

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Geobacillus stearothermophilus TRIAÇİLGLİSEROL LİPAZININ (GstLipC)
KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN ARTIRILMASI İLE BİYOLOJİK
İNDİKATÖRÜN İYİLEŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Arife KAÇIRAN

HAZİRAN 2025
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Geobacillus stearothermophilus TRIAÇİLGLİSEROL LİPAZININ (GstLipC)
KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN ARTIRILMASI İLE BİYOLOJİK
İNDİKATÖRÜN İYİLEŞTİRİLMESİ

Arife KAÇIRAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"DOKTOR (BİYOTEKNOLOJİ)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21 / 05 / 2025

Tezin Savunma Tarihi : 23 / 06 / 2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Trabzon 2025

ÖNSÖZ

“*Geobacillus stearothermophilus* triaçilgliserol lipazının (GstLipC) katalitik etkinliğinin artırılması ile biyolojik indikatörün iyileştirilmesi” başlıklı doktora tezi, 119C076 numaralı TÜBİTAK 2244-Sanayi Doktora programı kapsamında desteklenmiştir.

Bu doktora tezi sürecinde danışmanlığımı üstlenen, bilgi, deneyim ve fikirleriyle çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e en içten teşekkürlerimi sunarım. Tezimin farklı aşamalarında değerli katkılarda bulunan, sayın Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI ve Prof. Dr. Kadriye İNAN’a içten teşekkür ederim. Biyoinformatik alanındaki bilgi birikimimi borçlu olduğum sayın Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’e de gönülden teşekkür ederim. Doktora sürecimde, danışmanımdan sonra bana en büyük desteği veren; bilgi, fikir ve tecrübelerini cömertçe paylaşan, çalışmalarımın ilerlemesine büyük katkılarda bulunan ve manevi olarak her zaman yanımda olan sayın Dr. Miray ŞAHİNKAYA, Dr. Öğretim Üyesi Fulya AY ve Dr. Öğretim Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK’a özel olarak teşekkür ederim.

Zor zamanlarımda yanımda olan ve desteğini esirgemeyen başta Ayşe Nur AKMEHMET olmak üzere, Gamze ÇUBUKCI, Süleyman HEKİM ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim. Eryiğit Tıbbi Cihazlar A.Ş. bünyesinde yürüttüğüm çalışmalar sırasında desteğini her zaman hissettiren sayın Dr. Büşra MAMMADOV başta olmak üzere, sayın Doç. Dr. Beyhan CENGİZ, Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR ve tüm Ar-Ge ekibine teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca 2244-Sanayi Doktora programı kapsamında maddi destek sağlayan TUBİTAK kurumuna ve Eryiğit Tıbbi Cihazlar A.Ş firması genel müdürü sayın Halit Eryiğit’e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bana her zaman maddi ve manevi destek veren, zor anlarımda yanımda olup güç veren, varlıklarıyla bana cesaret veren kıymetli aileme ve dostlarıma minnet ve şükranlarımı sunarım.

Arife KAÇIRAN

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Geobacillus stearothermophilus* triaçilgliserol lipazının (GstLipC) katalitik etkinliğinin artırılması ile biyolojik indikatörün iyileştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 23/06/2025

Arife KAÇIRAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1-1
1.1. Giriş.....	1-1
1.2. Bakterilerde Sporulasyon	1
1.2.1. Sporların Sigma Faktörleri Tarafından Regülasyonu	4
1.3. Sporların Yapısı ve Spor Direnç Mekanizmaları	10
1.4. Germinasyon	13
1.4.1. Germinantlar	14
1.4.2. Spor Germinasyon Aşamasında Rol Alan Proteinler.....	15
1.4.3. LipC (YcsK), Spor Germinasyon Lipazı	17
1.5. Biyolojik İndikatörler	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1. Materyaller	24
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler	24
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri	25
2.1.3. Kullanılan Bakteriler ve Vektörler.....	25
2.2. Biyoinformatik Analizler	25
2.3. Klonlama Çalışmaları.....	27
2.3.1. <i>gstLipC</i> Geni için Primerlerin Tasarlanması.....	27
2.3.2. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 'un Genomik DNA İzolasyonu.....	27
2.3.3. <i>gstLipC</i> 'nin PCR ile Çoğaltılması.....	28
2.3.4. <i>gstLipC</i> 'nin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması	28
2.3.5. Kompetent <i>E. coli</i> DH10β Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon	29

2.3.6.	Rekombinant Plazmitlerin Koloni PCR ile Teyit Edilmesi ve İzolasyonu	30
2.3.7.	<i>gstLipC</i> 'nin pJET1.2/blunt Vektöründen Ekspresyon Vektörü pET28a(+)'ya Aktarılması	31
2.4.	Mutasyon İçin Docking (Yerleştirme) Analizi.....	31
2.4.1.	Protein Homolojisi ve Moleküler Docking (Yerleştirme)	31
2.4.2.	GstLipC Nokta Mutasyonu İşlemi	33
2.5.	Ekspresyon ve Saflaştırma Çalışmaları	34
2.5.1.	<i>gstLipC</i> Genlerinin Ekspresyonu	34
2.5.2.	SDS-PAGE ve Zimogram Analizi	35
2.5.3.	GstLipC'nin Saflaştırılması	35
2.5.4.	Bradford Yöntemiyle Protein Konsantrasyon Tayini	36
2.6.	Yaban Tip ve Mutant Enzimlerin Karakterizasyonu.....	37
2.6.1.	Optimum Sıcaklık	37
2.6.2.	Optimum pH	37
2.6.3.	Enzim Kinetiği	37
2.6.4.	Termal Kararlılık.....	37
2.6.5.	Metal İyon Etkisi.....	38
2.6.6.	Deterjanların, İnhibitörlerin ve Organik Çözücülerin Etkileri.....	38
2.7.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 'a Gen Entegrasyonu.....	38
2.7.1.	Elektroporasyon ile Transformasyon	39
2.7.2.	Doğal Transformasyon.....	39
2.7.3.	Homolog Rekombinasyon.....	39
2.8.	Rekombinant pNW33N_LipCmut Genlerinin <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 'ta Ekspresyonu	40
2.9.	Sporulasyon Çalışmaları.....	41
2.9.1.	Endospor Üretimi	41
2.9.2.	Spor Boyama.....	41
2.9.3.	Sporların Saflaştırılması.....	42
2.10.	Germinasyon Çalışmaları	43
2.11.	Biyolojik İndikatörlerin Hazırlanması.....	43
3.	BULGULAR.....	44
3.1.	Biyoinformatik Analizler	44
3.2.	Klonlama Çalışmaları.....	47
3.2.1.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 'tan Genomik DNA İzolasyonu	47

3.2.2.	<i>gstLipC</i> Geninin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması	47
3.2.3.	<i>gstLipC</i> Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	48
3.3.	Mutasyon Çalışmaları.....	50
3.3.1.	Protein Homolojisi ve Moleküler Docking	50
3.3.2.	<i>GstLipC</i> Geninde Mutasyon Oluşturulması.....	55
3.4.	Ekspresyon Çalışmaları.....	56
3.4.1.	Yaban tip ve Mutant Enzimlerin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	56
3.5.	Yaban Tip ve Mutant Enzimlerin Karakterizasyon Çalışmaları	61
3.5.1.	Optimum Sıcaklık ve Optimum pH	61
3.5.2.	Termal Kararlılık.....	62
3.5.3.	Metal İyon Etkisi.....	64
3.5.4.	Deterjanların, İnhibitörlerin ve Organik Çözücülerin Etkileri.....	65
3.5.5.	Kinetik Çalışmalar	68
3.6.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 'a Gen Entegrasyonu.....	70
3.7.	Rekombinant pNW33N plazmitinin <i>Geobacillus stearothermophilus</i> içinde ekspresyon çalışmaları.....	73
3.8.	Sporulasyon Çalışmaları.....	76
3.8.1.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 'tan Endospor Üretimi ve Malaşit Yeşili Boyama Metodu	76
3.9.	Germinasyon Çalışmaları	77
3.10.	Biyolojik İndikatör Çalışmaları.....	79
4.	TARTIŞMA	85
5.	SONUÇLAR.....	102
6.	ÖNERİLER.....	105
7.	KAYNAKLAR	106
8.	EKLER.....	121
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

Geobacillus stearothermophilus TRIAÇİLGLİSEROL LİPAZININ (GstLipC) KATALİTİK ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI İLE BİYOLOJİK İNDİKATÖRÜN İYİLEŞTİRİLMESİ

Arife KAÇIRAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2025, 120 Sayfa, 5 Sayfa Ek

Geobacillus stearothermophilus sporları, yüksek sıcaklığa karşı dirençli olup, sterilizasyon süreçlerinde biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. Söz konusu sporların çimlenmesi, enzimlerin sıralı aktivasyonu ile ilerleyen yüksek derecede düzenlenmiş bir biyolojik süreçtir ve bu süreçte çeşitli proteinlerin önemli işlevler üstlendiği bilinmektedir.

Bu çalışmada, *Geobacillus stearothermophilus*'ta bulunan ve spor germinasyon sürecinde kritik role sahip olan GDSL ailesi lipazının karakterizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen bu enzim üzerinde biyoinformatik çalışmalar ile dört farklı mutasyon çalışması yapıldı ve yaban tip GDSL lipazı ile kıyaslandı. Mutant enzimler pNW33N plazmitine klonlanarak *Geobacillus stearothermophilus*'a transformasyonu gerçekleştirildi. Devamında yaban tip ve rekombinant plazmiti bulunduran *Geobacillus stearothermophilus* için sporulasyon ve germinasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Germinasyon kinetiği, OD600 absorbans değişimi üzerinden spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Elde edilen bulgular, hem yaban tip hem de mutant GDSL lipazların karakterize edildiğini ve mutasyonların enzimin Km değerinde anlamlı değişimlere yol açtığını gösterdi. Ayrıca, yaban tip ve mutant sporların germinasyon süreçleri arasında belirgin farklılıklar gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: *Geobacillus stearothermophilus*, sporulasyon, germinasyon, GDSL lipazı

PhD. Thesis

SUMMARY

IMPROVEMENT OF BIOLOGICAL INDICATOR BY INCREASING THE CATALYTIC EFFICIENCY OF *Geobacillus stearothermophilus* TRIACYLGLYCEROL LIPASE (GstLipC)

Arife KAÇIRAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biotechnology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2023, 120 Pages, 5 Pages Appendix

Geobacillus stearothermophilus spores are highly resistant to extreme temperatures, making them valuable bioindicators in sterilization processes. Spore germination is a highly regulated process initiated by the sequential activation of specific enzymes, with various proteins known to play critical roles in this mechanism.

In this study, a GDSL family lipase from *Geobacillus stearothermophilus*, implicated in spore germination, was functionally characterized. Four site-directed mutations were introduced into the enzyme based on bioinformatics analysis, and the mutant variants were compared with the wild-type enzyme. The mutant lipase genes were cloned into the pNW33N plasmid and transformed into *Geobacillus stearothermophilus*. Sporulation and germination assays were performed on both wild-type and recombinant strains. Germination kinetics were quantitatively assessed using spectrophotometric measurements of OD₆₀₀.

The obtained results showed that both the wild-type and mutant GDSL lipases were successfully characterized, and the mutations led to measurable changes in the K_m values of the enzyme. In addition, observable differences were detected between the germination processes of wild-type and mutant spores.

Key Words: *Geobacillus stearothermophilus*, sporulation, germination, GDSL lipase

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Endospor oluşturan bakteriler tarafından sporların oluşumu.....	2
Şekil 2. Korunmuş sporulasyona özgü sigma faktörleri	9
Şekil 3. Sporun genel yapısı.....	10
Şekil 4. Spor germinasyon süreci.....	13
Şekil 5. <i>B. subtilis</i> LipC ile lipolitik enzimlerin GDSL ailesinin üyeleri arasındaki dizi analizi	18
Şekil 6. Sporun kabuk (coat) kısmında yer alan proteinler.....	19
Şekil 7. <i>lipC</i> geninin düzenlenmesinde rol alan faktörler.....	20
Şekil 8. Biyoindikatörün çalışma prensibi	22
Şekil 9. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ’ta bulunan GDSL ailesi lipazının NLM CCD veritabanında analizi sonucu	44
Şekil 10. Farklı suşlarda bulunan GDSL lipazlarının Clustal Omega’da hizalanması.....	46
Şekil 11. <i>gstLipC</i> genine yönelik PCR sonucu	47
Şekil 12. pJET1.2_ <i>gstLipC</i> klonlama çalışması koloni PCR fragmentleri	48
Şekil 13. <i>gstLipC</i> ve pET28a(+) ekspresyon vektörünün restriksiyon enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüleri	49
Şekil 14. pET28_ <i>gstLipC</i> rekombinant plazmitinin <i>E.coli</i> DH10 β kompetent hücrelerine transformasyonu sonucunda oluşan kolonilerden elde edilen koloni PCR ürünleri. Marker olarak, NEB 1 kb DNA ladder kullanıldı.	49
Şekil 15. SignalP 5.0 ile <i>GstLipC</i> sinyal peptit tahmini	50
Şekil 16. <i>GstLipC</i> ’nin 3D görüntüsü (Swiss-Model).....	51
Şekil 17. <i>GstLipC</i> 3D model analizleri (ProsA) A: <i>GstLipC</i> ’nin Z-skor grafiği, B; amino asitlerin enerji puanı grafiği	51
Şekil 18. <i>GstLipC</i> ’nin aktif ve stabilitede etkili bölgelerinin gösterimi	52
Şekil 19. <i>GstLipC</i> ve mutant proteinlerin DyneMine programı ile analizleri	54
Şekil 20. <i>GstLipC</i> ’nin mutasyon uygulanan pozisyonlarının genel gösterimi	55
Şekil 21. <i>GstLipC</i> ’nin 3D yapısı ve mutasyon uygulanan bölgelerin PyMOL programının sonuç görüntüleri.....	55
Şekil 22. Farklı <i>GstLipC</i> mutasyonlarının PCR ürünlerine ait jel elektroforez görüntüsü	56
Şekil 23. <i>GstLipC</i> ve mutant ekspresyonların SDS-PAGE görüntüleri	57
Şekil 24. DTT kullanılarak gerçekleştirilen ekspresyonların SDS-PAGE görüntüsü	58

Şekil 25.	GstLipC ve mutant enzimlerin saflaştırılması çalışmalarının SDS-PAGE görüntüleri	59
Şekil 26.	Saflaştırılmış GtsLipC1 ve mutant enzimlerin aktivite görüntüleri	60
Şekil 27.	Ticari ve mutant GstLipC enzimlerin zimogram analizi sonucu.....	60
Şekil 28.	GstLipC ve mutant enzimlerin optimum sıcaklık ve pH grafikleri	61
Şekil 29.	GstLipC ve mutant enzimlerin termal stabilite grafikleri.....	63
Şekil 30.	1 mM metal tuzlarının yaban tip ve mutant enzimlerin üzerindeki etkisi	64
Şekil 31.	5 mM metal tuzlarının yaban tip ve mutant enzimlerin üzerindeki etkisi	65
Şekil 32.	Deterjanların GstLipC ve mutant enzimler üzerindeki etki grafikleri.....	66
Şekil 33.	İnhibitörlerin GstLipC ve mutantları üzerindeki etkisi	66
Şekil 34.	%5 oranında organik çözücülerin GstLipC ve mutantları üzerindeki etki grafikleri	67
Şekil 35.	%10 organik çözücülerin GstLipC ve mutantları üzerindeki etki grafikleri	67
Şekil 36.	0,1 mM Triton™ X-100 varlığında GstLipC ve Mutant enzimlerin Lineweaver-Burk grafiği	69
Şekil 37.	1 mM imidazol varlığında GstLipC ve Mutant enzimlerin Lineweaver-Burk grafiği.....	69
Şekil 38.	Homolog rekombinasyon sonrası hazırlanan replica plate örnekleri	70
Şekil 39.	qPCR sonuçları	71
Şekil 40.	Homolog rekombinasyon çalışması qPCR sonuçları	72
Şekil 41.	Yaban tip ve mutant GstLipC'lerin <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 'ta ekspresyon sonucunun SDS- PAGE görüntüleri	74
Şekil 42.	Yaban tip ve mutant GstLipC'lerin <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 'ta ekspresyon sonucunun SDS-PAGE görüntüleri	74
Şekil 43.	Yaban ve rekombinant <i>Geobacillus stearothermophilus</i> /pNW33N_gstLipC (I184H, I184V, R196L, R196F) pNPP substratına karşı aktivitesi.....	75
Şekil 44.	Sporların malaşit yeşili ile boyama görüntüsü.....	76
Şekil 45.	Sporların çimlenmesi aşamasında alınan ölçümler.....	77
Şekil 46.	Sporların çimlenmesi sürecinde OD ₆₀₀ nm ve OD ₄₀₅ nm absorbans değerleri	78
Şekil 47.	Sporların çimlenmesi sürecinde OD ₆₀₀ nm absorbans değerinin grafiksel olarak gösterimi	78
Şekil 48.	Sporların farklı biyolojik indikatörler içine yerleştirilmiş görüntüsü.....	79
Şekil 49.	Farklı spor konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyolojik indikatörlerin sonuçlarının gösterimi.....	80

Şekil 50.	Laboratuvarda hazırlanan biyolojik indikatörlerin renk değişimin gösterimi	81
Şekil 51.	Biyolojik indikatörün OD ₆₀₀ ve OD ₄₀₅ nm’de aktivite sürecinin değişim grafiği.....	82
Şekil 52.	Lister marka biyolojik indikatör kullanılarak hazırlanan indikatörler.....	83



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Bacillus subtilis</i> sporulasyonunda görev alan sigma faktörlerinin (Sig) listesi ve fonksiyonları.....	6
Tablo 2. Sporun yapısını oluşturan katmanların görevleri	11
Tablo 3. Spor Direnç Mekanizmaları.....	12
Tablo 4. Germinantlar ve etkileri.....	14
Tablo 5. Spor germinasyonunda görev alan temel proteinler	16
Tablo 6. LipC enzimleri için tasarlanan primerler.....	27
Tablo 7. Taq DNA polimeraz için önerilen PCR karışımı.....	28
Tablo 8. DNA fragmenti uçlarının küt uç haline getirilmesi	29
Tablo 9. Ligasyon reaksiyonu.....	29
Tablo 10. Koloni PCR reaksiyon karışımı	30
Tablo 11. pET28a (+) ligasyon karışımı	31
Tablo 12. GstLipC enzimi üzerinde nokta mutasyonu için tasarlanan primerler	33
Tablo 13. Mutasyon çalışması için gerçekleştirilen PCR reaksiyonun koşulları.....	33
Tablo 14. Ekspresyon optimizasyonu için çalışılan koşullar	34
Tablo 15. Saflaştırma işlemi için kullanılan tamponlar ve içerikleri.....	36
Tablo 16. pNW33N plazmiti klonlama çalışmaları için tasarlanan primerler	38
Tablo 17. Homolog rekombinasyon taramaları için kullanılan TaqMan Problar	40
Tablo 18. Ekspresyon optimizasyonu için çalışılan koşullar	41
Tablo 19. GstLipC'nin mutasyon noktaları ve bağlanma enerjileri.....	53
Tablo 20. GstLipC ve mutant enzimlerin kinetik değerleri	68
Tablo 21. Biyolojik indikatörlerin ilk 2'dakika florometrik değerleri.....	84
Tablo 22. Triton™ X-100 varlığında GDSL lipazlarının pNPP substratına karşı aktiviteleri	95

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
σ	: Sigma
$^{\circ}\text{C}$	: Derece
ϵ :	: Epsilon
g	: Gram
<i>gstLipC</i>	: <i>Geobacillus stearothermophilus</i> GDSL lipaz geni
GstLipC	: <i>Geobacillus stearothermophilus</i> GDSL lipazı
GR	: Germinasyon Reseptörü (sporda spesifik ligand bağlanma bölgeleri)
BSA	: Bovin Serum Albumin
bp	: Baz çifti
HCN	: Hidrosiyanik asit
Da	: Dalton
dakika	: Dakika
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
kDa	: Kilo Dalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
amp	: Ampisilin
<i>kan</i>	: Kanamisin
L	: Litre
LB	: Luria Bertani Broth
mA	: Milliamper
mg	: Milligram
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
nmol	: Nanomol
μmol	: Mikromol

mmol	: Milimol
nM	: Nanomolar
μ M	: Mikromolar
mM	: Milimolar
M	: Molar
nm	: Nanometre
μ m	: Mikrometre
sn	: Saniye
U	: Ünite
v/v	: Hacimce yüzde
V max	: Maksimum hız
Ca-DPA	: Kalsiyom-Dipiklonik asit
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
KCl	: Potasyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
CoCl ₂	: Kobalt (II) klorür
MnCl ₂	: Mangan (II) klorür
HgCl ₂	: Cıva (II) klorür
NiCl ₂	: Nikel (II) klorür
CoCl ₂	: Kobalt (II) klorür
FeSO ₄	: Demir (II) sülfat
CuSO ₄	: Bakır (II) sülfat
GuHCl	: Guanidyum klorit
HCl	: Hidrojen klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
pNPP	: p-nitrofenil palmitat
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
sASP'ler	: Küçük asitte çözünür spor proteinleri
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroföresi
Tween® 20	: Polioksietilen (20) sorbitan monolaurat

Triton™ X-100	: 2-[4-(2,4,4-trimetilpentan-2-yl)fenoksi]etanol
EGTA	: Etilen glikol-bis(β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
DTT	: Dithiothreitol
β -me	: β -merkaptetanol
ACN	: Asetonitril
DMSO	: Dimetil sülfoksit Na ₂ HPO ₄ : Sodyum fosfat
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
ddH ₂ O	: Çift distile su
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
T _m	: Erime Sıcaklığı
<i>lacZα</i>	: Beta- galaktosidazın α domaininin geni
OD	: Optik Yoğunluk
UV	: Ultraviyole
IPTG	: Isopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
NCBI	: National Centre for Biotechnology Information
His, H	: Histidin
Cys, C	: Sistein
Asp, D	: Aspartik asit
Glu, E	: Glutamik asit
Arg, R	: Arjinin
Phe, F	: Fenilalanin

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bazı canlılar mekanik güç uygulayarak hayatta kalmayı başarırken bazıları ise salgıladıkları kimyasallar yardımı ile hayatta kalmayı başarır. Canlıların hayatta kalma mücadelelerinden en çok dikkat çeken ise bakteriler gibi mikroskobik canlıların binlerce yıl hayatta kalmalarını sağlayabilen spor oluşum mekanizmasıdır. Birçok biyolojik süreç gibi spor oluşumuna da hücresel konumlarda bir araya getirilen çoklu protein kompleksi aracılık eder. Oluşan sporlar olumsuz koşullarda hayatta kalmak için tasarlanmış, son derece özelleşmiş, farklılaşmış hücre tipleridir (Koopman vd., 2022).

