 3 M NaOAc (pH 5,2), 20 µl 100 mM Na₂EDTA (pH 8), 10 µl 20 mg/ml glikojen 50 µl nükleaz içermeyen steril distile suda çözölerek kullanılmıştır.

2.1.7. Çalışmada Kullanılan Kitler

CopyControl™ fosmid kütüphane üretim kiti (Epicentre, CCFOS5059), Wizard SV PCR saflaştırma kiti (Promega, A9281), plazmid izolasyon kiti (NucleoSpin® Plasmid), CEQ8000 Quick Start kit (BeckmanCoulter, 608120).

2.2. METOT

2.2.1. Lipaz Aktivitesi Gösteren Aktinomiset İzolatlarının Seçimi

Daha önceki çalışmalarda çeşitli toprak örneklerinden izolasyonları gerçekleştirilen ve -80°C’de muhafaza edilen toplam 250 aktinomiset izolatı aktif edilmek amacıyla Nutrient Agar (NA) besiyerine ekilmiştir. Petriler 28°C’de 1 hafta inkübe edilmiş ve saflıkları kontrol edildikten sonra lipaz aktivitesi gösteren izolatların seçimi amacıyla NA besiyerinde geliştirilmiş olan her bir izolattan 6 mm çaplı agar delici ile agar bloklar çıkartılmıştır. Tributirin içeren Lipaz 1 besiyerine iki paralel şeklinde aktarılan agar bloklar 28°C’de 1 hafta inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda tributirinin lipaz enzimi ile parçalanması sonucu tüpteki besiyerinde oluşan şeffaf derinlik cetvel yardımıyla ölçülmüştür (Ko ve ark., 2005).

2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Lipolitik aktivitesi yüksek olduğu belirlenen iki izolatın (46A ve 47A no’lu izolatlar) genomik DNA izolasyonu Sharma ve ark. (2005)’e göre yapılmıştır. Protokol şu şekildedir:

- 1) NA ortamında aktinomiset örnekleri inoküle edilmiş ve 28°C’de 48 saat inkübe edilmiştir.
- 2) Steril santrifüj tüplerine 200 µl TE tamponu ilave edilmiştir.
- 3) Steril kürdan yardımıyla aktinomisetler santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 4) 400 µl Solüsyon I ilave edilmiş ve iyi bir şekilde karıştırılmıştır. 37°C’ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiş ve her 5 dakikada bir hafifçe çalkalanmıştır.
- 5) Eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve ters düz yaparak yavaş yavaş karıştırılmıştır.
- 6) 10.000 g’de 5 dakika 37°C’de santrifüj edilmiş, üst faz yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

- 7) 0,1 hacim 3M sodyum asetat (pH 5,2) ve 0,6 hacim isopropanol (soğuk) ilave edilmiştir. 4-6 kez alt üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır.
- 8) 10.000 g'de 5 dakika 37 °C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- 9) 1 ml soğuk % 70'lik etanol ilave edilmiş ve 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek pellet yıkanmıştır.
- 10) Pellet havada kurutulduktan sonra 50 µl steril nükleaz içermeyen steril distile suda çözülmüştür.
- 11) Elde edilen genomik DNA örneğinin kalitesi % 1'lik agaroz jelde incelenmiştir.

2.2.3. Lipaz Yönünden Etkin Genlerin Belirlenmesi Amacı İle Klonlanma

2.2.3.1. Genomik DNA'nın Parçalanması

Seçilen aktinomiset örneklerinden elde edilen genomik DNA CopyControl™ Fosmid Library Production Kit'inin belirttiği şekilde parçalara ayrılmıştır. Buna göre DNA'yı rastgele parçalamak için pipetleme yöntemi kullanılmıştır. Sarı pipet ucu ile 50-100 kez pipetlenerek rastgele parçalara ayrılan DNA % 1'lik 20 cm standart agaroz jelde 30 V'ta gece boyu yürütülmüştür.

2.2.3.2. İnsert DNA'nın 5' Ucunun Tamiri

Parçalanmış DNA'nın 5' ucunun fosforlanması (küt uç oluşumu) daha sonraki aşama olan ligasyonun başarılı olması için önemlidir. 5' ucunun tamiri için;

- Nükleaz içermeyen steril distile su 12 µl
- 10X End-Repair Buffer 8 µl
- 2,5 mM dNTP Mix 8 µl
- 10 mM ATP 8 µl
- İnsert DNA 40 µl
- End-Repair Enzyme Mix 4 µl
- Toplam reaksiyon hacmi: 80 µl

Reaksiyon oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 70°C’de 10 dakika inkübasyon ile End-Repair Enzyme Mix’in aktivitesi durdurulmuştur.

2.2.3.3. 5’ Ucu Tamir Edilen DNA’nın Büyüklük Seçimi

İnsert DNA’nın 5’ ucunun fosforlanması işleminden sonra insert DNA %1’lik low melting point (LMP) agaroz jelde 30V’da gece boyu yürütülmüştür. Gerekli rezolüsyonu sağlamak için 20 cm’lik agaroz jel hazırlanmıştır. Marker (Lambda DNA/HindIII, Fermentas) ve fosmid kontrol DNA’nın yüklendiği sıralar kesilerek etidyum bromürde boyanmıştır ve jelin sadece bu kısmı UV’de görüntülenmiştir. Çünkü DNA’nın UV’ye maruz kalması ligasyon ve klonlama verimini oldukça düşürmektedir. UV altında 40-30 kb büyüklüğündeki kısım işaretlenmiş ve örnekler işaretlenen bölgeden kesilmiştir.

2.2.3.4. İnsert DNA’nın Agaroz Jelden Geri Kazanımı

Bu kapsamda aşağıdaki işlem basamakları uygulanmıştır:

- 1) Kesilen agaroz jel parçalarının ağırlıkları tartılmış ve jel parçaları 70°C’de 10-15 dakika inkübe edilerek eritilmiştir. Bu esnada GELase 50X Buffer 45°C’de bekletilmiştir.
- 2) Son konsantrasyon 1X olacak şekilde GELase 50X Buffer’dan uygun miktarda alınmıştır. Her 100 µl erimiş agaroz için GELase Enzyme Preparation’dan 1 µl eklenmiştir. Elde edilen solüsyon 45°C’de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 3) Reaksiyon 45°C’ye alınarak 10 dakika inkübe edilmiş ve GELase enzimi inaktif hale getirilmiştir.
- 4) Karışımdan 500 µl alınarak steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 5) Tüpler 5 dakika buzda inkübe edilmiştir. Ardından 16.000 g’de 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantın % 90-95’i dikkatlice alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır.

- 6) DNA'nın presipitasyonu aşamasında ilk olarak, karışımın 0,1 hacminde 3M sodyum asetat (pH 7.0) eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır.
- 7) Karışımın 2,5 katı hacminde etanol eklenmiş ve ters-düz edilerek yavaşça karıştırılmıştır.
- 8) Karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 9) Presipite olan DNA 16.000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
- 10) Pellet halinde olan DNA'dan süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
- 11) Pellet % 70'lik soğuk etanol ile yıkanmış ve 16.000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
- 12) İkinci yıkamadan sonra tüp ters çevrilerek 5-10 dakika pelletin kuruması sağlanmıştır.
- 13) Pellet halindeki DNA nükleaz içermeyen steril distile su ile resüspanse edilmiştir.