Bakteriler, yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan genetik bilgiyi oluşturdıkları bu sporlara hapsederler. Bu şekilde uygun ortam koşulları sağlandığında sporlar çimlenme işlemi ile yeniden vejetatif hücreler yani aktif olarak bölünen hücreleri oluştururlar. Sporların proteinlerden oluşan güçlü katmanları, dışarıdan gelebilecek herhangi bir tehlikeye karşı koruma görevi görür. Bunun yanında sporların doğası gereği sahip oldukları bir dizi geçirgenlik bariyeri de önemli bir savunma mekanizmasıdır. Sporların yüksek direncinden bir dizi faktör sorumlu olsa da geçirgenlik bariyerleri, birçok toksik kimyasala, özellikle de merkezi spor çekirdeğinde bulunan spor DNA'sına zarar verebilecek kimyasallara karşı düşük geçirgenlik sağlar. En dışta, tüm türlerin olmasa da bazılarının sporlarında bulunan ve çok büyük moleküllerin nüfuz etmesini önleyen ekzosporiyum bulunur (Setlow P., 2014b). İçeri doğru hareket eden ikinci geçirgenlik bariyeri, spor kaplama tabakası ve alttaki dış spor zarıdır. Bu dış zar bariyeri, daha küçük moleküllerin iç spor bölgelerine, özellikle sporların dış spor zarının hemen altındaki büyük peptidoglikan korteksine erişimini kısıtlar. Bilinen son spor geçirgenlik bariyeri de merkezi spor çekirdeğini çevreleyen iç zardır (IM). IM, sporlaşan hücrelerdekine benzer bir lipid bileşimine sahiptir, ancak sporulasyon sırasında IM'ye dâhil edilen lipid problemleri hareketsizdir. Düşük çekirdek pH'sı nedeniyle sporlarda yüksek seviyelerde birikebilen küçük bir molekül olan metilamin, spor çekirdeğine giriş hızı sudan daha düşük olduğu için

IM'nin bütünlüğünü araştırmak amacıyla sıklıkla kullanılır (Setlow B., vd., 2001). Gerçekten de IM'nin metilamine geçirgenliği çok düşüktür ve bu düşük geçirgenlik, bir kaplama ve dış zarı olmayan sporlarda bile korunur. IM sporların korunmasının yanı sıra çimlenme aşamasında da önemli rollere sahiptir. Çimlenme sırasında bu zar, suyun ve iyonların kontrollü bir şekilde salınmasını kolaylaştırarak, çekirdeğin yeniden su almasını ve metabolik olarak aktif bir hücreye dönüşmesini sağlar. Aynı zamanda IM çevresel ipuçlarını algılama ve spor çimlenmesinin başlatılmasında görev alan çimlenme proteinlerinin bulunduğu bölgedir (Bressuire-Isoard vd., 2018).

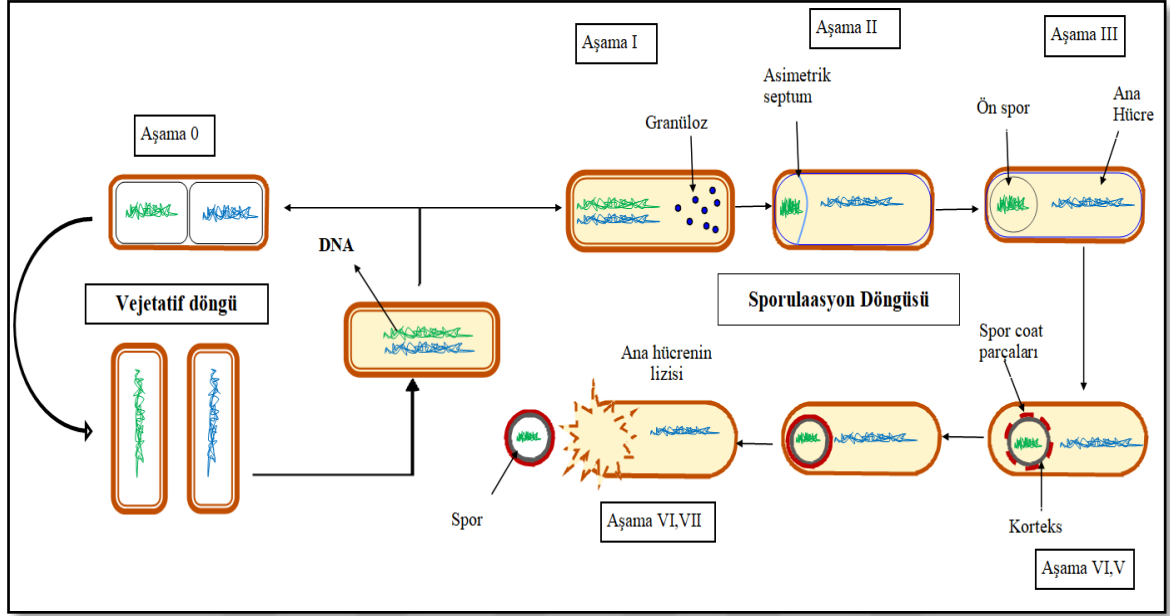
Spor çimlenmesi, protein sentezi tarafından değil, önceden var olan çimlenme ile ilgili enzimlerin sıralı aktivasyonu tarafından kontrol edilir. Spor çimlenmesinin çeşitli aşamalarında yer alan birçok reseptör benzeri proteinler (Ger ailesi proteinleri olarak tanımlanır), spor kaplama proteinleri, korteksolitik enzimler vb. gen ürünü tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Ablett vd., 1999).

1.2. Bakterilerde Sporulasyon

Bakteri sporları, olumsuz koşullarda hayatta kalmak için tasarlanmış, son derece özelleşmiş, farklılaşmış hücre tipleridir. Bakteri hücresinin içinde oluşurlar ve bu nedenle endosporlar olarak adlandırılırlar (Beskovnaya vd., 2021). Endosporlar ısıya, kurumaya, radyasyona ve dezenfektanlara dayanıklı oldukları için her türlü karasal ve sucul yaşam alanlarında bulunurlar ve çoğu diğer organizmanın yaşayamayacağı yerlerde yaşarlar (Turenne vd., 2015). Endosporların oluşumu, besinler ve nem az olduğunda gelişen, sporun hayatta kalmasını sağlayan, karmaşık, yüksek düzeyde koordineli bir süreçtir (Aertsen ve Michiels, 2004). Bununla birlikte, sporulasyon aşırı enerji tüketen bir süreç olduğundan, hücreler hafif stres koşullarında sporulasyondan kaçınır (Lulko vd., 2007). Sporulasyon birçok yazar tarafından gözden geçirilmiştir ve kapsamlı araştırmalar nedeniyle iyi karakterize edilmiş bir süreçtir.

Sporulasyon, üreme ve gelişme için elverişsiz çevresel koşulların hâkim olduğu durumlarda, bir vejetatif hücrede üremenin kısıtlanmasıyla başlar. Bu biyolojik süreç, ön spor ve ana hücre bölmesinin oluşumunu sağlar (Abecasis vd., 2013). Sporulasyonun son aşaması, ana hücrenin parçalanması ve olgun sporun salınması ile sonuçlanır. Vejetatif durumda olan bir bakteri hücresinin endospora tamamen dönüşmesi üç temel basamakta incelenebilir. İlk basamakta vejetatif hücre çevreden gelen sinyalleri algılayarak ikinci

basamakta bu algılanan sinyallerin hücre içinde ilgili bölgelere iletimi sağlanır. Son basamak ise sinyallere karşı hücrenin cevap olarak sporulasyonu başlatması ile başlar ve olgun sporların hücre dışına salınmasıyla son bulur (Devi vd 2015) (Şekil 1).



Şekil 1. Endospor oluşturan bakteriler tarafından sporların oluşumu. Olumsuz çevresel koşulları algıladıktan sonra hücreler, farklılaşma ve spor morfogenezine başlar. Puro şeklindeki yapısı ile klostridial hücre formu görülür ve granüloz veziküller birikir. Hücreler daha sonra sporulasyon sürecini başlatır ve asimetrik bölünme meydana gelir, bu da ana hücre ve spor öncesi bölmelere yol açar. Ana hücre içinde öncü sporun olgunlaşması sağlanır. Olgunlaşan spor, ana hücrenin parçalanmasıyla serbest bırakılır.

Hücrenin sinyalleri algılaması sırasında, yeterli sayıda algılayıcı peptitler (quorum sensing peptides), sülfaktin sentezinin düzenlenmesinden sorumlu bir regülatörün fosforilasyon durumunu etkileyerek potasyum sızıntısına neden olur (Shank ve Kolter, 2011). Potasyum sızıntısının saptanması üzerine membran histidin kinaz KinC aktifleşir ve Spo0F'yi fosforiller (López vd., 2009). Böylelikle hücre ikinci aşama olan sinyal iletim aşamasına girer. Bu aşamada fosfotransferaz, bir fosforil grubunu iki ara faktör yoluyla (SpoOF ve SpoOB) SpoOA'ya transfer ederek, SpoOA'nın SpoOA~P'ye dönüşmesini sağlar. Bu aşamanın sonunda oluşan SpoOA~P, endospor oluşumunun son aşaması olan sporulasyonu başlatır (Sun J., vd., 2020). Bu süreç bakteri türleri içinde farklı sürelerde gerçekleşir. Model organizma olan *Bacillus subtilis* için bu gelişim programı 8-10 saatte tamamlanır (Shank ve Kolter, 2011).

Sporulasyon, çubuk şeklindeki bakterilerde asimetrik hücre bölünmesiyle başlar ve bu süreç, genetik olarak özdeş ancak morfolojik olarak farklı iki hücresel bölmenin (ana hücre ve ön spor) oluşumuyla sonuçlanan bir “kutupsal bölünme” ile tanımlanır (Khanna vd., 2021). Her iki bölme de kısa bir süre yan yana kalır ve dış hücre duvarı tarafından bir arada tutulur. Başlangıçta düz olan kutup bölmesi daha sonra ana hücre ön sporu yuttukça kıvrılmaya başlar ve ana hücre sitozolünün içinde çift zarla çevrili, kabaca küresel bir organel olarak bulunan bir ön spor üretir. Ön spor sonunda kısmen susuz kalmış, uykuda bir hücreye dönüşür ve ana hücre programlanmış hücre lizisine uğrayarak çevreye salınır (Crawshaw vd., 2014).

Merkezi eksen boyunca iki DNA dizisi bulunan farklılaşmamış vejetatif hücrede (aşama 0-I), sporulasyon, aktive edilmiş transkripsiyon faktörü Spo0A ve sigma faktörü σ^H tarafından indüklenir. Bu iki faktör, hücreyi ana hücreye ve ön spora (evre II) ayıran asimetrik hücre septumunun gelişimini destekler (Riley vd., 2020). Ayrıca, asimetrik hücre septumu, bir DNA dizisini ön spor bölmesine tam olarak hapseder. Bu bağlamda, aktive edilmiş Spo0A~P'nin düşük seviyedeki ifadesi sporlanmayı geciktirir ve biyofilm oluşumunu destekler. Asimetrik bölme, hücreyi bölmeye özgü sigma faktörleri nedeniyle her biri genlerin diferansiyel aktivasyonuna katılan küçük ve büyük bir bölmeye ayırır (aşama II). Gelişmekte olan ön sporda σ^F , 48 genin transkripsiyonunu aktive eder. σ^F aktif olduğunda, ön sporda farklı işlevleri kolaylaştıran genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (Wang S.T., vd., 2006). σ^F tarafından düzenlenen genler, DNA bağlanması, germinant reseptörlerinin sentezi, spor korteks bileşenlerinin gelişimi, DNA onarımı ve ana hücre kompartımanı ile iletişimde yer alır. Ayrıca, σ^F faktörü, ön sporun ana hücreye girmesine aracılık eden genlerin transkripsiyonunu da yönlendirir (evre III). Bu işlemin ardından, ana hücrenin bölmesinden gelen σ^E , korteks oluşumu için gerekli olan gen ekspresyonunu kontrol eder. Bu faktör 260'dan fazla geni düzenler ve spor katmanlarının oluşumunu ve ana hücrenin metabolizmasını daha fazla etkiler (Higgins ve Dworkin, 2012). Evre IV'te ana hücre zarı, zaten sağlam bir zarla çevrili olan ön sporun etrafında büyür. Dış ve iç ön spor zarları arasında kalın bir peptidoglikan korteksin sentezi, korteks ve germ hücre duvarının (evre IV) oluşumunu başlatır (Zapun vd., 2008). Korteks oluşumu ile aynı zamanda ön spor, su ve potasyum (K^+) gibi iyonları kaybeder, bu da hacimde büyük bir azalmaya ve eş zamanlı olarak pH'da yaklaşık bir birim azalmaya neden olur. Su kaybı, tümü ana hücrede sentezlenen Ca^{2+} , Mg^{2+} veya Mn^{2+} ve piridin-2,6 dikarboksilik asit (dipikolinik asit, Ca-DPA

veya DPA) gibi katyonların alımına bir yanıttır (Paredes-Sabja vd., 2008a; Setlow, B., vd., 2008).

Sigma faktörü σ^E olgunlaşan sporda σ^G 'nin aktivasyonunu tetikler (evre IV-V). σ^E tarafından aktive edilen genler, spor korteksinin ve sporların direnç özellikleri ve çimlenme fonksiyonlarının (*ger* genleri) devam eden morfogenezisine ve ayrıca ana hücrede sporulasyon programının son sigma faktörü olan σ^K 'nin aktivasyonuna aracılık eder (Chary vd., 2005). Aşama IV-V içinde, ön spor nükleoidini bir halka halinde yeniden şekillendiren küçük asitte çözünür proteinler (SASP'ler) sentezlenir. Bu nedenle, σ^E , DNA koruması ve onarımı için gen ifadesini kontrol eder (Setlow, B., vd., 2008). Ayrıca, aşama V'de protoplast, yüksek basınca, ısıya, radyasyona ve kimyasal ajanların veya enzimlerin saldırılarına karşı giderek daha dirençli hale gelir. Bu direnç, esas olarak sporun yüksek derecede kompakt yapısından kaynaklanmaktadır (Cho ve Chung, 2020).

σ^K 'nin aracılık ettiği transkripsiyonel aktivite, spor kaplama (coat proteinleri) proteinlerinin oluşumunu, ana hücre lizisini ve spor salınımını yönlendirir. Sporlanma sırasında, ana hücreden gelen kaplama proteinleri ile kompleks proteinli bir kaplama, sporun dış yüzeyinde katmanlanır (aşama VI), bakteri sporlarının spesifik hidrofobikliğini etkiler (Wiencek vd., 1990). Bu proteinli kaplama, olası bir spor kümelenmesine neden olabilir (Mathys vd., 2007). Ana hücre parçalandıktan sonra spor serbest bırakılır (aşama VII). Oluşan sporların metabolizması yoktur ve mikroorganizmanın uzun süre boyunca ve aşırı çevre koşullarında (bazen binlerce yıl) hayatta kalmasını sağlar (Setlow, P., 2014b).

1.2.1. Sporların Sigma Faktörleri Tarafından Regülasyonu

Birçok bakteri türü, olumsuz çevre koşullarına karşı savunma mekanizması olarak sporulasyon sürecine başvurur. Sporulasyon sırasında vejetatif durumda olan bakteriler, metabolik olarak uyku durumuna geçerek spora dönüşür ve bu spordan bazıları yıllarca hayatta kalabilir. Bu dönüşüm sürecinde etkin rol oynayan sigma (σ) faktörleri, sağlam sporların oluşumunu sağlarken, sağlam olmayan sporları imha eder. Sigma faktörleri, RNA polimerazına (RNAP) bağlanıp promotör DNA'sını tanıyarak transkripsiyonun başlatılmasına yardımcı olan bakteriyel protein modülleridir (Feklistov vd., 2014). Bu bağlanma, gen transkripsiyonunun spesifik programlarına dahil olan enzimleri yönlendirir (Paget vd., 2015).

Çoğu σ faktörü, korunma derecelerine ve RNA polimeraz ile promotör DNA arasındaki etkileşimleri sağlayan korunan σ domainlerinin ($\sigma^{1.1}$, σ^2 , σ^3 ve σ^4 gibi esnek halka bölgeleriyle bağlanan) varlığına veya yokluğuna göre σ^{70} protein süper ailesine aittir ve dört sınıfa ayrılır (Paget vd., 2015). Birçok bakteri, RNAP'a bağlanmak için rekabet eden ve adaptif yanıtlar için gerekli gen kümelerinin transkripsiyonunu yönlendiren alternatif σ faktörlerine (Sınıf II, III ve IV) sahiptir (Collins vd., 2023). Ayrıca, bakteriler, belirli adaptif tepkiler için gerekli olan küçük bir gen setini transkribe etmek üzere çekirdek RNAP'ı yeniden yönlendiren alternatif sigma faktörlerine de sahiptir. Her bakteri türünde farklı sigma faktörü setleri bulunur ve bu çeşitlilik, bakterilerin ekolojik senaryolardaki değişikliklere hızlı ve geri dönüşümlü bir şekilde uyum sağlayabilmesini sağlar. Farklı bakteri cinslerinde bulunan alternatif sigma faktörlerinin sayısı, bakterinin yaşam tarzını yansıtarak bu adaptasyonu yönlendirir (Kazmierczak vd., 2005; López-Leal vd., 2016).

Sporulasyon süreci, bakterilerin olumsuz çevresel koşullara karşı hayatta kalmalarını sağlayan karmaşık bir mekanizmadır. Bu süreçte, bakteriyel hücreler metabolik olarak uyku durumuna geçerek sporlar oluştururlar. Sporulasyonun düzenlenmesinde, özellikle alternatif sigma faktörleri kritik bir rol oynar. Sporulasyonun genel süreci birçok bakteri türünde korunsa da dâhil olan belirli sigma faktörleri farklı bakteri türleri arasında önemli ölçüde değişebilir. Örneğin, *Clostridia* veya *Firmicutes* gibi diğer bakteri gruplarında, sporulasyonda yer alan sigma faktörleri yapı, düzenleme veya aktivasyon zamanlaması bakımından farklılık gösterebilir. Bir tür içinde bile, sigma faktörlerinin düzenlenmesi belirli çevresel koşullara veya stres sinyallerine özgü olabilir (Fimlaid ve Shen, 2015).

Bacillus subtilis gibi model organizmalarda, sporulasyon sırasında farklı sigma faktörleri belirli aşamaları yönetir (Tablo 1). Örneğin, σ^F ve σ^E gibi erken dönem sigma faktörleri, sporulasyonun başlangıcında vejetatif hücrelerin metabolik olarak uyku durumuna geçişini başlatır (Haldenwang, 1995). Daha sonra, σ^G ve σ^K gibi geç dönem sigma faktörleri, sporulasyonun son aşamalarında spor oluşumunu düzenler. Bu sigma faktörleri, bakterilerin çevresel uyaranlara hızlı ve etkili bir şekilde yanıt vererek yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan sporlara dönüşmelerini sağlar.