2.2.3.5. Ligasyon Reaksiyonu

Bu reaksiyon kapsamında;

• 10X Fast-Link ligasyon tamponu	1 µl
• 10 mM ATP	1 µl
• CopyControl pCC1FOS vektörü (0,5 µg/ µl)	1 µl
• Konsantre insert DNA	6 µl
• Fast-Link DNA ligaz	1 µl
Toplam reaksiyon hacmi:	10 µl

Reaksiyon oda sıcaklığında 4 saat inkübe edilmiştir. Fast-Link DNA Ligaz enzimini inaktif etmek için reaksiyon 70°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Aynı reaksiyon pozitif kontrol amacıyla insert olarak fosmid kontrol DNA kullanılarak da yapılmıştır.

2.2.3.6. Klonların Paketlenmesi

- 1) EPI300-T1 kompetent hücrenin gecelik kültüründen 50 ml LB Broth MgSO_4 -maltoz besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C 'de çalkalamalı etüvde yaklaşık 2 saat inkübe edilmiştir.
- 2) 10 μl ligasyon reaksiyonu için bir adet MaxPlax Lambda paketleme reaksiyonu buzda eritilmiş ve 25 μl 'si ligasyon reaksiyonuna eklenmiştir. Kalan 25 μl ise -70°C 'ye kaldırılmıştır.
- 3) Bu solüsyon pipetleme yapılarak birkaç kez karıştırılmıştır. Hava kabarcığı oluşumundan kaçınılmıştır.
- 4) Paketleme reaksiyonu 30°C 'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- 5) İnkübasyondan sonra kalan 25 μl 'lik MaxPlax Lambda paketleme reaksiyonu solüsyona eklenmiş ve pipetlenerek karıştırılmıştır.
- 6) Paketleme reaksiyonu 30°C 'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- 7) İnkübasyon sonunda reaksiyona son hacim 1 ml olacak şekilde faj dilüsyon tamponu (PDB) eklenmiş, yavaşça karıştırılmıştır. Karışıma 25 μl kloroform eklenmiş ve $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

2.2.3.7. Paketlenmiş Klonların Dilüsyonu

- 1) 1 ml paketlenmiş faj reaksiyonundan dilüsyon sıvısı olarak PDB kullanılarak bir seri dilüsyon yapılmıştır.

90 ml PDB + 10 ml paketlenmiş faj (10^{-1})

100 μl 10^{-1} dilüsyonu + 900 μl PDB (10^{-2})

100 μl 10^{-2} dilüsyonu + 900 μl PDB (10^{-3})

- 2) Dilüsyonlardan 10 μl , orijinal faj stoğundan 10 μl alınarak 100 μl EPI300-T1 kompetent hücreye eklenmiştir. 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 3) Elde edilen karışım 12,5 $\mu\text{g/ml}$ kloramfenikol içeren LB petrilere yayma plak yöntemiyle ekilmiştir. 37°C 'de bir gece inkübe edilmiştir.

2.2.4. Klonların Otoindüksiyonu

250 ml'lik erlenlerde 12,5 µg/ml kloramfenikol içeren 50 ml LB Broth besiyeri hazırlanmıştır. Besiyerine CopyControl™ fosmid kütüphane üretim kiti içinde bulunan otoindüksiyon solüsyonundan 100 µl eklenmiştir. Hazırlanan besiyerlerine her bir koloniden ekim yapılmıştır. 37°C'de 250 rpm çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edilmiştir.

2.2.5. Klonların Kültürel Ortamda Lipolitik Aktivitelerinin İncelenmesi

İnkübasyon sonunda 12,5 µg/ml kloramfenikol içeren LB petrilere gözlenen kolonilerin yine aynı besiyerine ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürlerden 6 mm çaplı agar delici ile agar bloklar alınıp, steril koşullarda tüplerde hazırlanmış Lipaz 2 besiyerine aktarılmıştır. 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Besiyerinde lipolitik aktiviteye bağlı şeffaf derinlik oluşumuna bakılmıştır.

2.2.6. Plazmid İzolasyonu

Konakçı hücrelerin taşıdığı klonlanmış plazmidler, plazmid izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. Kit protokolü şu şekildedir:

- 1) 12,5 µg/ml kloramfenikol içeren LB besiyerine tek koloniden ekim yapılmış ve bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir.
- 2) İnkübasyon sonunda 11.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Hücre lizizi

- 3) Pelet üzerine 250 µl Buffer A1 ilave edilmiş ve tamamen resüspanse olana kadar pipetlenmiştir.
- 4) Karışıma 250 µl Buffer A2 eklenmiş ve santrifüj tüpü 6-8 kez ters-düz edilerek karıştırılmıştır.

- 5) Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiş, lizatin temiz görünmesi sağlanmıştır.
- 6) Lizata 300 µl Buffer A3 eklenmiş ve 6-8 kez ters-düz edilerek karıştırılmıştır.

Lizatin temizlenmesi

- 7) 11.000 g'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve süpernatant berrak olana kadar işlem tekrarlanmıştır.

DNA'nın bağlanması

- 8) Kolon koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş ve süpernatant kolona aktarılmıştır.
- 9) 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve koleksiyon tüpüne geçen sıvı atılmıştır.

Silika membranın yıkanması

- 10) Önceden 50°C'lik su banyosunda ısıtılan 500 µl Buffer AW kolona aktarılmış ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 11) 600 µl Buffer A4 eklenmiş ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Silika membranın kuruması

- 12) 11.000 g'de 2 dakika santrifüj edilerek etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Saf plazmid DNA'sının elde edilmesi

- 13) Kolon temiz bir eppendorf tüpe yerleştirilmiş ve 30 µl nükleaz içermeyen steril distile su eklenmiştir. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildikten sonra 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

2.2.7. Yüksek Lipolitik Aktiviteye Sahip Aktinomisetlerin 16S rDNA Bölgelerine Dayalı Moleküler İdentifikasyonu

47 numaralı örnek 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi için seçilmiştir. Bu amaçla önce 9F ve 1541R primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları aşağıdaki gibidir:

• 10X TaqBuffer (+ KCl –MgCl ₂)	2,5 µl
• 25 mM MgCl ₂	2,5 µl
• 2,5 mM dNTP mix	2,5 µl
• 2,5 mM ileri primer	2,5 µl
• 2,5 mM geri primer	2,5 µl
• Taq polimeraz (5 u/µl)	0,25 µl
• Nükleaz içermeyen steril distile su	11,75 µl
• Kalıp DNA	1 µl
Toplam reaksiyon hacmi:	25 µl

PCR koşulları ise şu şekildedir:

Ön denatürasyon	94°C	3 dk	
Denatürasyon	90°C	30 sn	} 30 döngü
Bağlanma	60 °C	1 dk	
Uzama	72 °C	2 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	

Reaksiyon sonucunda elde edilen PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde kontrol edilmiş ve yaklaşık 1533 bp ürün elde edildiği görülmüştür.

2.2.7.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

PCR ürünlerinin jelden saflaştırılması için Promega Wizard[®] SV Gel-PCR Clean-Up System saflaştırma kiti kullanılmıştır. Kit protokolü şu şekildedir:

- 1) UV ışığı altında PCR ürünleri kesilmiş ve steril santrifüj tüplerine alınmıştır.
- 2) Boş bir santrifüj tüpünün darası alınarak kesilen jel parçasının gerçek ağırlığı bulunmuştur.
- 3) Her 10 mg jel için kitte bulunan membran bağlanma solüsyonundan 10 µl eklenmiştir.
- 4) 50-65°C su banyosunda jel parçası tamamen eriyene kadar inkübe edilmiştir.
- 5) Toplama tüpüne mini kolon yerleştirilerek karışım kolona aktarılmış ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 6) 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpüne dolan sıvı atılmıştır. Kolon tekrar yerleştirilmiştir.
- 7) 700 µl membran yıkama solüsyonu eklenmiş ve 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne dolan sıvı atılmıştır. Kolon tekrar yerleştirilmiştir.
- 8) 500 µl membran yıkama solüsyonu eklenmiş ve 16.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne dolan sıvı atılmıştır. Kolon tekrar yerleştirilmiştir.
- 9) Etanolün tamamen uzaklaşması için boş toplama tüpü ve kolon 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 10) Mini kolon boş bir santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 30 µl nükleaz içermeyen su eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 11) Mini kolon atılmış ve DNA % 1'lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra -20°C'de saklanmıştır.

2.2.7.2. Dizi Analizi Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR ile elde edilmiş olan ve jelden saflaştırılan 16S rDNA gen bölgesi Beckman Coulter CEQ8000 Quick Start dizi analizi kiti kullanılarak dizi analizine alınmıştır. Reaksiyon için kullanılan bileşenler ve miktarları aşağıdaki gibidir:

- Nükleaz içermeyen distile su 1,35 µl
- Primer 0,65 µl
- Kalıp DNA 2 µl
- PCR mix 6 µl

PCR koşulları ise şu şekildedir:

Denatürasyon	96°C	20 sn	} 30 döngü
Bağlanma	50 °C	20sn	
Uzama	60 °C	4dk	

2.2.7.3. Dizi Analizi PCR Ürünlerinin Manyetik Boncukla Saflaştırılması

- 1) Her reaksiyon tüpüne 5,5 µl taze hazırlanmış stop solüsyonu eklenmiştir.
- 2) PCR tüpündeki ürünler steril santrifüj tüplerine alınmış ve her 1 µl reaksiyon başına 1 µl (stop solüsyonu dahil edilmez) manyetik boncuk (Beckman Coulter Agencourt Clean SEQ) eklenmiştir.
- 3) Her tüpe 55 µl % 73'lük isopropanol eklenmiş, 10-15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 4) Tüpler magnetlere yerleştirilmiş ve 3-5 dakika beklenmiştir. Süpernatant dikkatlice atılmıştır.
- 5) 200 µl % 73 isopropanol magnetteki tüplere eklenmiş ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
- 6) 200 µl % 73 isopropanol magnetteki tüplere eklenmiş ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
- 7) Tüpler magnetten alınmış ve kapakları açık bir şekilde 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre içinde tüm alkolün uçması sağlanmıştır.
- 8) Boncuklar tamamen kuruduktan sonra her tüpe 40 µl Sample Loading Solution (SLS) eklenmiş ve pipetleme yaparak iyice karışması sağlanmıştır.
- 9) Tüpler tekrar magnetle yerleştirilmiş ve 5 dakika beklenmiştir.
- 10) Süpernatanttan 35 µl çekilmiştir. Bu esnada manyetik boncuk almamaya özen gösterilmiştir.

- 11) Çekilen süpernatant örnek plate'ine aktarılmış ve örneklerin üzerine buharlaşmayı önlemesi için mineral yağ damlatılmıştır.
- 12) Diğer plate'e ise ayırma tamponu (Separation Buffer) konmuş ve cihaza yerleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Aktinomiset İzolatlarının Kültürel Ortamdaki Lipaz Aktiviteleri

Toplam 250 adet aktinomiset izolatından 149 tanesi NA besiyerinde gelişme göstermiş ve derin difüzyon yöntemi ile lipaz aktiviteleri incelenmiştir. İzolatlar belirli derecelerde lipaz aktivitesi göstermiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Elde edilen izolatların lipolitik aktiviteleri sonucu oluşturdukları şeffaf derinlik (cm)

İzolat No	Derinlik	İzolat No	Derinlik
2	1,1	36	1,05
3	1,45	37	1,35
6	1,05	38	1,4
7	0,85	45	1,65
8	0,75	46	2,15
9	1,3	47	2,15
10	1,15	51	0,85
12	1	52	0,9
13	1,2	53	1,75
14	1,25	54	0,65
15	1,25	55	0,5
16	1,45	56	0,9
18	0,85	59	1,25
19	0,9	60	1,35
20	1,05	62	1,35
21	0,75	64	1,55
22	1,05	65	1,05
23	0,75	66	1,75
24	1	67	3
25	1,05	68	1,35
26	1,2	69	0,7
35	1,05	70	0,95

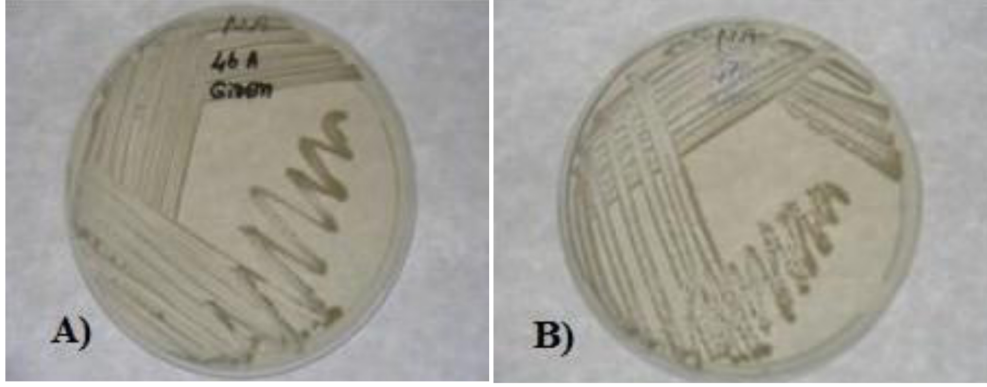
Çizelge 3.1. (Devam) Elde edilen izolatların lipolitik aktiviteleri sonucu oluşturdıkları şeffaf derinlik (cm)

İzolat No	Derinlik	İzolat No	Derinlik
71	1,75	124	0,75
72	1,65	125	0,85
73	0,95	126	1
74	1	127	1,55
75	0,65	128	1,7
76	1,65	129	1,35
77	1	130	1,8
78	1,45	131	1,3
79	2	132	1,45
80	1,8	133	1,75
81	1,9	134	1,75
85	1,9	135	1
86	0,7	136	0,65
87	1,5	137	0,65
89	1,65	138	1
91	1,85	139	1,6
92	1,4	141	1,4
93	0,4	142	1,9
94	0,7	146	1,95
95	0,9	147	1,05
97	1,6	148	0,5
98	1	149	0,75
99	0,4	150	1,5
113	1,35	151	1
114	1,15	152	0,75
116	1,15	153	1,7
117	1,25	154	0,85
118	1	158	1,85
120	1,15	159	1,3
123	1	160	0,5

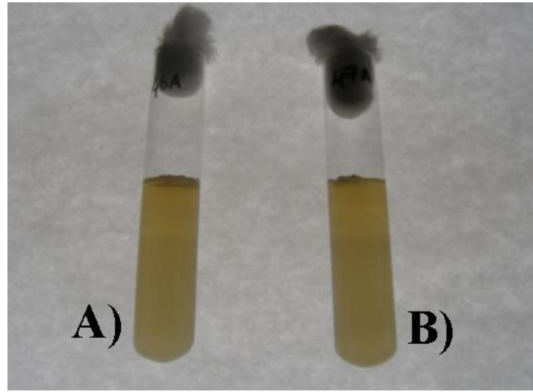
Çizelge 3.1. (Devam) Elde edilen izolatların lipolitik aktiviteleri sonucu oluşturdıkları şeffaf derinlik (cm)

İzolat No	Derinlik	İzolat No	Derinlik
161	2,05	187	0,6
162	1,35	190	1,15
163	0,75	192	1,15
165	0,45	195	0,85
167	1,45	196	1,55
168	0,95	204	1,25
169	1,05	205	1,1
170	1,55	209	1,8
171	1,55	211	1,75
172	1,3	212	1,25
173	1,25	213	1,85
174	2	215	1,45
175	1,5	216	0,55
176	1,85	218	1,65
177	1,95	219	0,45
178	1,2	220	0,35
179	1,1	221	0,8
180	1,1	222	2,05
181	0,85	229	0,65
182	1,5	243	1,35
184	0,8	244	1,1
185	1,25	230A	1
186	0,6		

Çizelge 3.1’de görüldüğü gibi besiyerinde en fazla şeffaf derinlik oluşturan izolatlar 47 ve 46 numaralı izolatlar olmuştur. Bu nedenle genomik DNA izolasyonu için bu izolatlar seçilmiştir. İzolatların Nutrient Agar besiyerindeki makroskobik görüntüleri Şekil 3.1’de görülmektedir.