Tablo 1. *Bacillus subtilis* sporulasyonunda görev alan sigma faktörlerinin (Sig) listesi ve fonksiyonları (Collins vd., 2023; Haldenwang, 1995; Kroos vd., 1999; Rodriguez Ayala vd., 2020)

Sigma Faktörü	Düzenleme Rolü	Aktivasyon Aşaması	Hedef Genler	Sporulasyondaki İşlevi
SigA (σ^A)	Vejetatif hücre sigma faktörü	Vejetatif üreme	Hüresel işlevler için genel genler	Normal üreme sırasında transkripsiyonu kontrol eder. Sporulasyon sırasında engellenerek sporulasyona özgü sigma faktörlerinin aktivasyonuna izin verir.
SigH (σ^H)	Erken sporlama başlangıcı	Vejetatif üremeden sporulasyona geçiş	Sporulasyonun ana düzenleyicisi olan Spo0A dâhil olmak üzere erken sporulasyon genleri	Vejetatif üremeden sporlanmaya geçişte aktiftir. Sporulasyonun ana düzenleyicisi olan Spo0A dâhil olmak üzere erken sporulasyon genlerinin ifadesini destekler.
SigE (σ^E)	Erken sporlanma düzenleyicisi	Ön bölünme hücresi	Spor kılıfı proteinleri de dâhil olmak üzere erken sporlanma için genler	Asimetrik bölünmeden sonra aktif hale gelerek, ön spor oluşumu için gerekli genlerin transkripsiyonunu yönlendirir. Erken ön spor gelişimi için gerekli genleri düzenler. Ana hücrede σ^E ile koordineli olarak çalışır. Ön spora özgü süreçlerde ve sinyal yollarında yer alan proteinleri kontrol eder.
SigF (σ^F)	Erken sporlanma düzenleyicisi	Ön spor	Spor kılıfı, korteks oluşumu ve stres direnci için genler	σ^F aktivasyonundan sonra ön sporda aktiftir; koruyucu spor bileşenlerinin sentezi de dâhil olmak üzere geç aşama sporulasyon olaylarından sorumludur. Ön sporda σ^F 'nin aktivasyonunu takiben ana hücrede aktive olur.
SigF (σ^F)	Erken sporlanma düzenleyicisi	Ön spor	Spor kılıfı, korteks oluşumu ve stres direnci için genler	Ön sporların yutulması ve koruyucu tabakaların sentezi için gerekli genler de dâhil olmak üzere ana hücredeki erken gen ifadesini düzenler. σ^G ve σ^K gibi sonraki sigma faktörlerini aktive etmek için gerekli genlerin ifadesini yönlendirir.
SigG (σ^G)	Ön sporda aktivasyon	Geç ön spor	Spor olgunlaşması için genler	Spor olgunlaşması ve direncinde rol oynayan genlerin transkripsiyonunu teşvik ederek spor gelişiminin son fazını başlatır. Ön sporun yutulmasından sonra aktif hale gelir (Aşama IV). Dipikolinik asit (DPA) ve DNA korumasında rol oynayan proteinlerin üretimi de dâhil olmak üzere, ön spor olgunlaşması için gerekli genleri kontrol eder. Ön sporu uykuda kalmaya ve dirence hazırlar.

Tablo 1'in devamı

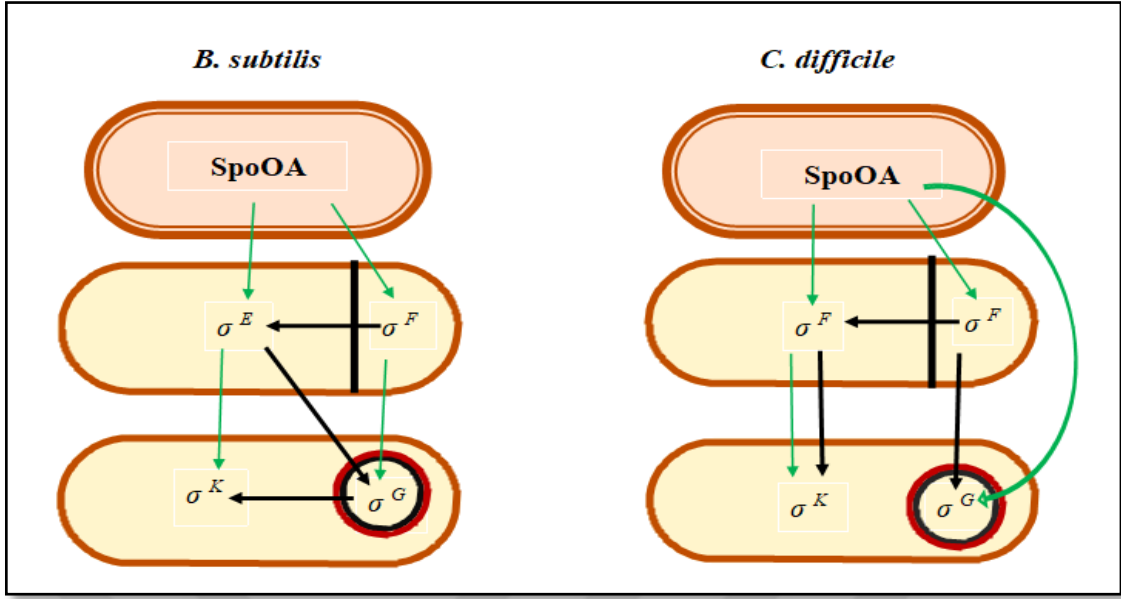
Sigma Faktörü	Düzenleme Rolü	Aktivasyon Aşaması	Hedef Genler	Sporulasyondaki İşlevi
SigK (σ^K)	Geç sporlanma düzenleyicisi	Spor ana hücresi	Spor kılıfı oluşumu ve olgunlaşması için genler	Spor kılıfının olgunlaşmasından ve ana hücrede sporulasyonun son aşamalarından sorumludur. σ^E 'den sonra ana hücrede ve ön spordan gelen sinyallere yanıt olarak aktive olur (Aşama IV-VI). Spor kılıfı ve spor korteksinin sentezinde rol oynayan geç evre genlerini düzenler. Olgun sporun serbest kalması için ana hücrenin son lizisinde gerekli olan genleri çalıştırır.
SigB (σ^B)	Stres tepkisi düzenleyicisi	Sporlanma boyunca	Stres direnci genleri (örneğin, ısı şoku proteinleri)	Sporulasyon sırasında stres yanıtını düzenleyerek olumsuz koşullar altında sporun hayatta kalmasına katkıda bulunur.

Vejetatif hücrelerde sporulasyon işlemi ana transkripsiyonel düzenleyici olan SpoOA aktivasyonu ile başlar (Edwards ve McBride, 2014). SpoOA'nın aktivasyonu, ana hücrede σ^E ve σ^K , ön sporda da σ^F ve σ^G 'nin aktivasyonunu sağlar (Fimlaid ve Shen, 2015). Bir polar septum oluşumundan önce SpoOA'ya bağlı olarak üretilen erken sigma faktörleri (σ^F ve σ^E), asimetrik bölünme tamamlanana kadar inaktif durumda kalırlar. Ön sporda bulunan σ^F 'nin aktivasyonu, polar septum oluşumunun devamında fosfataz SpoIIE'in tercihen anti-sigma faktörü SpoIIAA'yı aktive etmesiyle başlar (Sorg ve Sonenshein, 2008). Aktive edilmiş SpoIIAA, ön sporda bulunan σ^F 'ye bağlı anti-sigma faktörü olan SpoIIAB'yi antagonize (aleyhine çevirerek) ederek σ^F 'nin serbest kalmasını sağlar. Aktifleşen σ^F , *sigG* ve SpoIIR'nin ifadesini aktifleştirir (Sorg ve Sonenshein, 2008). İfadesi gerçekleştirilen SpoIIR, zarlar arasındaki boşluğa salınarak ana hücrede bulunan σ^E 'yi aktifleştirmek için SpoIIGA proteazını aktive eder. SpoIIGA proteazı σ^E 'den inhibitör olan bir propeptidi çıkartarak aktifleşmesini sağlar. Ana hücrede, σ^E aktivasyonu, yutulmaya aracılık eden bir hidrolaz kompleksi SpoIIM/SpoIID/SpoIIP kodlayan genlerin transkripsiyonunu sağlar (Tracy vd., 2008). Bu kompleks polar septumun peptidoglikan tabakasını incelterek, ön spora özgü σ^F ve ana hücreye özgü σ^E tarafından kontrol edilen bileşenlerden oluşan bir kanalın oluşmasına izin verir. 'Besleme tüpü' olarak da bilinen SpoIIQ (σ^F kontrollü) ve SpoIIIAA-AH'den (σ^E kontrollü) oluşan bu kanal, ana hücre ile ön spor bölmeleri arasında köprü oluşturur ve ön sporda σ^G aktivasyonu için gereklidir (Tracy vd., 2011). Beslenme tüpü bilinmeyen molekülleri toplayarak σ^G aktivasyonu için gerekli olan ön spora taşır. σ^G 'nin aktivasyonu hem ön sporun hem de ana hücrenin durumuna bağlıdır. Aktif σ^G , kendi

üretimini otomatik olarak aktive eder ve ana hücrede geç sporulasyon sigma faktörü olan σ^K 'nın aktivasyonunu önemli ölçüde belirleyicileri kodlayan yeni bir transkripsiyonel programı çalıştırır (Wang S. T., vd., 2006).

Sporulasyon yolundaki son sigma faktörü olan ana hücreye özgü σ^K , çoklu mekanizmalar tarafından düzenlenir. *sigK*'nin ekspresyonu, σ^E ve $\sigma^{E'}$ 'nin regule edilmiş transkripsiyon faktörü olan SpoIIID'yi gerektirir. σ^K aktivitesi, $\sigma^{E'}$ 'ye benzer şekilde σ^K 'den inhibitör bir propeptidi uzaklaştıran intramembran proteaz SpoIVFB tarafından proteolitik kesilmeyi gerektirir. SpoIVFB aktivitesi, $\sigma^F/\sigma^{G'}$ 'ye bağlı proteaza bağlı olduğundan, ana hücredeki SpoIVB σ^K aktivasyonu, ön spordaki σ^G aktivitesine bağlanır (Sun G., vd., 2021). Aktif σ^K , korteks ve kaplama oluşumu için gerekli olan genlerin ekspresyonunu indükler. Hem σ^F hem de σ^E mutantları, yutulmayı düzenlemedeki rolleriyle uyumlu olarak asimetrik bölünmede durur. Bir σ^G mutantı, yutulmayı tamamlar, ancak σ^K 'ye bağımlı korteks veya kaplama yapamaz (Al-Hinai vd., 2015).

Sporulasyon işleminin gerçekleşmesi sırasında rol alan bu regülatörler hemen hemen her sporulasyon işleminde yer alır. Model organizma olarak bilinen *Bacillus subtilis* 'te gerçekleşen sporulasyon işleminin düzenlenmesi de bu şekilde gerçekleşir. Fakat son zamanlarda yapılmış olan çalışmalara göre bazı bakterilerin sporulasyon mekanizmasında görev yapan transkripsiyon ve regülasyon faktörlerinin rollerinde değişiklik olabileceği gözlemlenmiştir (Şekil 2). *Clostridia* türleri ile yapılan bir çalışmada belirlenen regülasyon sırasında ve regülatörlerin görevlerindeki farklılıklar bu hipotezi doğrulamaktadır (Galperin vd., 2012).



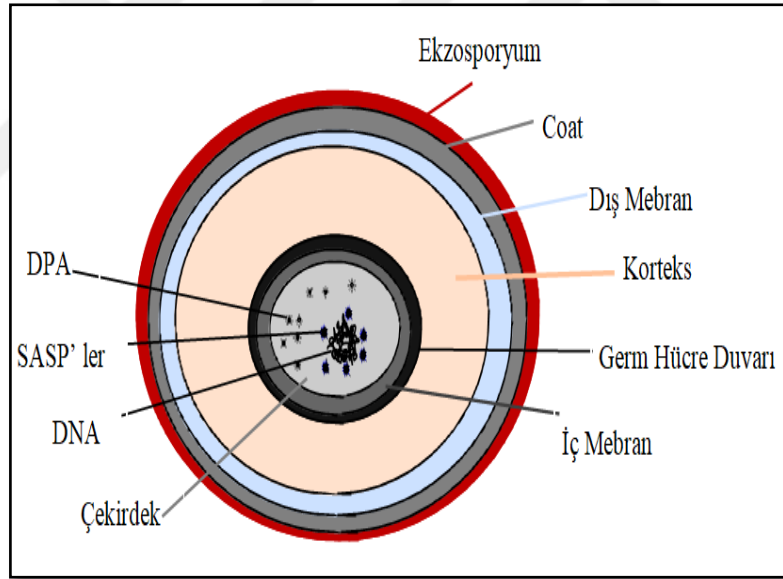
Şekil 2. Korunmuş sporulasyona özgü sigma faktörleri: *B. subtilis*'te, sigma faktör aktivitesi “çapraz” bir düzende düzenlenir: σ^F , σ^E , σ^G ve σ^K sırasıyla ön spor ve ana hücre bölmesinde sırayla ve dönüşümlü olarak aktive edilir. *sigF* ve *sigE*'nin Spo0A aracılı aktivasyonundan sonra, σ^F ön sporda aktif hale gelir. σ^F regulonunun ifadesi, ana hücrede σ^E 'nin aktivasyonuna yol açar. σ^F ve σ^E regulonunun ürünleri, ön spor bölmesinde σ^G 'yi aktive eder. σ^G üretimini otomatik olarak aktive eder ve ana hücrede σ^K aktivasyonunu indükler. Ön sporda ve ana hücrede sırasıyla σ^G ve *sigK* ifadesi için σ^F ve σ^E gereklidir. *C. difficile*'de, *sigF* ve *sigE*'nin Spo0A aracılı transkripsiyonel aktivasyonundan sonra, σ^F , bilinmeyen bir post-translasyonel mekanizma yoluyla σ^G 'yi aktive eder. σ^F ayrıca σ^E 'yi de aktive eder, ancak spoIIR'nin σ^F 'den bağımsız ifadesi nedeniyle gereklilik sadece kısmidir (noktalı siyah çizgiyle gösterilmiştir). σ^E , *sigK* transkripsiyonunu aktive eder; σ^K , çeviriyi takiben aktiftir. *sigG* ifadesi Spo0A tarafından etkinleştirilir ve otomatik etkinleştirmeye tabi olabilir (Galperin vd., 2012).

C. difficile'nin sporulasyonunda, transkripsiyonel düzeyde yer alan *sigG*'nin transkripsiyonu σ^F 'ye bağlı değildir. Bununla birlikte *B. subtilis*'in aksine, *C. difficile* sporulasyonunda sigma faktör aktivasyonu bölmeler arasındaki bu sinyalleşmede minimal düzeydedir, bu da sigma faktörlerinin aktivasyonunun ana hücre ile ön spor arasındaki koordinasyonunun daha az olduğu anlamına gelir (Fimlaid vd., 2013). *B. subtilis* ve *C. difficile*'de, spoIIAA-spoIIAB-*sigF* operonu, *SigH* ve Spo0A tarafından pozitif olarak kontrol edilir. Diğer yandan, *C. difficile*'de *sigG* ve hedef sspA'nın ifadesi ön sporla sınırlıdır (Fimlaid vd., 2015). *B. subtilis*'te, *sigG* geni, iki promotörden kopyalanan bir operonun (spoIIGA-*sigE*-*sigG*) parçasıdır. Bu operon, spoIIGA'nın yukarı akışında bulunan bir *SigA* promotörü ve *sigG*'nin yukarısında yer alan, önce *SigF* ve daha sonra *SigG* tarafından tanınan

ikinci bir promotörden oluşur (Chary vd., 2005). Bunun dışında diğer olaylar *Bacillus subtilis* 'te gerçekleşen süreçlere benzer şekilde devam eder (Saujet vd., 2014).

1.3. Sporların Yapısı ve Spor Direnç Mekanizmaları

Sporlaşma sürecinden sonra, olgunlaşmış spor, çoklu çevresel stres koşullarına dayanacak çeşitli mekanizmalara sahip, iyi yapılandırılmış, çok katmanlı bir morfolojiye sahiptir. Sporların dirençli özellikleri dikkat çekicidir. Yıllarca uyku halinde olan bir spor, uygun ortam koşulu sağlandığında rahatça vejetatif hücreye dönüşebilir. Ayrıca, tarih öncesi sporların genomik incelemeleri, modern organizmalarla inanılmaz benzerlikler göstermektedir. Bir sporun genel yapısına bakıldığında, dışardan içeri doğru; ekzosporyum, kılıf (coat), dış zar, korteks, eşey hücre duvarı, iç spor zarı ve spor çekirdeği olarak bilinen katmanlardan oluştuğu görülmektedir (Higgins ve Dworkin, 2012) (Şekil 3).



Şekil 3. Sporun genel yapısı

Sporların, özellikle bakteriyel endosporların yapısı, aşırı çevre koşullarında hayatta kalmayı garantilemek için oldukça uzmanlaşmıştır. Bu dayanıklı bakteri formları, ısıya, radyasyona, kurumaya ve kimyasal strese dayanmak için geliştirdikleri çeşitli koruyucu katmanlar ve biyokimyasal mekanizmalar, sporun içeriğini (DNA dâhil) korumada hayati bir rol oynamaktadır (Tablo 2). Bu katmanlar ve koruyucu mekanizmalar, sporların uygun

yaşam koşulları sağlayamadığı durumlarda uzun süreli hayatta kalma için tasarlanmış, oldukça etkili bir yapı oluşturur (Driks, 2004; Setlow, P., 2006).

Tablo 2. Sporun yapısını oluşturan katmanların görevleri

Spor Bileşeni	Açıklama	Fonksiyon
Ekzosporiyum (Dış Spor Kabuğu)	Proteinler ve lipitlerden oluşan en dış katman.	Koruyucu bariyer, sporun uygun koşullarda çimlenmeye başlamasına yardımcı olur.
Spor Kabuğu	Birkaç katmandan oluşan kalın protein kabuğu.	Sporu kimyasallar, enzimler, fiziksel hasar, UV ışını, ısı ve kuraklık gibi faktörlerden korur.
Korteks	Spor kabuğunun altındaki peptidoglikan tabakası.	Sporun dehidre olmuş durumunu korur, ısı direncine katkıda bulunur.
Çekirdek	DNA, ribozomlar ve diğer hücrel makineleri içeren merkezi bölge.	Hücrel bileşenleri içerir; yüksek oranda dehidre edilmiştir, çevresel strese karşı direnç sağlar.
SASP'ler	Çekirdekteki DNA'ya bağlanan proteinler.	DNA'yı UV ışınlarından, ısıdan, kuraklıktan ve kimyasal hasardan korur, DNA'nın korunmasını sağlar.
Kalsiyum Dipikolinik asit (Ca-DPA)	Çekirdekte bulunan ve DNA ile kompleks yapan bileşik.	DNA'yı stabilize eder, ısı direncine katkıda bulunur ve DNA'nın bütünlüğünü stres altında korur.

Endosporlar, yüksek ısı, radyasyon, kuruma ve zararlı kimyasallara maruz kalma gibi aşırı çevre koşullarında hayatta kalmak için gelişmiş, son derece dayanıklı ve uykuda olan bakteri formlarıdır. Endosporların bu zorlu koşullara dayanmasını sağlayan direnç mekanizmaları çok yönlüdür ve birkaç temel yapısal ve biyokimyasal adaptasyon içerir. Dirençlerinin merkezinde, spor kılıfı ve korteksi de dâhil olmak üzere sporun benzersiz koruyucu katmanları bulunur ve bunlar dış stres faktörlerine karşı fiziksel bariyer görevi görür (Popham, 2002) (Tablo3). Ek olarak, endosporun çekirdeği, DNA'yı stabilize etmede ve ısı ve radyasyondan kaynaklanan hasarı önlemede önemli roller oynayan kalsiyum dipikolinat (Ca-DPA) ve küçük asitte çözünen spor proteinleri (SASP'ler) içerir (Setlow, P., 2014b). Endosporların metabolik uykuda kalması, olumsuz koşullar altında bozulmaya yol açabilecek hücrel aktiviteleri önlediği için hayatta kalma sürelerini daha da artırır. Bu mekanizmalar birlikte, endosporların en aşırı ortamlarda bile uzun süreler boyunca canlı kalmasını sağlayan son derece etkili bir savunma sistemi oluşturur (Setlow, B., vd., 2003).