Şekil 3.1. A) 46 ve B) 47 numaralı izolatların makroskobik görüntüleri

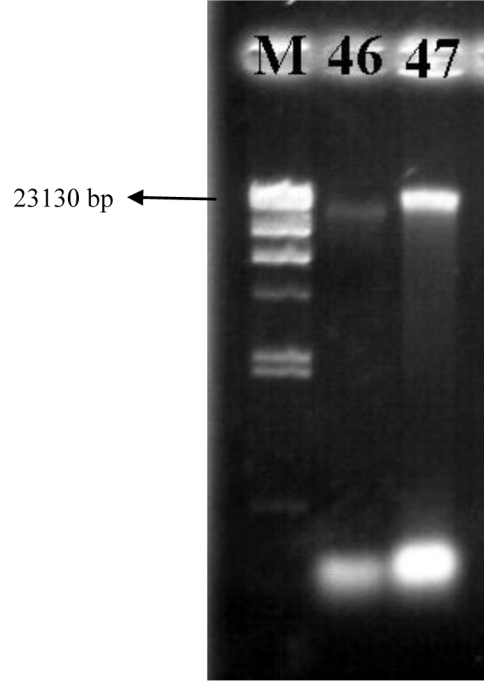


Şekil 3.2. A) 46 ve B) 47 numaralı izolatların Lipaz 1 besiyerinde oluşturdukları şeffaf derinlik

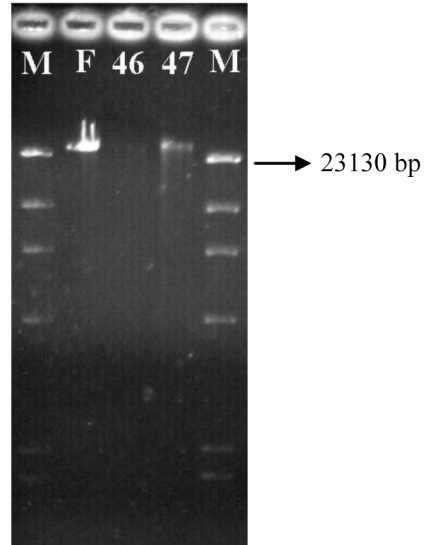
3.2. Genomik DNA İzolasyonu, Parçalanması ve Boyut Seçimi

46 ve 47 nolu izolatlardan elde edilen genomik DNA’nın uygun kalitede olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.3). Pipetleme sonucunda kontrol DNA ile aynı boyutta rastgele DNA parçalarının oluşturulduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4). Elde

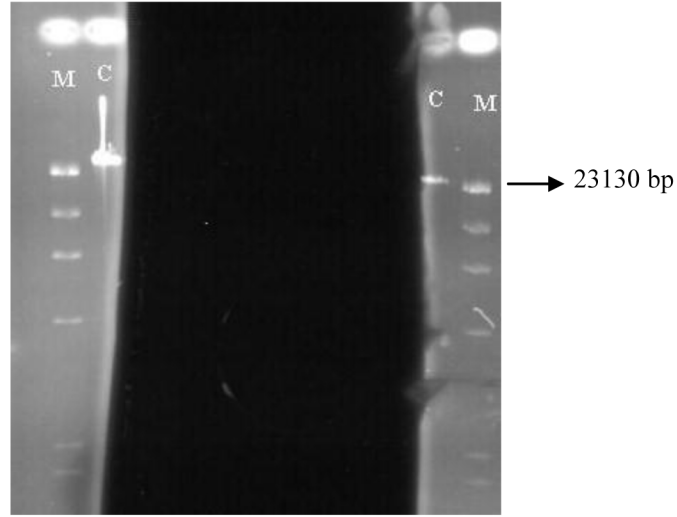
edilen rastgele DNA parçalarından 30-40 kb boyutunda olanlar jelden saflaştırılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.3. Genomik DNA'nın % 1'lik agaroz jelde UV altında görüntüsü. M; Lambda DNA/HindIII (Fermentas)



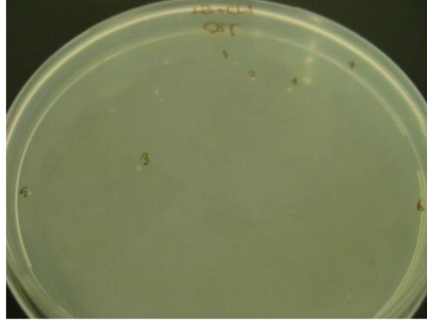
Şekil 3.4. Genomik DNA'nın parçalanması (M; Lambda DNA/HindIII (Fermentas), F; Fosmid Kontrol DNA



Şekil 3.5. Örneklerin yüklendiği kısmı kesilen jelin görüntüsü

3.3. DNA'nın Ligasyonu ve Transfeksiyonu

Küt uçlu DNA'nın vektöre ligasyonu sağlanmış ve ardından MaxPlax paketleme reaksiyonu ile fajlarla paketlenmiştir. Paketlenen DNA'nın kompetent hücre *E. coli* EPI300-T1'e transformasyonu gerçekleştirilmiştir. 37°C'de bir gecelik inkübasyon sonucunda 12,5 µg/ml kloramfenikol içeren LB petrisinde 16 adet koloni görülmüştür (Şekil 3.6). Bu kolonilerin de vektör içerdiği düşünülmüştür. Kolonilerin her biri için taşıdıkları vektörün kopya sayısını arttırmak amacıyla otoindükleme gerçekleştirilmiştir. Yüksek kopya sayısına sahip klonların lipolitik aktiviteleri incelenmiştir.



Şekil 3.6. 37°C’de bir gecelik inkübasyon sonucunda 12,5 µg/ml kloramfenikol içeren LB petrisinde görülen koloniler

3.4. Klonların Kültürel Ortamda Lipolitik Aktivitelerinin İncelenmesi

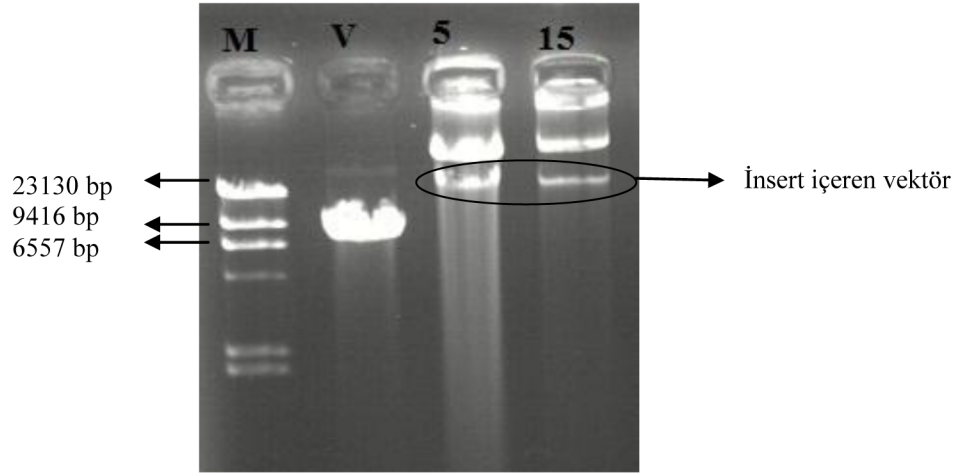
LB petrisinde belirlenen 16 koloninin her biri Lipaz 2 besiyerine de ekilmiş ve derin difüzyon yöntemi ile lipaz üretme yetenekleri incelenmiştir. Koloniler % 20’lik gliserol ortamında -85°C’de muhafazaya alınarak genomik DNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Ancak klonlarda lipolitik aktivite görülmemiştir.