Tablo 3. Spor Direnç Mekanizmaları (Checinska vd., 2015; Setlow, P., 2014b)

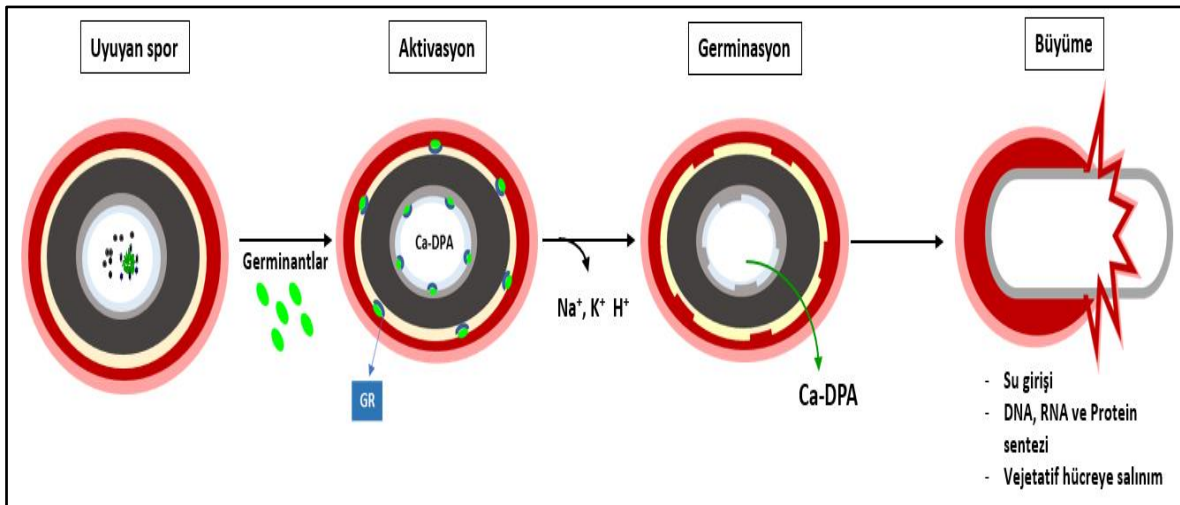
Mekanizma	Açıklama	Fonksiyon
Dehidratasyon	Endosporun çekirdeği yüksek oranda dehidre edilir.	Enzim aktivitesini engeller ve hücrel bileşenlerin korunmasına yardımcı olur, ısı ve radyasyona karşı direnç sağlar.
Kalsiyum Dipiklonik asit (Ca-DPA)	Çekirdekte bulunan kalsiyum dipiokolinat ile DNA kompleksleşir.	DNA'yı stabilize eder, termal denatürasyona ve DNA sarmalının kırılmasına karşı korur.
SASP'lerin DNA'ya Bağlanması	Küçük asidik çözünür proteinler (SASP'ler) DNA'ya bağlanır.	DNA'yı UV ışınlarından, ısıdan, kuraklıktan ve kimyasal hasardan korur, bütünlüğünü muhafaza eder.
Spor Kabuğu ve Korteks Korunması	Koruyucu katmanlar (kabuğunun dış tabakası ve korteks) bulunur.	Sporu çevresel stres faktörlerinden, UV ışını, enzimler, lizozim, ısı ve kimyasallardan korur.
Metabolik Dormansi	Spor metabolik olarak dormansi (uyku) durumundadır ve bu süreçte besin ya da enerjiye ihtiyaç duymaz.	Canlının enerji harcamadan hayatta kalmasını sağlar, böylece aşırı koşullara karşı direncini artırır.
Isı Direnci	Dehidratasyon, kalsiyum dipiokolinat, SASP'ler ve koruyucu katmanların birleşimi ısı direncini artırır.	Endosporlar, aşırı ısılarla (örneğin otoklavlama veya kaynatma gibi) karşı dayanıklıdır.
Kimyasal ve Radyasyon Direnci	Koruyucu katmanlar ve DNA'yı stabilize eden mekanizmalar kimya ve radyasyon direncini artırır.	Endosporlar, zararlı kimyasal maddelere ve iyonlaştırıcı radyasyona karşı direnç gösterir, bu da onları zorlu ortamlarda uzun süre hayatta tutar.

Endosporların aşırı çevre koşullarına karşı olağanüstü direnci, hayatta kalmayı sağlamak için birlikte çalışan son derece koordineli bir dizi yapısal ve biyokimyasal özelliğin sonucudur. Spor kılıfı ve korteksi gibi koruyucu katmanlar, sporu, UV radyasyonu, ısı ve kimyasal gibi dış tehditlerden koruyan fiziksel bariyer görevi görür. DNA, sporun içinde, küçük asitte çözünen spor proteinleri (SASP'ler) tarafından korunur ve kurumaya ve radyasyona bağlı hasarı önleyen Ca-DPA ile stabilize edilir. Sporun metabolik uykuda kalması, bozulmaya yol açabilecek hücrel süreçleri önlediği için, bütünlüğünün korunmasında kritik bir rol oynar. Bakteri sporlarının zorlu çevresel koşullar altında uzun süre canlılığını sürdürebilmesini sağlayan bu direnç mekanizmaları, evrimsel adaptasyonların bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Sporların sahip olduğu bu direnç, mikrobiyoloji, gıda güvenliği ve sağlık hizmetleri gibi pek çok alanda önemli sorunlara neden olmaktadır (Nicholson vd., 2000).

1.4. Germinasyon

Endospor durumundaki bakterinin ortam koşulları sağlandığında yeniden vejetatif forma dönmesi germinasyon olarak adlandırılır ve germinasyon olayı sırasında, spor, ışık mikroskopunda faz parlak halden faz koyu hale geçer (Moir, 2006).

Germinasyon aktivasyonu, germinasyon ve gelişme aşamalarından oluşur (Şekil 4) (Setlow, B., vd., 2003). Aktivasyon, ortam şartlarının düzelmesiyle, sporun germinantının aktifleşmesi ile başlar. Aktivasyon sürecinde, sporun çevresel koşullarının uygun hale gelmesi, özellikle suyun alımı ve doğru germinantların bulunması ve sporun iç membranındaki reseptörlerle etkileşime girerek aktifleşmesini sağlar. Germinantlar, sporun iç membranında bulunan germinant reseptörlerine (GR) bağlanarak endosporun aktive olmasını sağlarlar. Aktif olan endospor germinasyona girer (Setlow, B., vd., 2009). Germinasyon aşamasında, Na^+ , K^+ ve H^+ gibi monovalent katyonlar salgılanır ve bu şekilde çekirdekte hızlı bir pH artışı olur (pH yaklaşık 6,5'ten 7,7'ye). Bu durum, iç membranın yapısında ve geçirgenliğinde değişikliğe neden olur. İç membranın yapısı yaklaşık olarak iki kat artar. Ardından spor spesifik protein olan SpoVA kanalları açılır ve Ca-DPA salınır. Salınan Ca-DPA, korteks litik enzimleri (CLE); CwlJ ve SleB'yi aktifleştirir. Aktif olan bu CLE'ler, korteks hidrolizine neden olur ve SASP'lerin yıkımını gerçekleştirir. Aynı zamanda, aktifleşen CwlJ, Ca-DPA'nın salınımını kolaylaştırır ve daha hızlı Ca-DPA salınmaya başlar. Bu şekilde, CLE'lerin aktifleşmesi ve korteks hidrolizi hızlanır. En son evre olan gelişme evresinde ise, hücre su alıp şişmeye başlar, DNA, RNA ve protein sentezi olur. Bunun sonunda da hücre kılıftan dışarı çıkıp bölünmeye başlar (Koopman vd., 2022).



Şekil 4. Spor germinasyon süreci

1.4.1. Germinantlar

Germinasyon, besinler ve besin olmayan bazı ajanların sporu aktifleştirmesi ile başlar (Tablo 4). Bu ajanlar, germinasyonu farklı şekillerde başlatabilirler. Germinasyonun başlamasını tetikleyen üç farklı mekanizma mevcuttur.

- i. Bir GR, sadece bir germinant ile aktif olabilir. Örneğin, *B. subtilis*'te GerA, L-alanine yanıt verir ve germinasyon başlar.
- ii. Bir GR, birden çok germinanta yanıt verebilir. Örneğin, GerL, serin veya valin ile aktif olabilir.
- iii. Birden çok GR, birden çok germinant ile aktif hale gelebilir. Örneğin, GerB ve GerK, D-glukoz, D-fruktoz ve potasyum ile L-alanin, L-asparajin vb. amino asitlere yanıt verirler (Paredes-Sabja vd., 2008a; Setlow, B., vd., 2003; Setlow, 2014).

Tablo 4. Germinantlar ve etkileri

Germinant	Aktive olan bileşenler
Besinler	GR
Ca-DPA	CwlJ
Dodesilamin	SpoVA
Basınç	GR ve SpoVA kanalları
Lizozim	Peptidoglikan
Isı	GR
Tuz	Bilinmiyor

Çeşitli amino asitler, şekerler ve pürin nükleositleri tek başlarına bilinen besin germinantları olmakla birlikte, bunlar kompleks halde de tetikleyici olabilirler. Bu besleyici germinantların, sporda spesifik ligand bağlanma bölgeleri (GR) vardır. Besin germinantları, sporun iç membranında bulunan GR'ler ile bağlandığında germinasyon başlar (Setlow, B., et al., 2003).

Besinlerin dışında germinasyonun başlamasını sağlayan endojen ve eksojen ajanlar vardır. Ca-DPA, dodesilamin, yüksek basınç, lizozim, alkilamin, tuzlar ve ısı aktivasyonu bu ajanlara örneklerdir (Moir, 2006; Setlow, B., vd., 2003). Ca-DPA iyi bir germinanttır. Direkt ya da indirekt olarak korteks litik enzim olan CwlJ'yi aktif ederek iş görür. Aktif olan CwlJ, korteksin hidroliz olmasına ve germinasyona neden olur. Bir sporun aktif olup Ca-DPA salgılaması diğer sporları da tetikleyip germinasyonu aktif etmektedir (Setlow, B., vd.,

2003). Katyonik yüzey aktif madde olan dodesilamin, germinant reseptörlerine ihtiyaç duymadan CwlJ ve SleB'yi etkiler. Bunu, SpoVA kanallarını açıp spordan hızlı Ca-DPA salınımına neden olarak yapar. Dodesilamin ya sporun iç membranında var olan SpoVA kanallarını açarak işlev görür ya da iç membranında yeni kanallar açılmasına neden olur (Setlow, B., vd., 2003; Vepachedu ve Setlow, 2007). Yüksek basınçlarda (100-600 megaPascal (MPa)), besin olmadan germinant reseptörleri aktif olur ve germinasyon başlar. Hatta daha yüksek basınçlar (>600 MPa), doğrudan SpoVA kanallarını açıp, Ca-DPA salınımına neden olmaktadır, bu şekilde de daha hızlı germinasyon sağlanır (Setlow P., 2014a). Lizozim ile muamele de germinasyonu tetikleyebilir. Lizozim, bunu sporun dış membranını (OM) ve peptidoglikan tabakayı hidroliz ederek gerçekleştirir. Ancak lizozimin bir dezavantajı, çimlenmiş sporların hücre duvarını bozmasıdır (Setlow, P., 2007; Vepachedu ve Setlow, 2007). Bazı türlerde ise, ısı aktivasyonu germinasyona dolaylı olarak etki eder. Isı ile besleyici germinantların GR'lere bağlanması kolaylaştırılır, bu şekilde de germinasyonun başlaması sağlanır. Diğer bir besin olmayan germinant ise tuzlardır. Ancak tuzların nasıl etki yaptığı tam olarak bilinmemekle birlikte, genel olarak besleyici germinantlarla kombinasyon halinde olması gereklidir. İnozin, reseptör yoluyla belirli iyon taşıyıcılar için belli bir role sahip olduğundan germinasyonun daha etkili bir şekilde olmasını sağlar (Moir vd., 2002).

1.4.2. Spor Germinasyon Aşamasında Rol Alan Proteinler

Spor çimlenmesi, uykuda olan sporları, aktif, metabolik olarak çoğalan hücrelere dönüştüren bir süreçtir. Bu süreç, sporun yüzeyindeki çimlenme reseptörleri tarafından tespit edilen belirli besin maddelerinin varlığı gibi çevresel ipuçlarıyla başlatılır. GerA, GerB ve GerC gibi anahtar proteinler, bu besin maddelerini algılamada ve sporun korteks ve kaplama gibi koruyucu katmanlarının parçalanmasını kolaylaştıran bir dizi moleküler olayı tetiklemede önemli bir rol oynar (Aronson ve Fitz-James, 1976). CwlJ, SleB ve YuaC gibi enzimler korteksi parçalayarak su alımını ve rehidrasyonu sağlar. SspA ve SspB gibi proteinler sporun DNA'sını stabilize ederken, çekirdekten kalsiyum ve dipikolinik asit (DPA) salınımı, sporun üreme için iç ortamının geri kazanılmasına yardımcı olur. Çeşitli düzenleyici proteinler, sürecin senkronize olmasını sağlayarak sporun uykuda olmaktan aktif üremeye sorunsuz bir şekilde geçiş yapabilmesini sağlar. Spor çimlenmesinde rol oynayan

başlıca proteinler, bunların işlevleri ve bu kritik biyolojik süreçteki rolleri Tablo 5'te özetlenmiştir (Nicholson vd., 2000; Setlow, B., vd., 2003).

Tablo 5. Spor germinasyonunda görev alan temel proteinler (Abecasis vd., 2013; Aronson ve Fitz-James, 1976; Setlow, B., vd., 2003)

Protein	İşlev	Notlar
GerA	Germ proteini reseptörü	Çimlenmeyi tetikleyen belirli besinleri (örneğin amino asitler) tanır.
GerB	Germ proteini reseptörü	GerA'ya benzer şekilde, çimlenme için besin maddelerini algılamakta görev alır.
SpoVA	Spor çekirdeğine kalsiyum ve dipikolinik asit (DPA) taşınmasında rol oynayan bir protein	Spor çekirdeğinin stabilitesi ve düzgün çimlenme için gereklidir.
SspA	Sporun uykuda kalması ve çimlenmesi sırasında DNA'yı koruyan küçük, asitte çözünen protein	DNA'yı hasardan korur ve çimlenme sürecine yardımcı olur.
SspB	Küçük, asitte çözünen protein	Çimlenme sırasında DNA'yı stabilize etmek için SspA ile çalışır.
SpoVID	Çimlenme sırasında spor kılıfının parçalanmasına yardımcı olan protein kompleksinin bir parçası	Sporun koruyucu tabakalarının parçalanmasına yardımcı olur.
CoolJ	Lizozim benzeri enzim	Spor korteksindeki peptidoglikanı parçalayarak, sıvı alımını ve şişmeyi sağlar.
CwlD	Korteks yıkımında rol oynayan bir diğer lizozim benzeri enzim	Spor çimlenmesini başlatmak için CwlJ ile koordinasyon halinde hareket eder.
BxpB	Korteks hidrolizinde görev alan enzim	Çimlenme için kortekste peptidoglikanı parçalar.
Yua B	Korteks-değiştirici enzim	Çimlenmenin ilk aşamalarında korteks bozulmasına katkıda bulunur.
YcsK (LipC)	Membran yeniden şekillendirme proteinleri	Lipit parçalanmasında ve membran yeniden düzenlenmesinde rol oynayan bir lipazdır.
YqeK	Membran yeniden şekillendirme proteinleri	Spor çimlenmesi sırasında zarla ilişkili süreçlerde potansiyel olarak rol oynayan bir diğer proteindir.

Sporların germinasyonunda rol alan bu proteinler arasındaki koordinasyon, yalnızca koşullar iyileştiğinde üremenin hızlı ve etkili bir şekilde devam etmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda sporların uzun süreli hayatta kalmasını ve çevresel zorluklara karşı dayanıklılığını artırmalarında da kritik bir role sahiptir (Setlow, B., vd., 2008). Germinant reseptörler, korteks yıkım enzimleri, lipazlar ve diğer yapısal proteinler gibi farklı işlevlere sahip proteinlerin kusursuz bir şekilde etkileşimde bulunması, sporun, metabolik olarak aktif bir hücreye dönüşmesini mümkün kılar. Bu süreç, özellikle aşırı sıcaklık, UV radyasyonu, kimyasal maddeler ve diğer olumsuz çevresel koşullar altında sporların varlığını sürdürebilmesini sağlayan evrimsel olarak optimize edilmiş bir mekanizmadır (Henriques ve Moran, 2007).

Bu tez çalışmasının ana konusu olan LipC (YcsK), *Bacillus subtilis* ve diğer spor oluşturan bakterilerde bulunan ve spor germinasyonunda önemli bir rol oynayan bir lipazdır (Galperin vd., 2022). Bir lipaz olarak, lipidlerin hidrolizini katalize ederek onları serbest yağ asitlerine ve gliserole parçalar. Bu süreç, çimlenme sırasında önemli yapısal değişikliklere uğrayan spor zarlarının yeniden modellenmesi için önemlidir. LipC'nin aktivitesi muhtemelen sporun iç zarındaki lipid bileşenlerinin parçalanmasını destekleyerek, sporun vejetatif duruma geçişi için çok önemli olan zar akışkanlığını ve geçirgenliğini kolaylaştırır. LipC tarafından lipidlerin parçalanması, zar dinamiklerine yardımcı olmasının yanı sıra, erken metabolik süreçler sırasında kullanılabilen yağ asitlerini serbest bırakarak bir enerji kaynağı da sağlayabilir. LipC, doğrudan çimlenme reseptörü aktivitesine veya korteks bozunumuna katılmasa da (genellikle CwlJ veya SleB gibi proteinler tarafından üstlenilen görevler), lipid hidrolizi işlevi bu süreçleri tamamlayarak su alımı, besin alışverişi ve genel çimlenme için en uygun koşulları sağlar (Setlow, B., vd., 2001, 2003).

1.4.3. LipC (YcsK), Spor Germinasyon Lipazı

LipC (YcsK), *Bacillus subtilis* ve diğer spor oluşturan bakterilerde var olduğu tahmin edilen bir lipazdır ve spor çimlenmesinde önemli bir rol oynar. Lipazlar, lipidlerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalize eden enzimlerdir ve spor çimlenmesi sırasında kritik süreçler olan lipid metabolizmasını ve membranın yeniden şekillenmesini kolaylaştırır. Çimlenme sırasında sporlar, su alımına, besin alışverişine ve uyku halinden vejetatif üremeye geçişe izin vermek için membranlarında önemli yapısal değişiklikler geçirir. LipC, muhtemelen sporun lipid bileşenlerini (fosfolipit ve membran lipidleri) parçalayarak, bu süreçlerin gerçekleşmesini destekler ve membran akışkanlığını ve geçirgenliğini artırarak bu geçiş kolaylaştırır (Bailey-Smith vd., 2005; Setlow, B., vd., 2003). Dahası, LipC sporun mekanizmasının yeniden aktif hale getirilmesi için gerekli olan erken metabolik süreçlerde kullanılabilen yağ asitlerini serbest bırakarak bir enerji kaynağı sağlayabilir (Henriques ve Moran, 2007). LipC, çimlenme veya korteks bozunmasının ilk algılanmasında doğrudan yer almasa da (bu süreçler çimlenme reseptörleri (GerA, GerB ve GerC) ve korteks litik enzimleri (CwlJ ve SleB) muhtemelen bu süreçleri, membran ve hücre duvarı yeniden şekillenmesi için optimum bir lipid ortamı sağlayarak tamamlar (Christie vd., 2023). LipC'nin spor membran dinamiklerindeki rolü, çimlenme sırasında spor kabuğunun bütünlüğünün sürdürülmesi için de önemli olabilir (Popham, 2002). LipC'nin spor

çimlenmesine özgü katkılarının anlaşılması, patojenik bakterilerde spor oluşumunu kontrol etme konusunda yeni yaklaşımlar sağlayabilir.

- LipC Sınıflandırılması

Bakteriyel lipazlar, amino asit dizisi homologisine göre sekiz aileye sınıflandırılır. Gerçek lipazlar olarak adlandırılan Aile I lipazları, 6 alt aileye ayrılan büyük bir gruptur. Korunan dizinin merkezine yakın bir yerde bulunan aktif bölge, serin ile pentapeptit Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly (GxSxG) motifine sahiptirler. *Bacillus* ve *Staphylococcus* türlerinden elde edilen bakteriyel lipazların çoğu bu aileye aittir. Aile II'de gruplanan enzimler geleneksel GxSxG motifini sergilemez; bunun yerine aktif bölge serin rezidüsünü içeren bir Gly-Asp-Ser-Leu (GDSDL) motifi gösterir. GDSDL motifi, dizinin ortasında korunan GxSxG motifi ile karşılaştırıldığında, amino asit dizisinin N-terminusuna yakın bir yerde bulunur. GDSDL lipazları, çok işlevli özellikler ve geniş substrat özgüllüğü ile lipolitik aktiviteleri temsil eder. Ayrıca, GDSDL ailesinin bir alt grubu, dört korunmuş blok (I, II, III ve V) içinde yer alan Ser, Gly, Asn ve His rezidüleri nedeniyle SGNH hidrolaz süper ailesi olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 5).