Şekil 3.7. Negatif kontrol ve tek bir klondan elde edilen agar bloğu içeren besiyerinin inkübasyon sonunda görüntüsü

3.5. Plazmid Kontrolü

Elde edilen klonların plazmid içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla plazmid izolasyonu yapılmıştır.

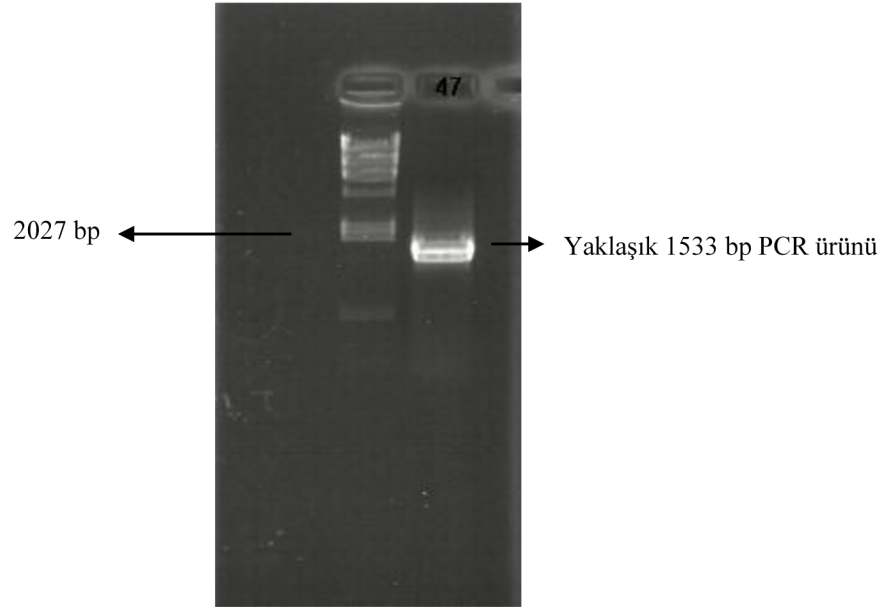


Şekil 3.8. Elde edilen bazı klonların plazmid izolasyonu sonuçları. M: Lambda DNA/HindIII (Fermentas) V: Boş vektör, 5: 5 numaralı klon, 15: 15 numaralı klon

Şekil 3.8’de görüldüğü gibi izole edilen plazmitin büyüklüğü, boş ve linerize haldeki ve 8 kb vektörden daha fazladır. Klonlarda yaklaşık 23 kb baz çiftlik bir bant ve bundan daha büyük bir bant görülmektedir. 23 kb’den daha büyük bandın ise kompetent hücreden kaynaklanan genomik DNA olabileceği düşünülmüştür.

3.6. Yüksek Lipolitik Aktiviteye Sahip Aktinomisetlerin 16S rDNA Bölgelerinin Dizilenmesine Dayalı Moleküler İdentifikasyonu

47 numaralı izolatanın genomik DNA’sı 9F ve 1541R primerleri ile amplifiye edilmesi sonucunda yaklaşık 1500 bazlık ürün elde edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.9. 9F ve 1541R primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünü

Bu reaksiyon ürünü çoğaltılıp saflaştırılmış ve elde edilen ürün dizi analizi PCR'ı için kalıp olarak kullanılarak reaksiyon kurulmuştur. Beckman Coulter CEQ8000 dizi analizi cihazı ile PCR ürününün dizi bilgisi elde edilmiştir. Elde edilen dizi bilgisi NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanındaki BLAST programıyla veritabanındaki diğer dizilerle benzerlik oranı karşılaştırılmıştır. Buna göre 47 numaralı izolat erişim numarası EU283368.1 olan 'uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene' e % 97 oranında benzemektedir (Şekil 3.9).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU283368.1	Uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA ger	425	425	29%	6e-117	97%
AY387303.1	Uncultured actinobacterium clone 36403 16S ribosomal RNA ge	337	337	28%	3e-90	91%
GU358071.1	Streptomyces sp. VITTKGB 16S ribosomal RNA gene, partial se	335	335	28%	1e-89	91%
FJ951435.1	Streptomyces indiaensis strain IF 5 16S ribosomal RNA gene, p	335	335	28%	1e-89	91%

Şekil 3.10. Elde edilen dizi bilgisine en yakın dört dizi

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda daha önceki çalışmalarla farklı toprak örneklerinden izole edilmiş ve % 15'lik gliserol içinde -80°C'de saklanan 250 aktinomiset izolatı kullanılmıştır. İzolatlar, NA besiyerine ekilmiş ve 28°C'de 7-10 gün inkübe edilmiştir. Ancak inkübasyon sonunda 149 adet izolat besiyerinde gelişmiştir. Canlandırılan 149 izolatın kültürel ortamda lipolitik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan lipaz besiyerinde izolatların oluşturdukları şeffaf derinlik cetvel ile ölçülmüştür. Bunlardan 53 tanesi (% 36) 1 cm ve daha az, 92 tanesi (% 62) 2 cm ve daha az, 4 tanesi (% 2) ise 2 cm'den daha fazla derinlik oluşturmuştur. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere tribütirinli besiyerinde en fazla şeffaf derinlik oluşturan 46 ve 47 numaralı (2,15 cm) iki izolat seçilmiştir.

Seçilen iki izolatın öncelikle Sharma ve ark. (2005)'na göre genomik DNA'ları izole edilmiştir. Kullanılan bu yöntem enzimatik olmayan bir yöntemdir. Yani hücre duvarlarının liziz olması için gereken proteinaz-K, lizozim gibi uzun inkübasyon süreleri olan enzimler kullanılmadığı için enzimlerin aktivasyonu için gereken uzun inkübasyon sürelerine gerek duyulmamaktadır. Bu nedenle de zaman tasarrufu sağlamaktadır. Solüsyon I'in içinde bulunan SDS (sodyum dodesil sülfat) ve sarkozyl deterjanları hücre duvarındaki proteinlerin konformasyonunu bozar ve parçalanmalarını sağlamaktadır. NaCl DNA'daki protein ve karbonhidratları uzaklaştırmasının yanı sıra Na kanyonları sayesinde DNA'nın yoğunluğunu artırma etkisi de mevcuttur.