Blok I	Blok II	Blok III	Blok IV
1 IVMFGDSLSDTG (37)	LTIANEAEGGPT (37)	VILWVGANDYL (26)	NGAKEILLFNLPD (128)
2 VVALGDSLSDTG (36)	LPLYNWAVGGAA (34)	FTLEFGLNDFM (22)	AGAKNFMLMTLPD (101)
3 LYVFGDSLSDGG (34)	KGGDNYAAGGAT (31)	YVHWIGGNDVD (29)	AGAGLVIVPTVPD (155)
4 MIVFGDSLSDAG (48)	PDGNNWAVGGYT (45)	YYLTGGGNDL (26)	GGARYIMVWLLPD (94)
5 VFFFGDSVFDTG (62)	LTGVSFASGGAG (55)	AIIVVGSNDLI (35)	YGARRIGVIGTPP (101)
6 VFFFGDSIFDTG (68)	LTGVSFASGGAG (45)	AIIVVGSNDLI (35)	YGARRIGVIGTPP (101)
7 LLILGDSL-AG (27)	ISGDTSQGLAR (12)	VLVELGGNDL (36)	YGRRYNEAFSAIY (26)
8 LLVLGDSL-AG (30)	ISGDTTGNGLAR (12)	VLIELGANDL (36)	YGRRYSDMFYDIY (26)
9 YTAGDSLIT-TG (32)	RSGENTEEILGL (15)	TITGCG-NDLI (36)	KGENPSPYAIRVF (50)
*	▲	*	
Blok V	Organizma	Tahmini fonksiyonu	SWISS-PROT
1 FWDQVHPT	<i>Aeromonas hydrophila</i>	lipase/acyltransferase	P10480
2 FWDVTHPT	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	hemolysin	Q99289
3 FADDEHPT	<i>Xenorhabdus luminescens</i>	lipase	P40601
4 FNDLVHPT	<i>Pseudomonas putida</i>	ORF trpE-trpG region	P40604
5 FWDGVHPT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	proline-rich protein	P40602
6 FWDGLHPS	<i>Brassica napus</i>	proline-rich protein	P40603
7 QDDGHPN	<i>Escherichia coli</i>	thioesterase/protease	P29679
8 MDDGLHPK	<i>Vibrio mimicus</i>	arylesterase	Q07792
9 F-DGVHPN	<i>Bacillus subtilis</i> YcsK (LipC)	lipase	BSU041110 (GenBank)
*			

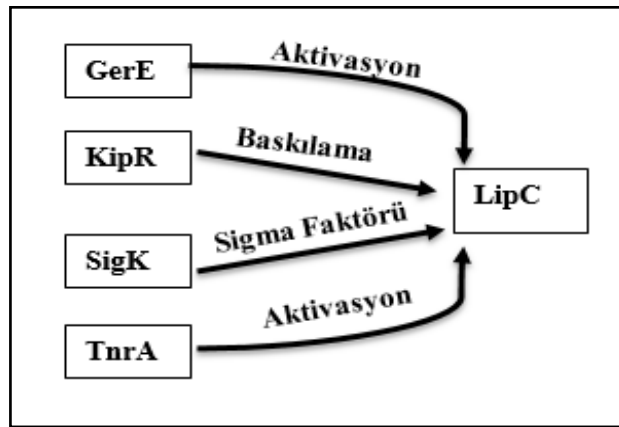
Şekil 5. *B. subtilis* LipC ile lipolitik enzimlerin GDSDL ailesinin üyeleri arasındaki dizi analizi. Aynı amino asitler siyahla gölgelendirilmiş olup, parantez içindeki her sayı, korunan bloklar arasındaki amino asit rezidülerinin sayısını temsil etmektedir. Varsayılan katalitik amino asitler (*) olarak işaretlenmiştir ve GDSDL konsensüs motifinin altı çizilmiştir. Varsayılan katalitik amino asit ve II. bloktaki G (Gly) (siyah üçgenle işaretlenmiştir) SGNH hidrolaz ailesinde korunmuştur (Masayama vd., 2007).

Atsushi Masayama ve arkadaşları, 2007 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis ycsK*'nın öngörülen amino asit dizisinin, lipolitik enzimlerin GDSL ailesine benzerlik gösterdiğini ve dolayısıyla bu ailede yer aldığını belirlemiştir (Masayama vd., 2007).

- LipC'nin Spor Yapısındaki Yeri ve Rolü

doğru şekilde dâhil edilmesi için hayati önem taşıdığını göstermektedir (Masayama vd., 2010). Ayrıca, YcsK'nin lipolitik aktivitesi, özellikle L-alanine yanıt olarak, çimlenme sırasında spor kabuğunun lipit bileşenlerinin parçalanması için esastır. LipC ile diğer spor kabuğu proteinleri arasındaki etkileşim, yalnızca sporun yapısal dinamiklerine katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda spor kabuğunun lipit bileşimini ve geçirgenliğini değiştirerek çimlenme sürecini düzenlemede kritik bir rol oynar ve nihayetinde uykuda olan bir spordan aktif vejetatif bir hücreye geçişi kolaylaştırır (Driks ve Eichenberger, 2016; Mckenney vd., 2012).

Bacillus subtilis'in spor kabuğunda bulunan ve spor çimlenmesinde önemli bir rol oynayan ycsK (LipC) geninin düzenlenmesi öncelikle sigma faktörü *SigK* tarafından kontrol edilir ve transkripsiyon faktörü GerE tarafından olumlu yönde etkilenir. Bu düzenleme, LipC'nin ana hücre bölmesinde ifade edildiği ve CotE, SafA ve SpoVID gibi proteinlere bağlı bir şekilde ön sporların etrafında yer aldığı sporulasyonun geç aşamalarında gerçekleşir. ycsK genindeki mutasyonlar, L-alanin tarafından tetiklenen çimlenmeyi tamamlayamayan sporlarla sonuçlanır ve bu durum LipC'nin bu süreçteki temel rolünü gösterir. Ek olarak, LipC fosfolipaz aktivitesi gösterir ve bu durum, sporulasyon ve çimlenme sırasında LipC'nin dış zardaki lipitleri değiştirebileceğini düşündürür. LipC'nin fizyolojik rolleri ve düzenleyici mekanizmaları, özellikle çimlenme sırasında lipit bileşimi ve spor işlevselliği üzerindeki etkisiyle ilgili olarak daha fazla araştırma konusu olmaya devam etmektedir (Masayama vd., 2007). LipC 'nin regülasyonunda görevli faktörler Şekil 7'de yer almaktadır.

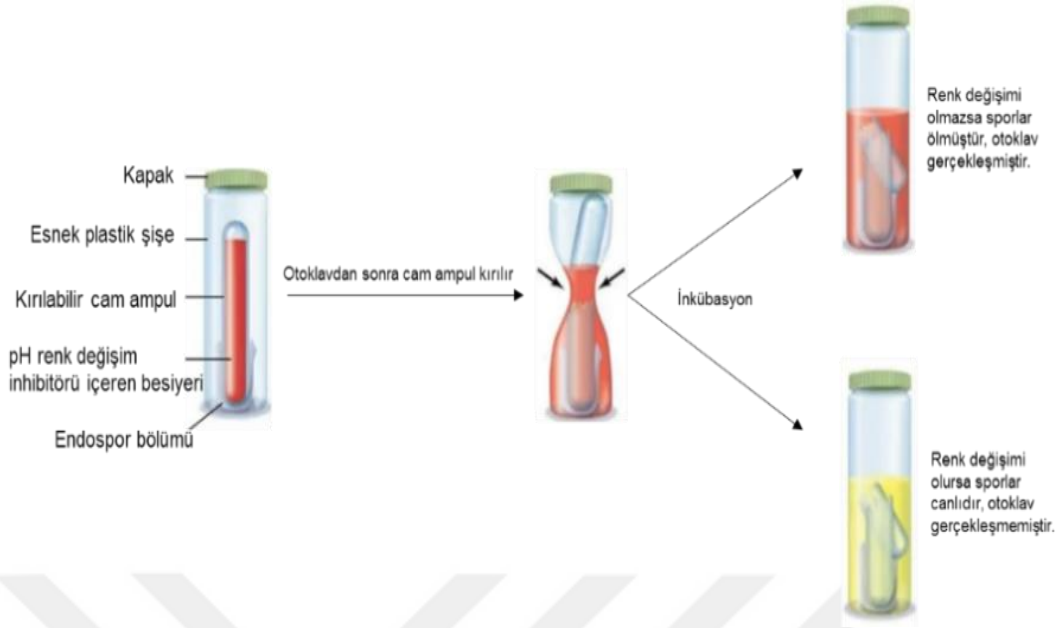


Şekil 7. *lipC* geninin düzenlenmesinde rol alan faktörler (Subtiviki veritabanından elde edildi)

1.5. Biyolojik İndikatörler

Hastane ve laboratuvar gibi yüksek düzeyde temiz olması gereken yerlerde yüzeylerin, cihazların ve malzemelerin mikroorganizmalardan temizlenmesi işlemi “sterilizasyon” olarak adlandırılır. Farklı alanlar için farklı sterilizasyon yöntemleri kullanılmakla birlikte malzemelerin sterilizasyonu için genel olarak otoklav kullanılmaktadır. Malzemelerin zarar görmemeleri için özelliklerine göre otoklavlar çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitli otoklavlarda sterilizasyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi gerekmektedir. Fiziki, kimyevi ve biyolojik olarak yapılan kontrollerden biyolojik kontrol, biyolojik indikatörler (biyoindikatörler) ile yapılır. Mikroorganizmaların canlılığını test eden bu yöntem en doğrudan sonuç veren yöntemdir (Jyoti B. Salgar vd., 2023; Soylu, 2005). Otoklav sonrası canlı mikroorganizma kalmamasının kesin olarak belirlenmesi için çevre şartlarına dayanıklılığı yüksek olan bakteriler kullanılır. Bu bakteriler zor şartlara uyum sağlayabilmek için spor yapısı oluştururlar. Zor şartlarda oluşan spor yapısı, ortam koşulları elverişli hale geldiğinde canlanarak tekrar vejetatif hale geçer. Biyoindikatörlerde de bu zor şartlarda yaşamına devam etmek için spor oluşturabilen *Bacillus subtilis* ya da *Geobacillus stearothermophilus* kullanılarak bu bakterilerin tekrar canlanmaları değerlendirilir. Otoklav, bu bakteri sporlarının yaşayabileceği sıcaklık ve basınç seviyesi üstüne çıktığı için otoklav sonrası sporların da ölmesi ve tekrar canlanamamaları beklenir (Karadağ, 2005). Bu bakteriler arasından, sıcaklığa dayanıklılığı daha yüksek olduğu için öncelikli olarak *Geobacillus stearothermophilus* tercih edilir.

Geçmişte *Bacillus stearothermophilus* olarak adlandırılan *Geobacillus stearothermophilus*, aerobik, termofilik, Gram pozitif ve spor oluşturabilen bir bakteridir. Optimum yaşam şartları 65 °C olan bakterinin, 80 °C’de spor oluşturduğu bilinmektedir (Nychas ve Drosinos, 2014). Sterilizasyonun etkinliğini test etmek amacıyla kullanılan biyoindikatörlerde, bu bakterilerin canlanma potansiyeli, ortama salgıladıkları enzimlerin, önceden sisteme eklenmiş substrat ile reaksiyona girip girmemesiyle belirlenmektedir. Bu reaksiyon, klorometrik, florometrik ya da kromojenik olarak değerlendirilebilir ve bu, bakterinin canlanması, ortama enzimi salması, enzim ve substratın etkileşip sonuç vermesi ile en az 2 saat süren bir inkübasyon süreci gerektirir. Enzim-substrat etkileşimi sonucu bir sinyal elde edilmesi, bakterinin canlılığını koruduğunu, dolayısıyla otoklavlama işleminin yetersiz kaldığını gösterir (Şekil 8) (Richard R., vd., 1993).



Şekil 8. Biyoundikatörün çalışma prensibi

Şekil 8, otoklav işlemlerinin biyolojik doğrulamasında kullanılan ticari biyolojik indikatör sisteminin yapısı ve işleyişini göstermektedir. İşlem sonrası renk değişimi gözlenmemesi, sporların inaktive olduğunu ve otoklavlanmanın başarılı olduğunu gösterir. Canlı kalan sporlar ise metabolik aktivite göstererek pH değişimi ve renk değişikliği yaratır, bu da sterilizasyonun yetersiz olduğunu ve otoklav parametrelerinin gözden geçirilmesi gerektiğini işaret eder. Endosporlar, sterilizasyon sürecinin etkinliğini değerlendirmek için kritik öneme sahiptir, çünkü yüksek dirençleri, sterilizasyonun başarısını güvenilir bir şekilde belirler. Bu biyolojik indikatörler, sterilizasyonun biyolojik etkinliğini de ölçerek güvenilir bir kontrol sağlar.

Bu bağlamda, sporların biyolojik indikatör olarak kullanım potansiyeli dikkat çekmektedir. Sporlar, ekstrem çevresel koşullara karşı yüksek direnç göstermeleri nedeniyle, özellikle sterilizasyon işlemlerinin etkinliğini değerlendirmede yaygın olarak tercih edilmektedir. Günümüzde ticari olarak kullanılan biyolojik indikatörler bu prensibe dayalı olarak çalışmakta olup, otoklavlama işleminden sonra yaklaşık 2 saatlik inkübasyon süresi gerektirmektedir. Otoklav süreciyle birlikte toplamda 4 saate ulaşan bu işlem süresi, özellikle sağlık kuruluşları gibi yoğun kullanım gerektiren ortamlarda sterilizasyon süreçlerinin verimliliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu tez kapsamında, spor yapısında yer alan LipC enzimi üzerinde gerçekleştirilecek yönlendirilmiş mutasyon çalışmaları ile enzimin biyokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesi hedeflenmektedir. Bu sayede, daha kısa

sürede sonuç verebilecek, duyarlılığı artırılmış biyolojik indikatörlerin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Elde edilecek bulguların, sterilizasyonun doğrulanmasına yönelik süreçlerin hızlandırılmasına katkı sağlaması ve ilgili uygulamalarda pratik faydalar sunması beklenmektedir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyaller

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Trypton (Multicell 800-158-CG), NaCl (BBI Life Sciences A610476), Yeast Ekstrakt (BBI Life Sciences A505245-0500), Agar (Sigma 05039), Malt Ekstrakt (MERCK VM264491 106), D-Glukoz monohidrat (TEKKİM TK090271.01002), Ampisilin sodyum sülfat (AppliChem A0839.0100), Kanamisin sülfat (Ambresco 0408), Tripsin (Ambresco O458), Lizozim (Amresco 0663), Etidyum Bromide (Sigma Aldrich E-7637- 1G), Agaroz (Isolab 9.020.120.500), Bromophenol blue (Gerbu 080702), IPTG (Gold Biotechnology 36793-1), Hem (Sigma Aldrich H9039), Commassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich 27815-25G-F), Commassie Brilliant Blue R-250 (Fischer Scientific BP101), 2-Propanol (BDH 296796L), Metanol (MERCK 106.007), Akrilamid (Sigma-Aldrich A8887), Glisin (Biomatik A2716), Bromofenol blue sodyum salt (Gerbu 080702), Amonyum peroksi sülfat (MERCK K19415400), Bis-akrilamid (Sigma Aldrich 128910), TEMED (SERVA 35925.01)), Asetik Asit (ISOLAB 901.013.2500), H₂O₂ (MERCK K50671809838), %96 Etanol (Nilkim), Gliserol (Fisher Scientific BP229-1), Bütanol (MERCK 703988), GuHCl (Acros organics 120232500), Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (Isolab 969.053), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (MERCK 106.580), fosforik asit (MERCK K17936363), Sodyum Asetat (Isolab 969.176.1000), Sodyum sitrat tribazik dihidrat (Sigma Aldrich S4641), Sitrik asit (AFG Bioscience 127443), Amonyum Asetat (Isolab 9.030.261.000), Trizma Baz (Sigma Aldrich T1503), NaOH (Isolab 964969.113.1000), HCl (Sigma Aldrich 30721), RNaz A (Appllichem A2760), β -merkaptotetanol (Sigma Aldrich M6250), DTT (Appllichem 3700852), SDS (Fischer scientific BP166), Tween® 20 (MERCK 655204), Triton™ X-100 (MERCK K50616303908), EDTA (Fisher Scientific BP118-500), İmidazol (Sigma Aldrich 56750), DMSO (Carlo Erba 445103), EGTA (Biobasic Canada ED0077), Magnezyum klorür hekzahidrat (Carlo 25 Erba 459337), NiCl (Ataman Kimya 7718-54-9), Kalsiyum klorit dihidrat (MERCK 137923), Potasyum kloride (MERCK K23759135 709), ZnCl₂ (Ataman Kimya 7646-85-7), Kobalt klorit hekzahidrat (Sigma Aldrich 25,559-9), MnCl₂ (Sigma Aldrich 48795), Demir (II) sülfat heptahidrat (MERCK A0127565 009), Cıva (II)

klorit (Alfa Aesar P28A004), Bakır sülfat (MERCK A0356491 219), *EcoRI* (NEB R3101S, Promega R6011), *HindIII* (Promega R6041), *NcoI* (Promega R6513), *XhoI* (Neb;10161948), BSA (NEB B9200), dNTP Seti (Promega), DNA ladder (NEB N3232L), Protein ladder (NEB P7712S, Promega V849A), Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti Manuel (Promega A1120), GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific Kit #K0502, #K0503), QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen 27106), HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Scientific™ 88221), 4-Nitrophenyl palmitate (MERCK N2752), TEMED (Janssen Chimica), Ni-Metal Affinity Resin (Qiagen) belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

TSB sıvı besiyeri ve TSA katı besiyeri *Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953 suşunun çoğaltılmasında kullanıldı. 1 L TSB (Merck 105459) ve TSA (Merck 105458) hazırlamak için üretici firmanın önerdiği miktarda tartım yapıldı ve 1 L distile suda çözüldü. Hazırlanan besiyeri 121 °C’de 20 dakikaotoklavda steril edildi.

LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri, tüm *E. coli* suşlarının (DH10β, BL21 (DE3) ve BL21 (DE3) Star) gelişiminde kullanıldı. 1 L LB için; 10 g tripton, 5 g yeast ekstrakt ve 5 g NaCl 1 L distile suda çözündürüldü. pH 7,4’ye ayarlandı ve hazırlanan besiyeri 121 °C’de 20 dakikaotoklavda steril edildi (Macwilliams ve Liao, 2016).

2.1.3. Kullanılan Bakteriler ve Vektörler

Tez çalışmısında kullanılan bakteri *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 suşu, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)’den satın alındı. Kompetent hücre olarak *Escherichia coli* DH10β ve *Escherichia coli* BL21 kullanıldı ve bu bakteriler Thermo Scientific’ten satın alındı. Klonlama için kullanılan pJET1.2/Blunt vektörü ve ekspresyon çalışmaları için ise pET28a(+) ekspresyon vektörü (Invitrogen), pJET1.2/Blunt klonlama vektörü (Thermo Fisher CloneJET PCR cloning Kit, Lot:2694226) ve pNW33N vektörü (NovePro, Cat no: V004246) kullanıldı.

2.2. Biyoinformatik Analizler

İlk olarak *Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953 de bulunan GDSL ailesi lipazı gen dizileri, NCBI veritabanından araştırıldı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Ilene

Mizrachi, 2007). NCBI BLAST aracı kullanılarak belirlenen gen dizisinin doğruluğu tespit edildi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul vd., 1990). NCBI ve UniProt veritabanları (<https://www.uniprot.org/>) kullanılarak benzer proteinler ve amino asit dizileri elde edildi. Çevrimiçi biyoinformatik araç olan Clustal Omega, gen ve protein dizilerinin çoklu hizalanması için kullanıldı (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (McWilliam vd., 2013). Enzimin yapısı, korunmuş bölgesi ve ait olduğu protein ailesi ve alt grubunu belirlemek için InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) ve NCBI CDD veritabanları kullanıldı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Biyoinformatik analiz sonucunda, elde edilmek istenen DNA dizisi ve ona karşılık gelen protein dizisi belirlendi ve bu diziye özgü primerler tasarlandı. Klonlama çalışmalarında kullanılan primerler, SnapGene ve FastPCR programı ile tasarlandı ve özellikleri analiz edildi (Kalendar vd., 2009).

ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) çevrimiçi programı ile proteinlerin fizyolojik özellikleri belirlendi (Artimo vd., 2012). Proteinin yapısında bulunan sinyal bölgelerini belirlemek için SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0>) programı kullanıldı. Çevrimiçi Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>) ve Phyre2.2 (<https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) araçlarıyla proteinlerin temsili 3D yapıları oluşturuldu (Article ve Paritala, 2022; Schwede vd., 2003). Oluşturulan 3D yapılarının analizleri için VerF3D (<https://saves.mbi.ucla.edu>) ve ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) çevrimiçi araçları kullanıldı. Proteinin moleküler docking çalışmalarını gerçekleştirmek için Autodock 4.0 programı ve COACH-D (<https://yanglab.qd.sdu.edu.cn/COACH-D>) web sunucusu kullanıldı (Fan vd., 2019; Wu vd., 2018). Moleküler docking sonuçları, PyMOL ve Discovery Studio programlarında analiz edildi. Proteinin yapısında mutasyon bölgelerine karar vermek için çevrimiçi aracı olan HotSpot Wizard 3.0 kullanıldı. Mutasyon bölgelerine karar verildikten sonra tekrar moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilerek mutant enzimlerin bağlanma enerjileri analiz edildi. Son olarak, proteinlerin moleküler similasyon ve dinamik analizleri için; DyneMine (<https://bio2byte.be/dynamine>) ve FlexServ (<https://mmb.irbbarcelona.org/FlexServ>) sunucularından yararlanıldı.

2.3. Klonlama Çalışmaları

2.3.1. *gstLipC* Geni için Primerlerin Tasarlanması

Primer tasarlamak için, GenBank veritabanından, *Geobacillus stearothermophilus*'un GDSL ailesi lipaz (GstLipC) (NCBI ID: KOR93947.1) enzimini kodlayan nükleotid dizisi elde edildi ve bu nükleotid dizisinin 5' ve 3' uçlarına uygun primerler tasarlandı (Tablo 6). Klonlama amacıyla, primerlerin 5' uçlarına restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri eklendi. Primerler, Sentebiolab Genetik Biyoteknoloji A.Ş./Ankara firmasında üretildi.

Tablo 6. LipC enzimleri için tasarlanan primerler (Yeşil gölgeli diziler, sağ tarafta belirtilen restriksiyon enzimi kesim bölgelerini ifade etmektedir).