İzolatlar arasında en yüksek lipolitik aktiviteyi gösteren ve genomik DNA'sı izole edilen 47 numaralı izolatın 16S rRNA gen bölgesine bağlı moleküler identifikasyonu yapılmıştır. Moleküler identifikasyonda 16S rRNA gen bölgesinin kullanılmasının nedeni iyi bir moleküler marker olmasıdır. Çünkü evrim süreci boyunca korunmuş bir bölgedir, yatay gen transferi içermemektedir. Ayrıca yaklaşık 1500 baz çiftlik uzunluğu ile filogenetik ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılacak yeterli bilgiyi içermektedir (Madigan ve Martinko, 2010). 9F ve 1541R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen saf ürünün dizi

analizi yapılmıştır. BLAST analizi sonucunda izolatın, erişim numarası EU283368.1 olan ‘uncultured actinobacterium clone AS42’ ye % 97 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Dizi analizi yapılan 47 numaralı izolatın genomik DNA’sı genomik DNA kütüphanesi yapmak amacıyla pipetleme yöntemiyle parçalanmıştır. Parçalama çeşitli restriksiyon endonükleazlarla da yapılabilmektedir. Bu yöntem genellikle BAC kütüphanelerinde tercih edilmektedir. (Anonim, 2003). Fakat restriksiyon enzimleri DNA’yı belli kesim noktalarından keseceğinden rastgele parçalama olmayacaktır. Restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleri bazı ilgilenilen DNA dizilerinde olabileceğinden kütüphanede boşlukların oluşmasına sebep olabilmektedir.

DNA rastgele parçalandıktan sonra % 1’lik agaroz jelde marker olarak fosmid kontrol DNA kullanılarak yürütülmüştür. DNA, fosmid kontrol DNA ile birlikte aynı yerde yürüdüğü için bir sonraki aşama olan küt uç oluşturma aşamasına geçilmiştir. DNA’nın 5’ ucu fosforlanarak küt uç oluşturulmuştur. Bu aşamada DNA küt uç klonlama için hazır hale getirilmiştir. Ardından DNA büyüklük seçimi yapılmak üzere % 1’lik LMP (Low Melting Point) agaroz jele yüklenmiştir. Yeterli rezolüsyonun sağlanabilmesi için 20 cm’lik jel hazırlanmıştır. Jelden saflaştırılan DNA’nın *Eco*72 I ile kesilerek linerize edilmiş ve defosforilize halde bulunan pCC1FOS vektörüne ligasyonu sağlanmış ve daha sonra kompetent hücre olan *E.coli* EPI300-T1’e transformasyonu MaxPlax Lambda fajlarına paketlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. 37°C’de gerçekleştirilen bir gecelik inkübasyon sonunda 12,5 µg/ml kloramfenikol içeren LB petrilinde koloni görülmemiştir. Bunun nedeninin insert DNA’nın konsantrasyonun jelden saflaştırma adımıyla düşmesi olabileceği düşünülmüştür. Küt uçlu klonlamada gereken insert DNA konsantrasyonu yapışkan uçlu klonlamaya göre daha fazla olmalıdır (Sambrook ve Russell, 2001). Çünkü küt uçlu klonlamada birleşecek uçların karşı karşıya gelme ihtimali daha düşüktür. Bu şansı arttırmak amacıyla bir sonraki klonlama denemesinde jelden saflaştırma adımı atlanmıştır.

Bu şekilde tekrarlanan klonlamada inkübasyon sonunda 16 adet koloni görülmüştür. Kompetent hücrenin 12,5 µg/ml kloramfenikol içeren LB agarda gelişebilmesi için kloramfenikole direnç geni taşıyan plazmiti taşıması

gerekmektedir. Bu da klonlamanın gerçekleştirildiğini göstermektedir. Elde edilen 16 klon *trfA* geni baskılandığı için tek kopya içermektedir. Bu da klonların stabilitesi için önemlidir (Anonim, 2003).

Daha sonra klonların kopya sayısını arttırmak amacıyla otoindüksiyon yapılmıştır. Buradaki amaç daha sonraki deneyler için klonlarda izole edilecek plazmid DNA miktarını arttırmaktır. Ayrıca klonların taşıdığı düşünülen lipolitik aktiviteye sahip genlerin kopya sayısı da artmış olacağı için gen aktivitesi daha fazla olacaktır. İndüklenen klonların lipolitik aktiviteleri Lipaz 2 besiyerinde denenmiştir. Fakat klonların hiçbirisi besiyerinde şeffaf derinlik oluşturmamıştır. Kullanılan vektörün defosforilize edilmiş olması self-ligasyonu engelleyen bir durumdur fakat yine de vektörün self ligasyona uğrayıp uğramadığını görmek amacıyla klonlardan plazmid izolasyonu yapılmıştır. Agaroz jelde boş vektörün büyüklüğü olan 8181 baz çiftinden daha büyük iki bant görülmüştür. Bu iki banttan yaklaşık 23 kb büyüklüğünde olan bandın insert taşıdığı, 23 kb'den daha büyük bandın ise kompetent hücreden kaynaklanan genomik DNA olduğu düşünülmüştür. Bu sonuç klonlamanın gerçekleştirildiğini fakat klonların bu çalışmada ilgilenilen lipaz genini taşımadığını göstermektedir. Bu durum şu şekilde de açıklanabilir: Lipaz enzimini kodlayan gen bölgesi başlangıç kodonu (ATG) ile başlayan ve bir dur kodonu ile (TAA-TAG-TGA) sonlanan bir açık okuma çerçevesine sahiptir. Genomik DNA'nın parçalanması sırasında buradaki tek bir bazın ayrılması bile okuma çerçevesini kaydıracağından kodlamada hata oluşacaktır. Ayrıca bilindiği üzere protein sentezinin gerçekleşebilmesi için ATG kodonu tarafından kodlanan formilmethionin amino asiti gerekmektedir. Dolayısıyla başlangıç kodonu mevcut olmayan okuma çerçevesi protein sentezi yapamayacağından, enzimin aktivitesini de görmek mümkün olmayacaktır.

Ayrıca teoride, rekombinant klonların oluşturduğu genomik DNA kütüphanesinde hedef genoma ait her DNA dizisinin temsil edilmesi gerekmektedir. Fakat uygulamada bazı DNA dizilerinin tamamen kaybolduğu ve bazı dizilerin de farklı derecelerde daha fazla temsil edildiği bilinen bir gerçektir (Sambrook ve Russell, 2001).

Bu çalışmada amaçlanan izolatlar arasında en yüksek lipolitik aktiviteye sahip olan izolatın genomik DNA kütüphanesini oluşturmak ve bu kütüphanedeki

lipolitik aktivite gösteren klonlardan tekrar alt klonlama yaparak lipaz geninin uygun konakçıda ekspresyonunu sağlamaktır. Ayrıca lipaz geninin dizi bilgisini elde etmek de çalışmanın amaçlarından biridir. Bu doğrultuda amaçlanan ve elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde seçilen 47 numaralı aktinomiset izolatına ait genomik DNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu kütüphanedeki 16 klonun tamamı izolatın genomik DNA'sından fragmentler taşımaktadır. Aktinomisetlerin ürettikleri enzimler gibi primer ve antibiyotikler gibi sekonder metabolitlerin çeşitliliği düşünüldüğünde bu klonların yapılacak daha sonraki moleküler çalışmalarda kullanılma şansı mevcuttur. Birçok araştırmacı aktinomisetlerin farklı biyoaktif bileşenlerinin moleküler klonlama çalışmalarında genomik DNA kütüphanelerinden faydalanmıştır (Stumpp ve ark., 2005; Dai ve ark., 2011; Ning ve ark., 2008).