Primer Adı	Primer Dizisi	Restriksiyon enzimi kesim bölgesi
LipC1_F	cccATGgGACGGTGGGGATGG	<i>NcoI</i>
LipC1_R	cCTCGAGGTTTCGCCCACCACTC	<i>XhoI</i>

2.3.2. *Geobacillus stearothermophilus*'un Genomik DNA İzolasyonu

Geobacillus stearothermophilus'un genomik DNA izolasyonunda Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanıldı. Bakteri, optimum üreme sıcaklığı (60 °C) dikkate alınarak TSB besiyerinde uygun şartlar altında gece boyu inkübasyona tabi tutuldu. Çoğalmış olan gece kültürü, kit protokolüne uygun olarak 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler, 480 µl 50 mM EDTA içerisinde çözülerek, 120 µl 10 mg/mL lizozim ilave edildi ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra santrifüjlenerek sıvı kısım uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 600 µl Nuclei Lysis solüsyonu eklendi, hafifçe pipetlenerek karıştırıldı ve 80 °C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra soğutma işlemi gerçekleştirilip, 3 µl RNaz solüsyonu eklendi; tüp 2-5 kez alt-üst edilip 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Devamında, 200 µl Protein Precipitation solüsyonu eklenip, birkaç defa alt üst yaptıktan sonra 5 dakika süreyle buzda bekletildi. Ardından, santrifüjlenerek süpernatant yeni bir ependorfa aktarıldı, üzerine 600 µl izopropanol eklendi. Birkaç defa alt üst edildikten sonra, yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından santrifüj yapıldı. Genomik DNA'nın bulunduğu pellet, %70'lik etanol ile yıkandı ve santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak, elde edilen pellet, kalan etanolün uzaklaştırılması için, 37 °C'de 15 dakika bekletildi, daha sonra üzerine 100 µl DNA Rehydration solüsyonu

eklendi ve 65 °C’de 1 saat inkübe edildi. Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zaman kadar +4 °C’de saklandı.

2.3.3. *gstLipC*’nin PCR ile Çoğaltılması

Enzim genleri, yukarıda hazırlanan primerler kullanılarak bakteriyel DNA’dan PCR aracılığıyla çoğaltıldı. PCR için önerilen koşullar Tablo 7’de yer almaktadır. PCR şartları, primerlerin T_m sıcaklığına göre annealing (primerlerin DNA’ya bağlanma sıcaklığı) ve çoğaltılmak istenilen bölgenin uzunluğuna göre extension (uzama) süresi ve döngü sayısı belirlenerek, bu şartlara uygun şekilde PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1’lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi ile analiz edildi.

Tablo 7. Taq DNA polimeraz için önerilen PCR karışımı

PCR Reaksiyon Karışımı	Miktar (µL)
Taq DNA Pol. Tamponu (10x)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
F Primer (10 mM)	1 µL
R Primer (10 mM)	1 µL
Kalıp DNA	1 µL
Taq DNA Polimeraz (5 U/µL)	0,25 µL
dH ₂ O	37,75 µL

2.3.4. *gstLipC*’nin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması

PCR sonucunda elde edilen DNA fragmenti pJET1.2 klonlama vektörüne aktarıldı. Bu işlem sırasında, Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit (#K1232) protokolü takip edildi. Kit protokolüne belirtilen oranlara uygun olarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 8-9). Son olarak, ligasyon ürününün *E.coli* DH10β konak hücresine transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon sonrasında elde edilen kolonilerden koloni PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek, klonlamanın başarılı olup olmadığı kontrol edildi.

Tablo 8. DNA fragmenti uçlarının küt uç haline getirilmesi

Bileşenler	Miktar
2X Reaksiyon Tamponu	10 µL
Jel Ekstraksiyon Ürünü (<i>gstLipC</i>)	5 µL
dH ₂ O	1 µL
DNA Blunt Enzimi	2 µL

DNA fragmenti uçlarının küt uç haline getirilmesi için, hazırlanan reaksiyon karışımı, 3-5 saniye santrifüj edildi. Karışım 70 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve ardından buz üzerine alındı. Bir sonraki adımda ligasyon aşaması gerçekleştirildi.

Tablo 9. Ligasyon reaksiyonu

Bileşenler	Miktar
pJET1.2/Blunt Klonlama Vektörü (50 ng/µL)	1 µL
T4 DNA ligaz	1 µL
Son hacim	20 µL

Ligasyon için hazırlanan reaksiyon karışımı, 3-5 saniye santrifüj edildi. Ligasyon karışımı, oda sıcaklığında (yaklaşık 22 °C) 5 dakika inkübe edildi. Ligasyon işlemi tamamlandıktan sonra transformasyon aşamasına geçildi.

2.3.5. Kompetent *E. coli* DH10β Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon

Transformasyonda kullanılmak üzere öncelikle kompetent *E. coli* DH10β hücreleri hazırlandı. Bunun için, petriye ekilmiş bakteri hücrelerinden tek bir koloni alınıp, 3 mL Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı. 37 °C'de gece boyu inkübe edilen taze kültürden LB besiyerine 1:10 oranında aşılama yapıldı. Hücreler, 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,45-0,55 olacak şekilde yaklaşık 1 saat üretildikten sonra 4 °C'de 4500 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Çökelti, 100 mM'lık 10 mL soğuk CaCl₂'de çözülerek, 30 dakika buzda bekletildi ve devamında 4000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısım dökülerek, pellet kısmı 100 mM'lık 2 mL soğuk CaCl₂'de çözüldükten sonra elde edilen kompetent hücreler 4 °C'de 2 saat bekletildikten sonra kullanıldı (Anh-Hue T., vd., 2016).

Kompetent hücreden 90 µL alınarak, 10 µL ligasyon ürününün üzerine eklenip 30 dakika buzda bekletildi. Daha sonra, 42 °C’de 2 dakika ısı şokuna uğratıldı ve 1 mL LB besiyeri içeren steril tüplere aktararak, 37 °C’de 175 rpm’de 1 saat boyunca üretildi. İnkübasyondan sonra üreyen kültürler 50 µg/mL ampisilin içeren LB agar petrilere örnek yayma ekim ile inoküle edildi. Petriler, gece boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan beyaz kolonilerden içerdikleri plazmit DNA’larını izole etmek için 50 µg/mL ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapılarak, 37 °C’de 200 rpm’de gece boyu inkübe edildi (Smajović vd., 2021).

2.3.6. Rekombinant Plazmitlerin Koloni PCR ile Teyit Edilmesi ve İzolasyonu

Koloni PCR reaksiyonunun hazırlanması için Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit (#K1232) kitinin protokolü takip edildi. Kit protokolüne göre hazırlanan koloni PCR reaksiyon karışımı Tablo 10’da yer almaktadır. PCR 95 °C’de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 30 döngü olacak şekilde 94 °C’de 30 saniye, 60 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 1,5 dakika ve son olarak da 72 °C’de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi.

Tablo 10. Koloni PCR reaksiyon karışımı

PCR bileşenleri	Miktar
10X Taq Pol buffer (KCl)	2,5 µL
pJET1.2 Fw primer	1,25 µL
pJET1.2 Rv primer	1,25 µL
25 mM MgCl ₂	2,5 µL
dNTP	0,2 µL
dH ₂ O	14,67 µL
Taq polimeraz enzimi (5 U/µL)	0,125 µL
Template (<i>gstLipC</i>)	2,5 µL
Son hacim	25 µL

Koloni PCR sonucunda istenilen uzunlukta bant görülen kolonilerden iki tanesi seçilerek Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0502, #K0503) ile Plazmit izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitlerden 20 µL alınarak NGS analizi ile DNA dizisinde mutasyon olup olmadığı incelendi.

2.3.7. *gstLipC*'nin pJET1.2/blunt Vektöründen Ekspresyon Vektörü pET28a(+)'ya Aktarılması

NGS analizi sonucunda *gstLipC* genini pET28a (+) ekspresyon vektörüne klonlamak için *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanıldı. Hem pJET1.2_*gstLipC* vektörü hem de pET28a (+) ekspresyon vektörü bu enzimler ile 2 saat boyunca 37 °C'de muamele edildi. Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunda oluşan farklı boyutlardaki DNA fragmentleri, jel elektroforezi ile ayrıldı ve istenilen fragment, jel ekstraksiyon kiti ile saflaştırıldı. Jelde temizlenen ürünler ligasyon işlemi için kullanıldı (Tablo 11). Ligasyon işlemi gerçekleştirilmeden önce elde edilen fragmentler küçük hacimleri ölçebilen bir spektrofotometrede (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c) ölçülerek, konsantrasyonları belirlendi. DNA fragmentlerinin vektöre aktarılması için kurulan ligasyon miktarı gen fragmentleri ve pET28a (+) vektörü ile 3:1 insört-vektör oranı olacak şekilde ligasyon reaksiyonu oluşturuldu.

Tablo 11. pET28a (+) ligasyon karışımı

Bileşenler	Miktar
pET28a(+)	3 µL
İnsert DNA (<i>gstLipC</i>)	5 µL
Buffer	1 µL
T4 DNA ligaz (400U/µL)	1 µL
Son hacim	10 µL

Hazırlanan ligasyon reaksiyonu 16 saat boyunca buz üzerinde bekletilerek reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Son olarak ligasyon ürünü *E. coli* DH10β konak hücresine transforme edildi. Oluşan kolonilerden koloni PCR reaksiyonu yapılarak klonlama doğrulandı.

2.4. Mutasyon İçin Docking (Yerleştirme) Analizi

2.4.1. Protein Homolojisi ve Moleküler Docking (Yerleştirme)

Tezin ana hedeflerinden biri, GstLipC'nin üzerinde mutasyon gerçekleştirilerek, enzimin aktivitesini arttırmaktadır. Bu çalışma doğrultusunda literatürde bulunan çalışmalar ve moleküler docking ile enzim substrat ilişkisi incelendi. İlk olarak, *Gebacillus* bakterisinin

farklı suşlarında bulunan GDSSL ailesi lipazlarının amino asit dizileri hizalandı ve farklılıklar kontrol edildi. Devamında GDSSL lipazların aktif bölgeleri ve aktif bölgesinin çevresinde yer alan amino asitler farklı biyoinformatik veritabanlarından yararlanılarak incelendi.

Protein homoloji analizi, bilinen protein dizileriyle hedef protein arasındaki benzerlikleri inceleyerek, hedef protein hakkında bilgi edinmeyi sağlar. Bu çalışma için, hedef proteinin amino asit dizisi, NCBI veritabanında bulunan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Ilene Mizrachi, 2007), Uniprot, PDB (Protein Data Bank) gibi araçlar kullanılarak, protein veritabanlarında bulunan homolog proteinlerle karşılaştırıldı (Vranken, 2007). Bu karşılaştırmalar dikkate alınarak Swiss-Model web sunucusunda GslLipC proteinin homoloji modellemesi yapıldı (Schwede vd., 2003). Oluşturulan modelin güvenilirliğini değerlendirmek için Ramachandran grafikleri, ProSA, Verify3D gibi araçlar kullanılarak yapının stereokimyasal uygunluğu, enerji profili ve çevresel uygunluğu analiz edildi (Dym vd., 2006; Wiederstein ve Sippl, 2007).

Protein yapısında nokta mutasyonu bölgesine karar vermek için, proteinin işlevini, stabilitesini veya etkileşim özelliklerini etkileyen bölgeler hedef alındı. Hedef bölgenin seçiminde proteinin aktif bölgesi, bağlanma bölgeleri, stabilite açısından kritik bölgeleri veya deneysel verilerle desteklenmiş alanlar dikkate alındı. Bu tür analizler için PyMOL ve Discovery Studio moleküler görselleştirme araçları kullanılarak GslLipC'nin yapısı incelendi. Ayrıca, mutasyonların etkisini tahmin etmek için Hotspot Wizard 3.0 ve SDM (Site-Directed Mutator) gibi yazılımlar kullanılarak stabilite değişiklikleri hakkında bilgiler edinildi (Sumbalova vd., 2018; Worth vd., 2011).

Protein-ligand etkileşimleri üzerinde mutasyonun etkisini anlamak için AutoDock4. ve COACH-D docking araçları kullanıldı. Docking işleminde, ligantların bağlanma enerjileri ve etkileşim bölgeleri değerlendirilerek, en düşük bağlanma enerjisine sahip konformasyonlar seçildi. Ayrıca, protein-ligand etkileşimini anlamak için PyMOL ve Discovery Studio görselleştirme araçlarıyla, bağlanma yüzeyleri ve etkileşim ağırları görselleştirildi. Docking sonucuna göre gerçekleştirilen mutasyonlar, Tablo 8'de yer almaktadır. Sonuçlar, PyMOL ve Discovery Studio programlarında incelendi. Son olarak moleküler simülasyon ve dinamik analizleri için; DyneMine ve FlexServ sunucularından yararlanıldı.

2.4.2. GstLipC Nokta Mutasyonu İşlemi

Mutasyon çalışmaları için Phusion™ High-Fidelity DNA Polimeraz kullanıldı. Mutasyon yapılacak bölgeler kararlaştırıldıktan sonra mutasyon primerleri tasarlandı (Tablo 12). Üretilen mutasyon primerleri ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Carrigan vd., 2011; Pouyan vd., 2022).

Tablo 12. GstLipC enzimi üzerinde nokta mutasyonu için tasarlanan primerler

Primer İsimleri	Primer Dizisi
LipC1_I184H_F	CACGTTGCCGAACSWCCCGGAAATCGATG
LipC1_I184H_R	CATCGATTTCGGGWSGTTCGGCAACGTG
LipC1_R196L-F_F	ATCGCCGAATGGAACYTCACAAGCCAAGCA
LipC1_R196L-F_R	TGCTTGGCTTGTGAR GTTCCATTCGGCGAT

Tasarlanan mutasyon primerleri birbirinin komplementeri şeklinde tasarlandı. Tasarlanan primerler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 13). PCR reaksiyonu için kalıp DNA olarak pET28_gstLipC rekombinant vektör kullanıldı.

Tablo 13. Mutasyon çalışması için gerçekleştirilen PCR reaksiyonun koşulları

Reaksiyon karışımı	Hacim			
5xPhusion HF Buffer	10 µL			
dNTP (10 mM)	1 µL			
Forward mutasyon primeri	1 µL			
Reverse Mutasyon primeri	1 µL			
Kalıp DNA (pET28_gstLipC)	1 µL			
Phusion HF DNA polimeraz	0,5 µL			
ddH ₂ O	35,5 µL			
98 °C	1,30 dakika			
98 °C	30 saniye	12X		
60 °C	30 saniye			
72 °C	7 dakika			
72 °C	10 dakika			
4 °C	∞			

Tablo 13'te yer alan reaksiyon koşulları kullanılarak rekombinant pET28_gstLipC vektörü nokta mutasyonu oluşturularak çoğaltıldı.

Mutasyon deney aşamaları;

- İlk olarak rekombinant pET28_gstLipC vektörü kullanılarak PCR yapıldı. Bu reaksiyonda mutasyon primerleri kullanıldı.

- PCR sonucunda elde edilen ürün *Dpn I* enzimi ile muamele edilerek ortamda bulunan halka DNA'nın (ortama konulan pET28_gstLipC vektörü) parçalanması sağlandı.
- Son olarak PCR sonucunda elde edilen DNA dizisi iki farklı çalışma için kullanıldı.
- Elde edilen mutantlar, NGS analizi sonucunda doğrulandı.

Elde edilen iki farklı mutant GstLipC enzimleri ile doğal GstLipC enzimlerin ekspres edildi ve saflaştırıldı.

2.5. Ekspresyon ve Saflaştırma Çalışmaları

2.5.1. *gstLipC* Genlerinin Ekspresyonu

E. coli BL21 Star (DE3) hücreleri CaCl_2 metodu ile kompetent hale getirildi ve transformasyon işlemi gerçekleştirildi (Anh-Hue T., vd., 2016). Transformasyon sonrası, transformantlar 50 µg/ml kanamisin bulunan LB agar üzerine yayılarak 16 saat 37 °C'de inkübe edildi. Oluşan kolonilerden bir tanesi seçilerek kanamisinli LB sıvı besiyerine (50 µg/ml) aşılandı ve 16 saat 37 °C'de inkübe edildi (Tan vd., 2014). İnkübasyon sonrasında, OD₆₀₀ 0,1 olacak şekilde kanamisinli LB sıvı besiyerine aşılandı ve 37 °C çalkalayıcı inkübatörde Tablo 14'de belirtilen farklı şartlarda ve farklı sürelerde ekspresyonu gerçekleştirildi (Jo vd., 2021a; Pirmanesh vd., 2021).

Tablo 14. Ekspresyon optimizasyonu için çalışılan koşullar

	Koşullar				Referanslar
OD	0,5 – 0,8	0,2-0,4 / 0,5 – 0,6	0,2-0,4 / 0,5 – 0,6	0,4 – 0,5	Jo, E. 2021, Hong-Gang Su vd. 2020, Natalia Kulminskaya, 2021, Gagandeep Kaur, 2016
IPTG	0,1 / 0,5/ 1,0 mM				
Kanamisin	100 µL (50 mg/ml)				
Hacim	100 ml (500 ml'lik erlen kullanıldı)				
Sıcaklık	37 °C	30 °C	18 °C	21 °C	
Süre	4 – 6 saat	16 saat	16 / 24 saat	16 saat	
Ekspresyon koşulları, 0,1, 0,5 ve 1 mM DTT kullanılarak tekrarlandı.					

30 °C, 1 mM IPTG, 0,2-0,3 OD₆₀₀, 16 saat ekspresyon koşullarında proteinin yoğun bir şekilde elde edildiği görüldü. Ekspresyon süresi tamamlandıktan sonra ürünü toplamak

için 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işleminde süpernatant kısmı atılarak pellet kısmı toplandı. Sonrasında pelletten proteini elde edebilmek için 100 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Pellet Tris-HCl tamponu ile çözüldükten sonra sonikasyon işlemine tabi tutuldu. 5 dakika sonikasyon işleminden sonra elde edilen ürün 60 °C de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında ürün 15 dakika 14.000 rpm’de santrifüjlenerek üzerindeki süpernatant kısmı alındı. Elde edilen ürün SDS-PAGE’de yürütülerek kontrol edildi.

2.5.2. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

Proteinin tahlili için SDS-PAGE yapıldı ve ardından jel Coomassie Brilliant Blue G-250 ile boyandı. Ayırma ve yürütme jeli olarak iki ayrı jelden oluşan SDS-PAGE’de ekspresyon sonuçları gözlemlendi. Proteinin boyutunu görüntülemek için %15’lik yoğunlukta SDS-PAGE (%30’luk akrilamid mix, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 1,5 M Tris-HCl pH 6,8, %10’luk SDS, %10’luk amonyum sülfat ve TEMED) kullanıldı (Srivastava ve Gupta, 2002). SDS-PAGE’e uygun miktarda örnekler yüklendi ve yürütüldü (Roy ve Kumar, 2014). Bu işlem bittikten sonra Coomassie Brilliant Blue G-250 boyama işlemiyle protein bantları görünür hale getirildi.

Zimogram analizi için, Native PAGE yapıldı. SDS gibi denatüre edici kimyasallar içermeyen jel SDS-PAGE protokolüne göre hazırlandı. Lipazın aktivitesini görebilmek için substrat olarak zeytin yağı kullanıldı. Örnekler, jelde yürütüldükten sonra jel, saf su ile 3 defa yıkandı. Daha sonra, jel Tris-HCl pH 8,0 tamponuna alınarak yaklaşık iki saat boyunca 60 °C’de inkübe edildi. Bu inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra jel, lipaz aktivitesinin mavi bant oluşumunu teşvik eden bir indik特ör olarak %0,05’lik metilen mavisi ile muamele edildi. (Escobar ve Cross, 2018).

2.5.3. GstLipC’nin Saflaştırılması

GstLipC’nin saflaştırılması için Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA kolonları kullanıldı. Saflaştırma işlemi, firmanın önerdiği tampon ve koşullar dahilinde gerçekleştirildi (Tablo 15).

Tablo 15. Saflaştırma işlemi için kullanılan tamponlar ve içerikleri

Gerekli Bufferlar	İçeriği
Equilibration Tamponu	PBS (20 mM Sodyum fosfat, 300 mM Sodyum klorür pH 7,4), 10 mM İmidazol, %0,3'lük β - merkaptotanol
Wash Tamponu	PBS (pH 7,4), 25 mM İmidazol, %0,3'lük β - merkaptotanol
Elution Tamponu	PBS (pH7,4), 250 mM İmidazol, %0,3'lük β - merkaptotanol
MES Tamponu	20 mM 2-(N-morfolin)-etansülfonik asit (pH 5,0), 0,1 M Sodyum Klorür

Saflaştırma işlemi başlamadan önce kolonu hazırlamak için 8-10 kolon hacminde Equilibration buffer kullanıldı. Devamında bu tampon ile hazırlanmış olan protein örneği kolona yüklendi. Bağlanmayan proteinlerin kolondan akması için 5 kolon hacminde Equilibration buffer eklendi. Buffer kolondan tamamen aktıktan sonra 5 kolon hacminde Wash buffer kolona eklenerek tutunmayan proteinlerin tamamen akması sağlandı. Son olarak Elution buffer kullanılarak bağlanan protein kolondan alındı. Saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra, kolon önce 5 kolon hacmi MES tampon, ardından 2 kolon hacmi saf su kullanılarak yıkandı. Son olarak, kolon % 20 etanol ile çözülerek saklandı. Saflaştırılmış protein, SDS-PAGE yardımı ile ayrıldı ve görüntülendi. Elde edilen GstLipC1'in, *p*NPP (p-nitrophenyl palmitate) substratı kullanılarak aktivitesi ölçüldü.

2.5.4. Bradford Yöntemiyle Protein Konsantrasyon Tayini

Protein konsantrasyon tayini Bradford (1976) metodu ile yapıldı. Protein standart grafiği oluşturmak için BSA (Bovin Serum Albumin) kullanıldı. 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 μ g konsantrasyonlarındaki BSA 0,15 M NaCl ile 100 μ L'ye tamamlandı. Her bir çözeltiye önceden hazırlanan 3 ml CBB-G250 boya solüsyonundan eklendi, örnekler vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından OD₅₉₅ nm'de ölçüm alınarak standart grafiği oluşturuldu (Bradford, 1976).

Çalışma boyunca protein konsantrasyon tayinleri standart grafik kullanılarak ölçüldü. Ölçüm için; 10 μ L protein, 90 μ L 0,15 M NaCl ve 3 ml CBB-G250 karıştırıldı, vortekslendi ve 15 dakika inkübasyonun ardından spektrofotometrede ölçüldü.

2.6. Yaban Tip ve Mutant Enzimlerin Karakterizasyonu

2.6.1. Optimum Sıcaklık

Yaban tip ve mutant enzimlerin en yüksek aktiviteyi gösterdiği optimum sıcaklık değeri 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110 °C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile *p*NPP (p-nirtofenil palmitat) varlığında belirlendi.

2.6.2. Optimum pH

Yaban tip ve mutant enzimlerin en uygun pH değerinin anlaşılması için farklı pH değerlerinde tamponlarla reaksiyon gerçekleştirildi. 50 mM sodyum sitrat tamponu (pH 3-6), 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7-8) ve 50 mM Tris-HCl (pH 8-9) tamponları kullanılarak optimum pH belirlendi.

2.6.3. Enzim Kinetiği

50 °C'de 50 mM Tris-HCl (pH 8) içersinde farklı konsantrasyondaki (0,2-1,6 mM) *p*NPP substratının hidroliz edilme oranı ölçüldü. Elde edilen verilerden yararlanılarak enzimin maksimum hızı (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabiti (K_m) saptandı. Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri oluşturuldu (Lineweaver ve Burk, 1934).

GstLipC ve diğer mutant enzimlerin kinetik parametreleri hesaplanırken iki farklı ortam koşulları oluşturuldu. Birinci olarak 0,1 mM Triton™ X-100 ve 1 mM imidazol varlığında reaksiyon gerçekleştirildi (Fingerhut vd., 2024; Lv vd., 2011).

2.6.4. Termal Kararlılık

Isının GstLipC ve mutant enzimlerin termal kararlılığına olan etkisinin anlaşılması için, belirlenen beş farklı sıcaklıklarda (60, 70, 80, 90 ve 100 °C) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite (%), optimum pH ve sıcaklıkta *p*NPP substratı ile 30 dakika reaksiyon gerçekleştirilerek ölçüldü.

2.6.5. Metal İyon Etkisi

Bu çalışmada, alkali metaller (KCl, NaCl), toprak alkali metaller (CaCl₂ ve MgCl₂), geçiş metaller (NiCl₂, MnSO₄, MnCl₂, CoCl₂, CuSO₄ ve FeCl₂) ile ağır metaller (HgCl₂) kullanılarak, yaban tip ve mutant enzimlerin aktivitesine olan etkileri incelendi. Enzim, ilave edilen 1 mM ve 5 mM metal tuzları pNPP substratı ile 60 °C’de 30 dakikalık inkübasyon sonrasında ölçülerek belirlendi. Metal tuzları olmadan enzimin aktivitesi, metal içeren enzimlerin kalan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla %100 olarak kabul edildi.

2.6.6. Deterjanların, İnhibitörlerin ve Organik Çözücülerin Etkileri

İyonik veya non-iyonik deterjanlar olan Tween® 20, Triton™ X-100, SDS (%1 v/v, %5 v/v), organik çözücü olarak propanol, Etanol, Metanol, İzopropanol, ACN (Asetonitril) DMSO (%5 v/v, %10 v/v), potansiyel inhibitör olarak PMSF, EGTA, DTT, EDTA ve DEPC (1 mM, 5 mM) kullanılarak 60 °C’de 30 dakika inkübasyon sonrası enzimin aktivitesi belirlendi. Deterjan, organik çözücü ve potansiyel inhibitörler olmadan enzimin aktivitesi, kalan aktivitenin belirlenmesi amacıyla %100 olarak kabul edildi.

2.7. *Geobacillus stearothermophilus*’a Gen Entegrasyonu

Gen entegrasyon çalışmaları için öncelikle belirlenen dört mutasyon enzimlerin pNW33N plazmitine klonlama çalışmaları yapıldı. Klonlama çalışmasını gerçekleştirmek için pNW33N plazmitinde bulunan restriksiyon enzim kesim bölgelerinden *gstLipC* gen dizisi için uygun olanı seçilerek primer tasarlandı.

Tablo 16. pNW33N plazmiti klonlama çalışmaları için tasarlanan primerler (yeşil renk ile gösterilen bölgeler restriksiyon endonükleaz enzim kesim bölgeleridir).

Primer Adı	Primer Dizisi	Restriksiyon Enzim Kesim Bölgesi
LipC1_F	C AAGCTT GACGGTGGGGATGG	<i>HindIII</i>
LipC1_R	C GGATCC GTTCGCCCACTC	<i>BamHI</i>

Tasarlanan primerler kullanılarak hem doğal *gstLipC* hem de mutant gen bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Devamında, pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanması için gerçekleştirilen yöntemler takip edildi (Başlık 2.3.3 ile 2.3.5 arasında anlatılmaktadır).

2.7.1. Elektroporasyon ile Transformasyon

Elektroporasyon çalışması için ilk olarak *Geobacillus stearothermophilus* 60 °C gece boyu inkübe edildi. Daha sonra, bu kültürden 1 mL alınarak tekrar 100 mL TSB besi ortamına eklendi ve 60 °C’de OD₆₀₀ nm’de 0,2-0,3 olana kadar çoğaltıldı. Sonrasında santrifüj yardımıyla hücreler toplandı ve kültür beş kez soğuk elektroporasyon tamponuyla (250 mM sakaroz, 1 mM HEPES pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 10 % gliserol) yıkandı. Son olarak, 2 mL elektroporasyon solüsyonu eklenen elektrokompotent hücreler -80 °C’de saklandı (Zarschler vd., 2009). 0,3 mL elektrokompotent hücre, su içinde çözölmüş 1 µg plazmit DNA eklendikten sonra buz içinde soğutulmuş elektroporasyon küvetlerine aktarıldı. Küvetler elektroporasyon sisteminde bulunan korumalı bölgeye yerleştirildikten sonra, sistem, hücre tipine uygun bir şekilde ayarlanarak elektrik akımı verildi (5 saniye). Elektroporasyonun ardından hücreler üzerine 0,5 mL buzda soğutulmuş LB eklenerek 55 °C’de 1,5 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin daha sonra uygun antibiyotik içeren LB agar petripleri üzerine ekimi yapıldı (Doruk ve Gedik, 2013).

2.7.2. Doğal Transformasyon

İlk olarak *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 suşu TSB (Tryptic Soy Broth) besi ortamına aşılandı ve gece boyu 55 °C inkübe edildi. Devamında gece boyu inkübe bakteriden yeni TSB besi ortamına aşılama yapılarak 6 saat 55 °C de inkübe edildi. Sonrasında 5 µL rekombinant pNW33N_gstLipC (mutant plazmitler) plazmiti alınarak üzerine 55 °C’de inkübe edilen kültürden 400 µL eklendi ve iki saat boyunca 60 °C’de inkübasyona bırakıldı. Son olarak, 7 µg/mL kloramfenikol bulunan TSA (Tryptic Soy Agar) besi ortamına ekimi yapıldı ve 60 °C’de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden alınarak 7 µg/mL sıvı besi ortamına aşılandı ve inkübe edilen bakteriler homolog rekombinasyon çalışmaları için kullanıldı.

2.7.3. Homolog Rekombinasyon

Homolog rekombinasyon için, rekombinant pNW33N plazmitinin bulunduğu *Geobacillus stearothermophilus*, 25 µg/mL TSA’da inkübe edildi. Homolog rekombinasyon iki aşamada gerçekleştirildi (Koyama vd., 2022). Çalışmanın ilk aşamasında, pNW33N taşıyan rekombinant plazmit aracılığıyla *Geobacillus stearothermophilus* genomuna

entegrasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla, rekombinant plazmite sahip bakteri, 25 µg/mL kloramfenikol içeren TSB (Tryptic Soy Broth) besiyerinde 65 °C’de 12 saat inkübe edildi. Elde edilen kültürden alınan örnek, aynı antibiyotik konsantrasyonunu içeren taze TSB besiyerine aktarılmış (birinci alt kültür) ve 65 °C’de 8 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlem üç defa tekrarlandı ve son alt kültürden elde edilen hücreler, 25 µg/mL kloramfenikol içeren TSA (Tryptic Soy Agar) plakalarına yayıldı ve 68 °C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerden seçilen koloniler antibiyotiksiz TSB besi ortamına aşılanarak 55 °C’de 8 saat boyunca büyütülmesi sağlandı. 8 saat sonucunda 100 µL alınarak tekrar yeni antibiyotiksiz TSB ortamına eklendi ve 8 saat daha 55 °C’de büyütüldü. Homolog rekombinasyondan sonra geriye kalan plazmidin dışarı atılmasını sağlamak için bu işlem, 5-6 defa tekrar edildi. TSB ortamında çoğaltılan bakteri 1/10 oranında seyreltilerek antibiyotiksiz TSA ortamına yayıldı. 16 saat boyunca 55 °C’de inkübasyona bırakıldı. Oluşan bakteri kolonileri hem antibiyotiksiz hem de antibiyotikli ortama maruz bırakıldı. Antibiyotikli ortamda çoğalmayan koloniler seçildi ve gen entegrasyon işlemi için qPCR çalışması gerçekleştirildi.

qPCR çalışmaları için mutant bölgelere özel TaqMan prob tasarlandı (Tablo 17). qPCR çalışmaları için Solis BioDyne polimeraz enzimi kullanıldı. qPCR koşulları firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 17. Homolog rekombinasyon taramaları için kullanılan TaqMan Problar (yeşil renk ile gösterilen bazlar mutasyon dizisini göstermektedir).

Prob adı	5’		3’
gstLipC_I184H	/5HEX/	TCGATTTCGGGGT AG TTGGGCAACG	/BHQ-1/
gstLipC_I184V	/5HEX/	TCGATTTCGGGGA C GTTGGGCAACG	/BHQ-1/
gstLipC_R196L	/5HEX/	CTTGGCTTGTG ARG TGCCATTCGGC	/BHQ-1/
gstLipC_R196F	/5HEX/	CTTGGCTTGTG ARG TGCCATTCGGC	/BHQ-1/

2.8. Rekombinant pNW33N_LipCmut Genlerinin *Geobacillus stearothermophilus*’ta Ekspresyonu

Bu aşamada hem rekombinant *Geobacillus stearothermophilus* hem de doğal *Geobacillus stearothermophilus* bakterisinde ekspresyon yapıldı. (Koyama vd., 2022; Zarschler vd., 2009). Ekspresyon çalışmaları Tablo 18’de yer almaktadır.

Tablo 18. Ekspresyon optimizasyonu için çalışılan koşullar

	Koşullar
OD	0,4- 1,0
Laktoz	0,5 / 1,0 mM
Kloramfenikol	7- 10 µg/mL
Hacim	50 mL (250 mL'lik erlen kullanıldı)
Sıcaklık	60 °C
Süre	16 saat

2.9. Sporulasyon Çalışmaları

2.9.1. Endospor Üretimi

Plazmit içermeyen ve rekombinant pNW33N-LipC (I184H, I184V, R196L ve R196F) plazmitlerini içeren *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 bakterilerinin herbiri uygun besi ortamı koşullarında üretildi. Sonrasında antibiyotikli (10 µg/mL kloramfenikol) ve antibiyotiksiz TSB besiyeri hazırlandı. Bakteriler TSB ortamda 24 saat boyunca 60 °C inkübe edildi. Bakteri yoğunluğu yaklaşık OD₆₀₀= 0,8-1 olunca, ortama 1 mM laktoz eklendi ve 60 °C'de 72 saat inkübasyona devam edildi. Devamında kültür, 65 °C'ye çıkarılarak 72 saat daha inkübe edildi ve oluşan sporları toplamak için kültür 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve pellet kısmı alındı.

2.9.2. Spor Boyama

Elde edilen sporları kontrol etmek için öncelikle malaşit yeşili ile boyama işlemi gerçekleştirildi. İncelenecek bakteri kültürü lam üzerine yayılıp oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan preparat, önceden hazırlanmış kaynar su banyosu üzerine yerleştirildi ve yüzeyi %5'lik malaşit yeşili ile kaplandı. Boyanın spor yapıları içine nüfuzunu kolaylaştırmak amacıyla preparat üzerine, lam boyutundan küçük kesilmiş kurutma kâğıdı yerleştirildi ve sürekli ıslak kalması sağlanacak şekilde belirli aralıklarla boya damlatılarak yaklaşık 5–6 dakika süreyle boyama gerçekleştirildi. Boyama süresinin sonunda kurutma kâğıdı uzaklaştırıldı ve preparat distile su ile nazikçe yıkandı. Devamında %0,5'lik sulu fuksin ile 20–30 saniye süreyle karşıt boyama yapıldı ve preparat tekrar yıkandıktan sonra kurutuldu.

Hazırlanan preparat, ışık mikroskobu altında incelendiğinde, spor yapılarının yeşil, vejetatif hücrelerin ise pembe-kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi (Kozuka ve Tochikubo, 1991; Reynolds vd., 2009).

2.9.3. Sporların Saflaştırılması

Doğal ve rekombinant pNW33N plazmitlerini içeren *Geobacillus stearothermophilus* bakterilerinden elde edilen sporların saflaştırılması için lizozim, %20-60 sakkaroz ve saf su kullanıldı (Tavares vd 2013; Zhao vd., 2008). Sporların saflaştırılması için aşağıdaki adımlar takip edildi.

- Kültürü hasat etmek için;

Geobacillus stearothermophilus bir sporulasyon ortamında üreterek sporlar oluşturuldu. Sporları ve hücreleri pellet haline getirmek için kültür 10.000 × g'de 10 dakika santrifüjlenerek pellet kısmı alındı. Elde edilen pelletler 2-3 defa steril su ile yıkandı.

- Isıl İşlem;

Yalnızca ıyıya dayanıklı olan sporların canlı kalabildiği bu adımda, kalan vejetatif hücreleri yok etmek için süspansiyonlar 80 °C'de 15-20 dakika inkübe edildi.

- Sporların yıkanması;

Pelletler steril damıtılmış su içerisinde tekrar süspanse edilerek 10 dakika boyunca 10.000 g'de santrifüj edildi ve üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı. Hücre atıklarını temizlemek için yıkama işlemi 3-5 kez tekrarlandı.

- Lizozim ile vejetatif hücrelerin parçalanması;

Geride kalan vejetatif hücreleri ve peptidoglikanları parçalamak için sporlar lizozim solüsyonu (son konsantrasyon ~100 µg/mL) ile 37 °C'de 30-60 dakika inkübe edildi. Sonrasında tekrar steril su ile yıkama işlemi yapıldı.

- Yoğunluk gradienti;

Sakkaroz kullanılarak yoğunluk gradienti oluşturuldu. Yoğunluk gradienti için %20, %40 ve %60 sakkaroz kullanıldı. Sonrasında sporlar sakkaroz gradientinin üzerine yerleştirildi ve 3000 g'de 30 dakika santrifüj edildi ve vejetatif hücre rezidülerinden daha yoğun olan sporlar %60 sakkaroz fazından alındı. Yıkama işlemi tekrar edildi ve sakkaroz rezidüleri uzaklaştırıldı. Son olarak, malaşit yeşili ile boyama yapıldı ve mikroskopta görüntülendi. Elde edilen sporları saklamak için +4 °C'ye kaldırıldı.

2.10. Germinasyon Çalışmaları

Yaban tip (vektör içermeyen) ve rekombinant pNW33N plazmitinin bulunduğu *Geobacillus stearothermophilus* 'tan elde edilen sporların çimlenmesi için ilk olarak D_{600} değerleri eşitlendi ($\sim 0,1-0,2$). Spor çimlenmesi için 5 mM L-alanin, Tris-HCl (pH 8,0) tamponu ve TSB besiyeri kullanıldı. Sporlar ilk olarak 80–85 °C'de 15 dakika inkübe ederek ısıyla aktive edildi. Devamında çimlenme tamponu ile muamele edilerek 60 °C'de inkübe edildi. Çimlenme süreci boyunca düzenli aralıklarla OD_{600} (her 15-30 dakikada bir) ölçüm alındı. Aynı zamanda OD_{405} 'te de düzenli aralıklarla ölçüm alındı. Bu aşamada çimlenme sırasında lipazın aktivitesi takip edildi (Georget vd., 2014, 2015).

2.11. Biyolojik İndikatörlerin Hazırlanması

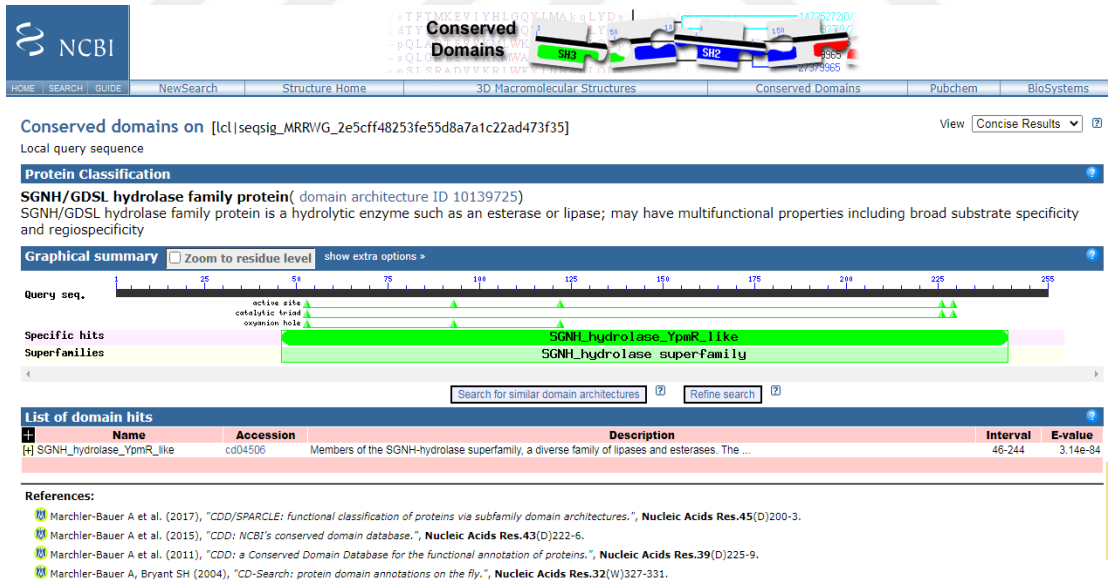
Sporların çimlenmesi ve biyolojik indikatörde kullanımını analiz etmek için Bionova, AX20 (Aksis) ve Lister marka biyolojik indikatörler ile karşılaştırıldı. Elde edilen yaban tip ve mutant sporlar bu indikatörlerin içinde bulunan çimlenme solüsyonu ile test edildi. Öncelikle bu biyolojik indikatörlerin içerisinde yer alan ticari sporlar çıkartıldı ve yerine laboratuvarı üretilen sporlar yerleştirildi.

İlk aşamada farklı spor konsantrasyonları kullanılarak spor miktarının optimizasyonu gerçekleştirildi. Spor konsantrasyonu belirlendikten sonra, sporlar biyolojik indikatörlerin içinde hem serbest halde hem de kurutma kâğıdına tutundurulmuş şekilde indikatörler içine yerleştirildi. Biyolojik indikatörler hazırlandıktan sonra içindeki çimlenme solüsyonu camı kırılmadan önce 80 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 60 °C'de inkübe edildi ve bu süreçte belirli aralıklarla ölçüm alındı. Sporların çimlendirme aşamasında hem OD_{600} hem de OD_{405} nm dalga boylarında ölçüm alınarak sporlaşma aşaması takip edildi.

3. BULGULAR

3.1. Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik analizler sonucunda, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953'ta bulunan GDSL ailesi lipazın (E.C. 3.1.1.3) amino asit dizisi elde edildi ve bu amino asit dizisini kodlayan gen bölgesi belirlendi (NCBI ID: RCTH01000033.1). *Geobacillus stearothermophilus*'un GDSL ailesi lipazının (GstLipC) (NCBI ID: GAA5659837.1) yapısı ve aktif bölgelerini belirlemek için farklı biyoinformatik araçlar kullanıldı. İlk olarak, bu enzimin amino asit dizisi NCBI veritabanından elde edildi. Daha sonra bu dizi NCBI CDD'de analiz edilerek hangi enzim grubunda yer aldığı belirlendi (Şekil 9) (Qin vd., 2024a). Biyoinformatik analiz sonucunda elde edilmek istenen DNA dizisi ve ona karşılık gelen protein dizisi belirlendi ve biyoinformatik analiz sonucunda elde edilmek istenen dizi için primerler tasarlandı.