Çalışmada elde edilen klonlar lipolitik aktivite göstermediğinden izolatın lipaz geninin dizi bilgisi elde edilememiştir. Bu amacın gerçekleştirilebilmesi için önerilebilecek yol; 16S rRNA'ya dayalı moleküler identifikasyonu yapılmış izolata en yakın türlerin NCBI veritabanında lipaz genine ait dizi bilgisine ulaşmak ve bu dizileri ClustalW gibi çoklu dikey hizalama programlarında hizalayarak korunmuş bölgelerini ortaya çıkarmaktır. Korunmuş bölgelerden yarı bozuk primerler tasarlayarak PCR kurulduğunda lipaz enzimini kodlayan dizi bilgisi elde edilebilir. Ayrıca elde edilen bu PCR ürünü uygun bir klonlama vektörüne aktarılabilir. Burada daha etkili bir yöntem olduğu için yapışkan uçlu klonlama gerçekleştirilebilir (Sambrook ve Russell, 2001). İndüklenecek kopya sayısı arttırılan insert DNA daha sonra uygun bir ekspresyon vektörüne aktarılabilir. Benzer bir çalışma Cote ve ark. (2008a) tarafından yapılmıştır. Çalışmada *Streptomyces coelicolor* A3(2) lipaz geni için primerler tasarlanmış ve genomik DNA'dan PCR kurulmuştur. PCR ürünü seçilen restriksiyon enzimleriyle kesilerek yapışkan uçlu klonlama için hazırlanmıştır ve pIAF933 vektörüyle ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Konak hücre olarak *S. lividans* kullanılmıştır. Sonuçta iki farklı lipaz enzimi karakterize edilmiştir.

Lipaz enziminin klonlanması ile ilgili yapılan birçok çalışma metagenomik yaklaşımla yapılmıştır. Örneğin Couto ve ark. (2010) mangrov sedimentlerinden metagenomik DNA kütüphanesi kurmuşlar ve bu kütüphaneden 283 amino asit

uzunluğunda ve 32 kDa moleküler ağırlığında LipA'ya % 52 benzerlik gösteren bir lipaz izole etmişlerdir. Lipaz enziminin metagenomik yaklaşımla klonlanmasına örnek verilebilecek bir başka çalışma Zuo ve ark. (2010) tarafından atık yağlarla kontamine olmuş toprak örneği kullanılarak yapılmıştır. Atık yağlarla kontamine toprak örneğinden metagenomik DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA *Sau3AI* enzimi ile kesilmiştir. Elde edilen büyük DNA fragmentleri pMD18 plazmitine klonlanmıştır. *E.coli*'de ekspres edilen lipaz geni 1845 baz çiftlik açık okuma çerçevesine sahiptir ve 615 amino asit uzunluğundadır. *Pseudomonas chlororaphis* ve *Serratia* lipazlarına benzerlik göstermektedir. Benzer bir çalışma Cote ve Shareck (2010b) tarafından gerçekleştirilmiştir. 50-70°C sıcaklık aralığında olan ve alkali pH'a (7-8,5) sahip fed-batch biyoreaktörden metagenomik DNA kütüphanesi kurulmuş ve yedi lipolitik gen izole edilmiştir. Yedi gen arasından lipIAF1-6 seçilmiş ve *Streptomyces lividans*'a klonlanmıştır. Lipazın optimum pH'ı 8,5, sıcaklığı ise 60°C'dir. Veritabanındaki diğer lipazlarla gösterdiği homoloji % 31'i geçmediğinden yeni bir lipaz sayılabilir ve termostabil özelliğinden ötürü ise biyoteknolojik uygulamalarda kullanılma potansiyeline sahiptir. Fed-batch biyoreaktörden metagenomik DNA kütüphanesi kurulan başka bir çalışma Meilleur ve ark. (2009) tarafından yapılmıştır. İzole edilen lipaz 908 bp'lik açık okuma çerçevesi tarafından kodlanır ve 308 amino asit uzunluğunda ve 32,6 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. Veritabanındaki diğer lipazlarla gösterdiği homoloji % 52'yi geçmediği için yeni lipazdır. Optimum pH'ı 10,5 olan enzim endüstriyel kullanım açısından önemlidir.

Metagenomik yaklaşım ile yapılan çalışmalarda bir çevresel örnekten belirlenen bir DNA ekstraksiyon yöntemi ile DNA ekstrakte edilir. Elde edilen metagenomik DNA fonksiyonel ya da dizi tabanlı araştırmalarda kullanılır. Bu yaklaşımda saf kültür çalışmalarındaki gibi kültüre etme teknikleri kullanılmamaktadır. Standart kültür teknikleri ile bir çevresel örnekteki mikrobiyal çeşitliliğin % 1'inden azının ortaya çıkarıldığı düşünüldüğünde kültüre edilemeyen mikroorganizmalar ve onların biyoaktif moleküllerinin keşfinde metagenomik çalışmalarının önemi ortaya çıkmaktadır (Riesenfeld ve ark., 2004). Ancak metagenomik DNA'nın klonlanması ile saf kültürden elde edilen genomik

DNA'nın klonlanması karşılaştırıldığında metagenomik DNA'nın klonlanması daha karmaşıktır. Komünite üyelerini eşit derecede temsil edilmediğinden küçük kapsamlı bir kütüphane sadece baskın olan türlerin genomlarıyla oluşacaktır. Bunu engellemek ve daha az temsil edilen türlerin de genomlarını klonlayabilmek için elde edilecek metagenomik kütüphanenin büyüklüğü metagenomun birkaç katı olmalıdır (Riesenfeld ve ark., 2004). Bu da anlamlı bir veriye ulaşmak için birçok klonun ve dizinin incelenmesini gerektirmektedir. Saf kültürden elde edilen genomik DNA'nın klonlanmasında ise tek bir organizmanın genomik DNA'sı kullanıldığından o genomu temsil edecek klon sayısı daha azdır.

Sonuç olarak:

- 1) Çeşitli toprak örneklerinden izole edilmiş aktinomiset izolatlarının kültürel ortamda lipaz aktiviteleri derin difüzyon yöntemi ile incelenmiştir.
- 2) En yüksek lipaz aktivitesini gösteren aktinomiset izolatının 16S rRNA gen bölgesine dayalı moleküler identifikasyonu yapılmıştır.
- 3) Aynı izolatın genomik DNA kütüphanesi oluşturulmuştur.

Elde edilen veri, bilgi ve tecrübeler ışığında planlanabilecek ileriki çalışmalar ise şöyle sıralanabilir:

- 1) Çalışmada elde edilen klonların lipaz aktivitesi yönünden aktif olmamaları gen bölgesinden fragmentler taşımadığını anlamına gelmemektedir. Bunu gösterebilmek için veri tabanındaki benzer aktinomisetlerin lipaz genlerinin dikey hizalanması ile korunmuş bölgelerden primerler tasarlanabilir. Bu primerler ile gerçekleştirilecek PCR sonucu elde edilecek ürünün dizi analizi yapılabilir ve veritabanındaki kayıtlarla benzerliği araştırılabilir.
- 2) Çalışmada elde edilen genomik DNA kütüphanesinin antibiyotik ve diğer enzimler gibi biyoaktif moleküller açısından taranmalıdır. Aktinomisetlerin ürettikleri biyoaktif moleküllerin biyoteknoloji ve endüstrideki kullanımı düşünüldüğünde genomik DNA kütüphanesinin taranması önemlidir. Bunun için izlenebilecek yol ise aranan gen bölgesine uygun primerlerin tasarlanması ve elde edilen klonların taşıdığı plazmid ile PCR reaksiyonu gerçekleştirmektir. Diğer bir

yöntem olarak spesifik prob dizaynı ile hibridizasyon yöntemi düşünülebilir.

- 3) Elde edilen klonların diğer enzimleri üretme yeteneği kültürel ortamda incelenebilir. Aktivite gösteren klonlardan alt klonlamalar yapılarak rekombinant enzim üretme çalışmaları yapılabilir.
- 4) Aktinomisetlerin antibiyotik üretme yetenekleri göz önüne alınarak klonların kültürel ortamda çeşitli patojenlere karşı direnci, plazmit içermeyen konakçı hücre kontrol olarak kullanılarak incelenebilir.
- 5) Biyokimyasal yöntemlerle lipolitik aktivite gösteren peptid ya da proteinin birincil dizilimi belirlenebilir. N-terminal bölge yardımıyla primer tasarlanabilir.

5. KAYNAKLAR

- Anonim (2003), "CopyControl™ Cloning Systems Allow Single-Copy Cloning, Then Controlled Induction for High-Copy DNA Production," *Epicentre Forum*, **10**: 2.
- Bajpai, P. (1999), "Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry," *Biotechnol. Prog.*, **15**: 147-157.
- Boyd, R.F. (1988), "*General microbiology*," Mosby College Pub.
- Cardenas, F., Alvarez, E., De Castro-Alvarez, M.S., Shchez-Montero, J.M., Elson, S., Sinisterra, J.V. (2001), "Three New Lipases From Actinomycetes And Their Use In Organic Reactions," *Biocatalysis and Biotransformation*, **19**: 315-329.
- Cote, A., Shareck, F. (2008a), "Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2)," *Enzyme and Microbial Technology* **42**: 381–388.
- Cote, A., Shareck, F. (2010b), "Expression and characterization of a novel heterologous moderately thermostable lipase derived from metagenomics in *Streptomyces lividans*," *Journal of Industrial Microbial Biotechnology*, **37**:883-891.
- Couto, G. H., Glogauer, A., Faoro, H., Chubatsu, L. S., Souza, E. M., Pedrosa, F. O. (2010), "Isolation of a Novel Lipase From a Metagenomic Library Derived From Mangrove Sediment From The South Brazilian Coast," *Genetics and Molecular Research*, **9** (1): 514-523.
- Çengel, M. (2006), "*Toprak mikrobiyolojisi*," Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:558, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, İzmir.
- Dai, S., Ouyang, Y., Wang, G., Li, X. (2011), "*Streptomyces autolyticus* JX-47 Large-Insert Bacterial Artificial Chromosome Library Construction and Identification of Clones Covering Geldanamycin Biosynthesis Gene Cluster," *Current Microbiology*, **63**:68–74.
- Dannert, C. S. (1999), "Recombinant Microbial Lipases for Biotechnological Applications," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **7**: 2123-2130.

- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004), "Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties". *Applied Microbial Biotechnology*, **64**: 763–781.
- Gupta, R., Rathi, P., Bradoo, S. (2003), "Lipase Mediated Upgradation of Dietary Fats and Oils, " *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **43** (6): 635–644.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. (2006a), "Industrial Applications of Microbial Lipases, " *Enzyme and Microbial Technology*, **39**: 235-251.
- Hasan F., Shah, A. A., Javed, S., Hameed, A. (2010b), "Enzymes used in detergents: Lipases, " *African Journal of Biotechnology*, **9** (31): 4836-4844.
- Henne, A., Schmitz, R. A., BoMeke, M., Gottschalk, G., Rolf, D. (2000), "Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (7): 3113–3116.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. (2004), "Lipases and Their Industrial Applications," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **118**.
- Joneja, A., Huang, X. (2009), "A device for automated hydrodynamic shearing of genomic DNA, " *NIH Public Access Author Manuscript*, **46** (7): 553–556.
- Kim, H. R., Song, W. S. (2006), "Lipase Treatment of Polyester Fabrics, " *Fibers and Polymers*, **7** (4): 339-343.
- Ko, W.H., Wang, I. T., Ann, P. J. (2005), "A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils, " *Soil Biology & Biochemistry*, **37**: 597–599.
- Madigan, M.T., Martinko, M.M. (2009), "*Brock Biology of Microorganisms*," Twelfth Edition, Pearson Education 378-379.
- Meilleur, C., Hupe, J. F., Juteau, P., Shareck, F. (2009), "Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library, " *Journal of Industrial Microbial Biotechnology*, **36**:853–861.
- Ning, L., Yang, P., Wang, Y., Luo, H., Meng, K., Wu, N., Fan, Y., Yaol, B. (2008), "Cloning, Expression, and Characterization of Protease-resistant

- Xylanase from *Streptomyces fradiae* var. k11, ” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18** (3), 410–416.
- Polti M. A., García, R. O., Amoroso, M. J., Abate, C. M. (2009), “Bioremediation of chromium(VI) contaminated soil by *Streptomyces* sp. MC1,” *Journal of Basic Microbiology*, **49**: 285–292.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke H., Leser M. E., Miller, R. (2009), “Lipases at interfaces: A review,” *Advances in Colloid and Interface Science*, 147–148, 237–250.
- Ribeiro, D. B., Castro, A. M., Coelho, M. A. Z., Freire, D. M. G. (2011), “Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production,” *Enzyme Research*, 2011.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P. D., Handelsman, J. (2004), “Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities,” *Annual Reviews*, **38**:525–52.
- Salleh, A. B., Zaliha, R. N., Rahman, R. A., Basri, M. (2006), “*New Lipases and Proteases*,” Nova Science Publishers, Inc. New York, U.S.A.
- Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha., A. (2011), “Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview,” *Research Journal of Microbiology*, **6** (1): 1-24.
- Schmid, R. D., Verger R. (1998), “Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**: 1608-1633
- Sharma, D., Sharma, B., Shukla, A. K. (2011), “Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review,” *Asian Network for Scientific Information*, **1**: 23-40.
- Sharma, A, D., Singh, J. (2004), “A Nonenzymatic Method to Isolate Genomic DNA From Bacteria and Actinomycete,” *Analytical Biochemistry*, **337**: 354–356.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. (2001), “Research review paper; Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases,” *Biotechnology Advances*, **19**: 627-662.
- Singh, A. K., Mukhopadhyay, M. (2012), “Overview of Fungal Lipase: A Review,” *Applied Biochemical Biotechnology*, **166**: 486–520.

- Sommer, P., Bormann, C., Götz, F. (1997), "Genetic and Biochemical Characterization of a New Extracellular Lipase from *Streptomyces cinnamomeus*," *Applied and Environmental Microbiology*, 3553–3560.
- Sözen, E., Yıldırım, A., Arslanyolu, M., Parmaksız, İ. "Rekombinant DNA Teknolojisi," *Moleküler Biyoloji* (Ed: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B.) Nobel, 2007.
- Stumpp, T., Himbert, S., Altenbuchner, J. (2005), "Cloning of the netropsin resistance genes from *Streptomyces flavopersicus* NRRL 2820," *Journal of Basic Microbiology*, **45**: 355–362.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F. (2010), "Biodiesel production with immobilized lipase: A review," *Biotechnology Advances*, **28**: 628-634.
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M. A., Luccio, M. D., Oliveira, J. V. (2010), "A Review on Microbial Lipases Production," *Food Bioprocess Technology*, **3**:182–196.
- Vujaklija, D., Schröder, W., Abramić, M., Zou, P., Lešćić, I., Franke, P., Pigac, J. (2002), "A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene," *Arch Microbiol* **178**:124–130.
- Waksman, S. A. (1959), "*The Actinomycetes Vol. 1 Nature, Occurrence and Activities*," Waverly Press, Inc., Baltimore 2, Md., U.S.A.
- Zhang, Y., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Shi, P., Wu, N., Fan, Y., Li, J., Yao, B. (2008), "A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11," *Enzyme and Microbial Technology*, **42**: 346–352.
- <http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html> Erişim Tarihi 10.05.2011.