Şekil 9. *Geobacillus stearothermophilus* 'ta bulunan GDSL ailesi lipazının NLM CCD veritabanında analizi sonucu

NLM CDD veritabanından elde edilen sonuca göre bu enzim SGNH_Hidrolazlar_YmpR_benzeri lipazlar olarak sınıflandırıldı. Bu çalışma doğrultusunda literatürde bulunan çalışmalar incelendi. Moleküler docking yöntemiyle

enzim-substrat ilişkisi analiz edildi. İlk olarak, *Gebacillus* bakterisinin farklı suşlarında bulunan GDSL ailesi lipazlarının amino asit dizileri hizalandı ve farklılıklar kontrol edildi (Şekil 10). Devamında, farklı biyoinformatik veritabanlarından yararlanılarak bu bölgeler incelendi. Bu araştırmalar sonucunda uygun mutasyon bölgelerine karar verildi ve LipC geni üzerinde iki farklı nokta mutasyonu gerçekleştirildi. Bu çalışmanın sonucuna göre diğer mutasyon çalışmaları da yapıldı.



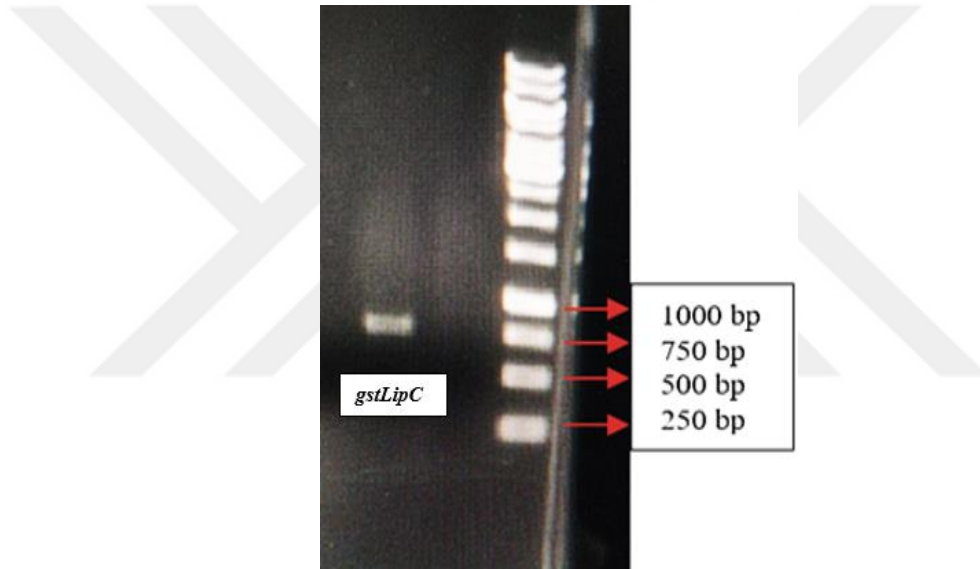
Şekil 10’da yer alan hizalama sonucunda GstLipC enziminin aktif bölgeleri ve mutasyon çalışmasının yapıldığı bölgeler gösterildi. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerin sonucunda GstLipC’nin katalitik mekanizmasında Ser-His-Asp (Glu) üçlüsünün yer aldığı belirlendi.

3.2. Klonlama Çalışmaları

3.2.1. *Geobacillus stearothermophilus*'tan Genomik DNA İzolasyonu

Geobacillus stearothermophilus'un genomik DNA izolasyonu için Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanıldı. İzolasyon işlemi, üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi.

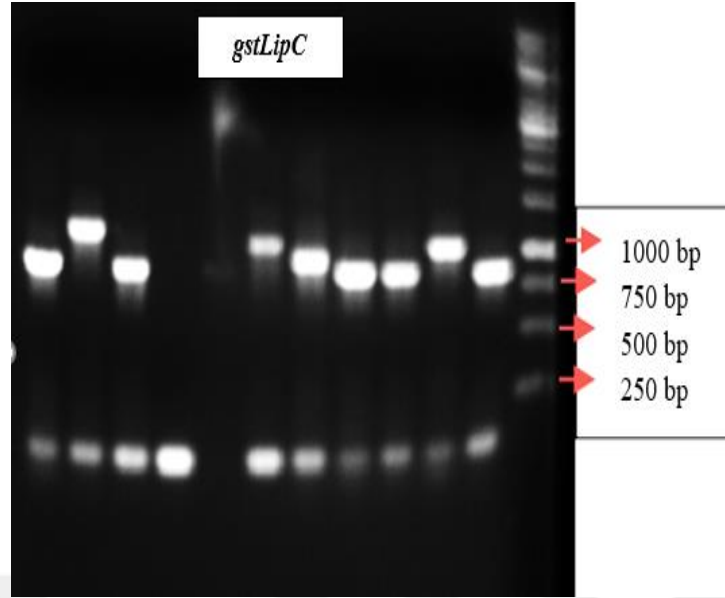
İzolasyon sonucunda elde edilen genomik DNA ve *gstLipC* geni için tasarlanan primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. Amplifikasyon sonucu elde edilen *gstLipC* geni jel elektroforez yöntemiyle görüntülendi (Şekil 11).



Şekil 11. *gstLipC* genine yönelik PCR sonucu; yaklaşık 750 bp büyüklüğünde hedef DNA fragmenti görülmektedir. Marker olarak GeneRuler 1 kb DNA ladder (SM0311) kullanılmıştır.

3.2.2. *gstLipC* Geninin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması

Jel elektroforezinde görüntüledikten sonra, PCR ürünü kullanılarak pJET1.2/blunt vektörüne klonlama işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen rekombinant pJET1.2_*gstLipC* vektörü, *E.coli* DH10 β hücrelerine transforme edildi. Rekombinant vektörlerin (pJET1.2_*gstLipC*) tespiti için koloni PCR uygulandı. Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Teyit edilen klonların bulunduğu koloniler belirlendi (Şekil 12).

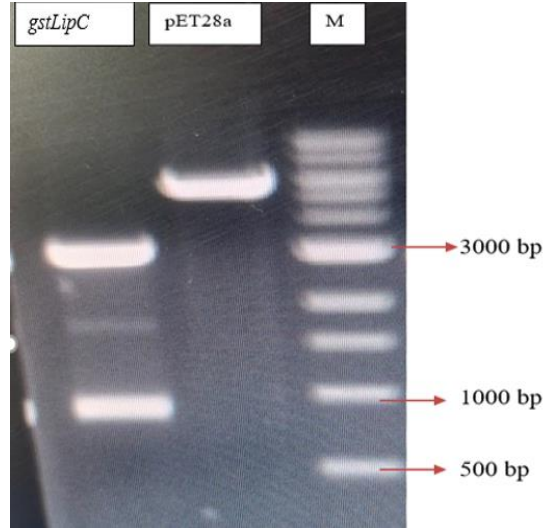


Şekil 12. pJET1.2_gstLipC klonlama çalışması koloni PCR fragmentleri

Doğru uzunluktaki PCR ürünlerini içeren kolonilerden 37 °C’de gece kültürleri hazırlandı. İzole edilen plazmitler uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek, klonlamalar tekrar teyit edildi.

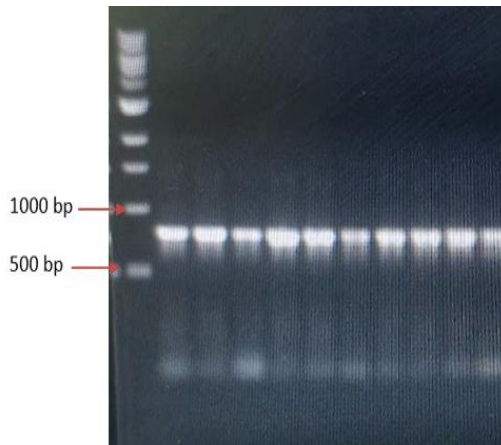
3.2.3. *gstLipC* Geninin pET28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

pJET1.2_gstLipC rekombinant vektörünü taşıyan hücreler, yüksek hacimli gece kültürlerinde çoğaltıldıktan sonra, rekombinant plazmitler izole edilip uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Klonlamanın yapılacağı pET28a(+) ekspresyon vektörleri de aynı restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 13).



Şekil 13. *gstLipC* ve pET28a(+) ekspresyon vektörünün restriksiyon enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen jel elektroforez görüntüleri, Şekilde, *gstLipC* (~750) ve pET28a (+) ekspresyon vektörünün (~5500) *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile muameleleri sonucu elde edilen bantlar gösterilmektedir. M ile ifade edilen NEB 1 kb DNA ladder'dır (N3232S).

Restriksiyon enzimleri ile muamele edilen ürünler, jel elektroforezi ile görüntülendikten sonra, jelden temizlenip ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü, gece boyu buzlu suda inkübe edildikten sonra, *E.coli* DH10 β kompetent hücrelerine transformasyon yapıldı. Transformasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilenler üzerinde koloni PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonuçlar jel elektroforezi yardımıyla görüntülendi (Şekil 14).



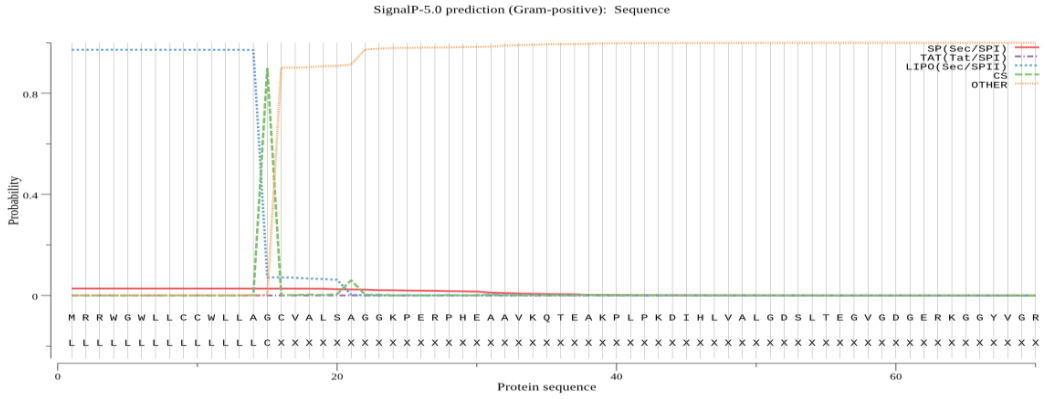
Şekil 14. pET28_*gstLipC* rekombinant plazmitinin *E.coli* DH10 β kompetent hücrelerine transformasyonu sonucunda oluşan kolonilerden elde edilen koloni PCR ürünleri. Marker olarak, NEB 1 kb DNA ladder kullanıldı.

Koloni PCR sonucuna göre seçilen tüm kolonilerin klon olduğu tespit edildi. Elde edilen kolonilerden biri seçilerek plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmit, *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek *gstLipC*'nin varlığı doğrulandı. Son olarak, NGS analizi ile *gstLipC*'nin pET28a (+) ekspresyon vektörüne başarılı bir şekilde klonlandığı doğrulandı. Klonlama işlemi tamamlandıktan sonra mutasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

3.3. Mutasyon Çalışmaları

3.3.1. Protein Homolojisi ve Moleküler Docking

GstLipC'nin amino asit dizisi, NCBI veritabanında bulunan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), Uniprot, PDB (Protein Data Bank) gibi araçlar kullanılarak, protein veritabanlarında bulunan homolog proteinlerle karşılaştırıldı. Aynı zamanda, proteinin N-terminalinde sinyal dizisi, <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/> adresindeki SignalP 5.0 ile analiz edildi (Şekil 15).

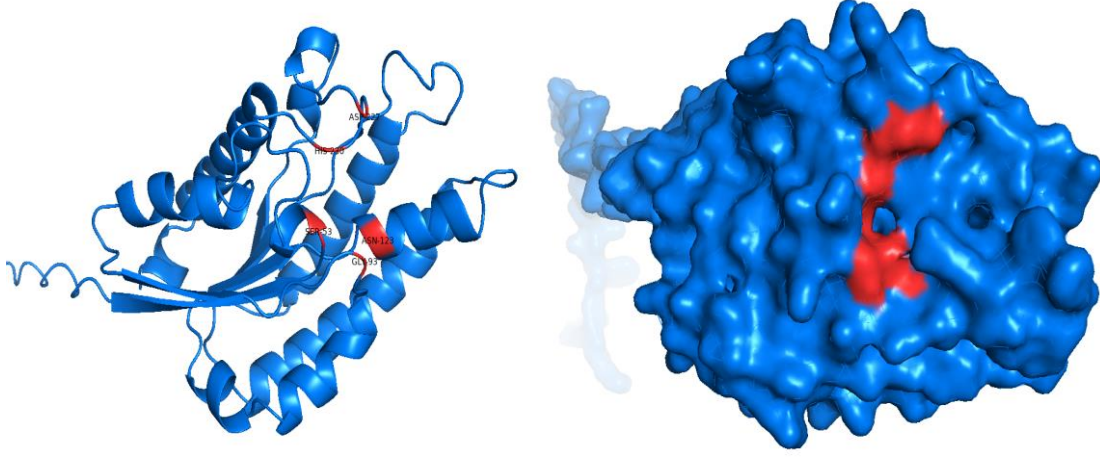


Şekil 15. SignalP 5.0 ile GstLipC sinyal peptit tahmini

GstLipC'nin sinyal dizisinin daha detaylı analizi için ScanProsite web sunucusu kullanıldı. ScanProsite programındaki analiz sonucunda "MRRWGWLLCCWLLAGCV" amino asit dizisinin Lipo (Sec/SPII) sinyal dizisi olduğu belirlendi.

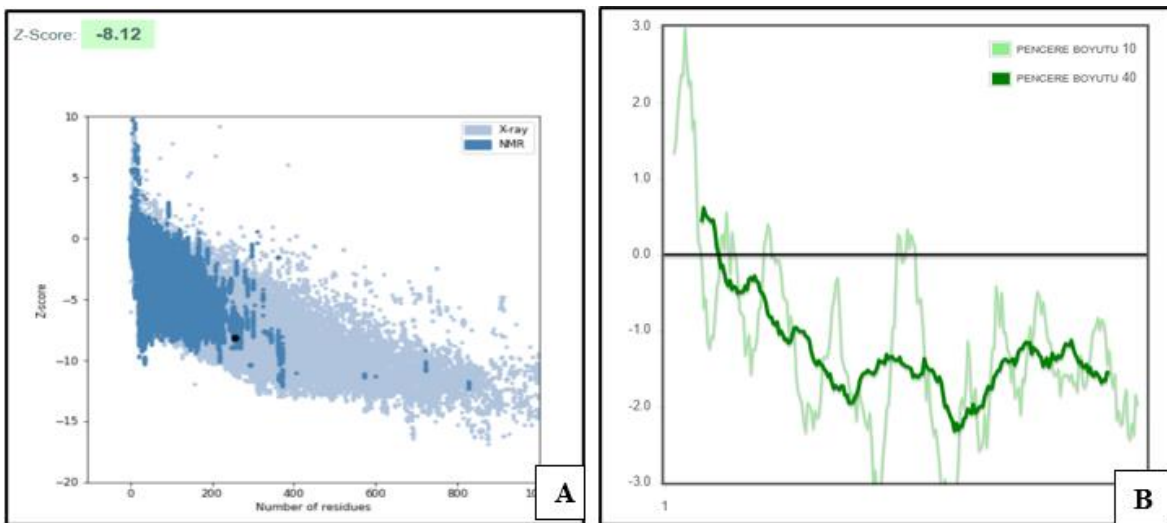
Bu karşılaştırmalar dikkate alınarak, Phyre2.2 ve Swiss-Model web sunucularında GstLipC'nin homoloji modellemesi yapıldı. Homoloji modelleme sonucunda, *Geobacillus* sp. PA-3 suşunun GDSDL ailesi lipazı ile %76 sekans benzerliğine sahip olduğu görüldü. Bununla birlikte, GMQE (Küresel Model Kalite Tahmini) değeri 0,87 olduğu belirlendi.

Homoloji modellemesi tamamlanan GstLipC'nin, PyMol programı yardımıyla RMSD değeri 0,052 olarak tespit edildi.



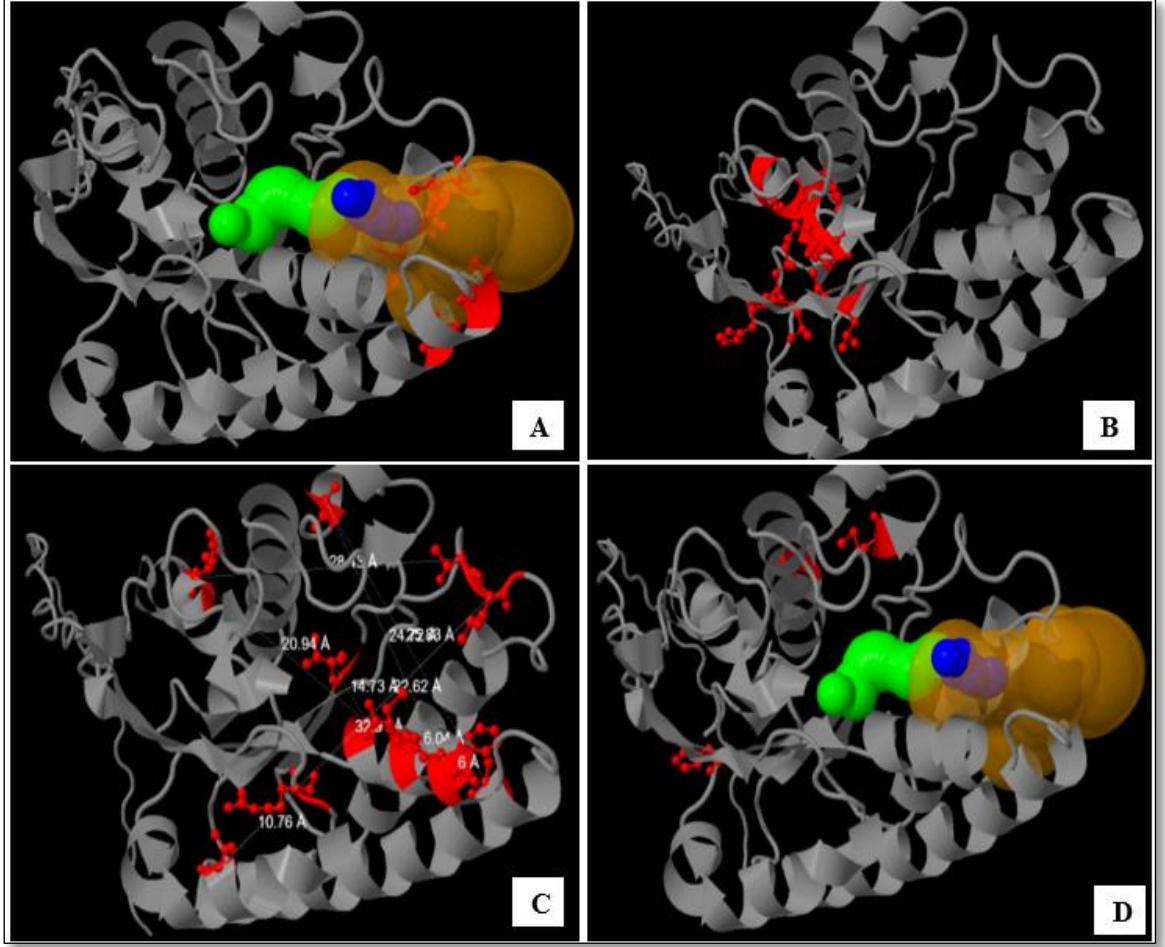
Şekil 16. GstLipC'nin 3D görüntüsü (Swiss-Model)

Oluşturulan modelin güvenilirliğini değerlendirmek için Ramachandran grafikleri, ProSA, Verify3D gibi araçlar kullanılarak yapının stereokimyasal uygunluğu, enerji profili ve çevresel uygunluğu analiz edildi. Verify3D Errat sonucu, 97.2973 olarak tespit edildi. ProSA programında, Z-skor grafiği ve model kalitesini gösteren grafikler incelendi (Şekil 17).



Şekil 17. GstLipC 3D model analizleri (ProSA) A: GstLipC'nin Z-skor grafiği, B; amino asitlerin enerji puanı grafiği

ProSA programında, Z-skor grafiği modellenmiş olan proteinin kalitesini göstermektedir. Bu tür analizler sonucunda GstLipC'nin 3D yapısına karar verildi. Daha sonra PyMOL ve Discovery Studio moleküler görselleştirme araçları ile GstLipC yapısal olarak incelendi. Ayrıca, mutasyonların etkisini tahmin etmek için Hotspot Wizard 3.0 kullanılarak stabilite değişiklikleri hakkında bilgiler edinildi (Şekil 18).



Şekil 18. GstLipC'nin aktif ve stabilitede etkili bölgelerinin gösterimi (Hotspot Wizard 3.0) A; Katalitik erişim tünellerinde yer alan oldukça değişken amino asitleri temsil eden fonksiyonel bölgeler, B; Esnek amino asitleri temsil edilen kararlılığa etki eden bölgeler C; Kararlılıkta rol oynayan amino asitlerin birbirine uzaklığı ve etkileşimi, D; Enzim stabilitesinde etkili sıcak bölgeler

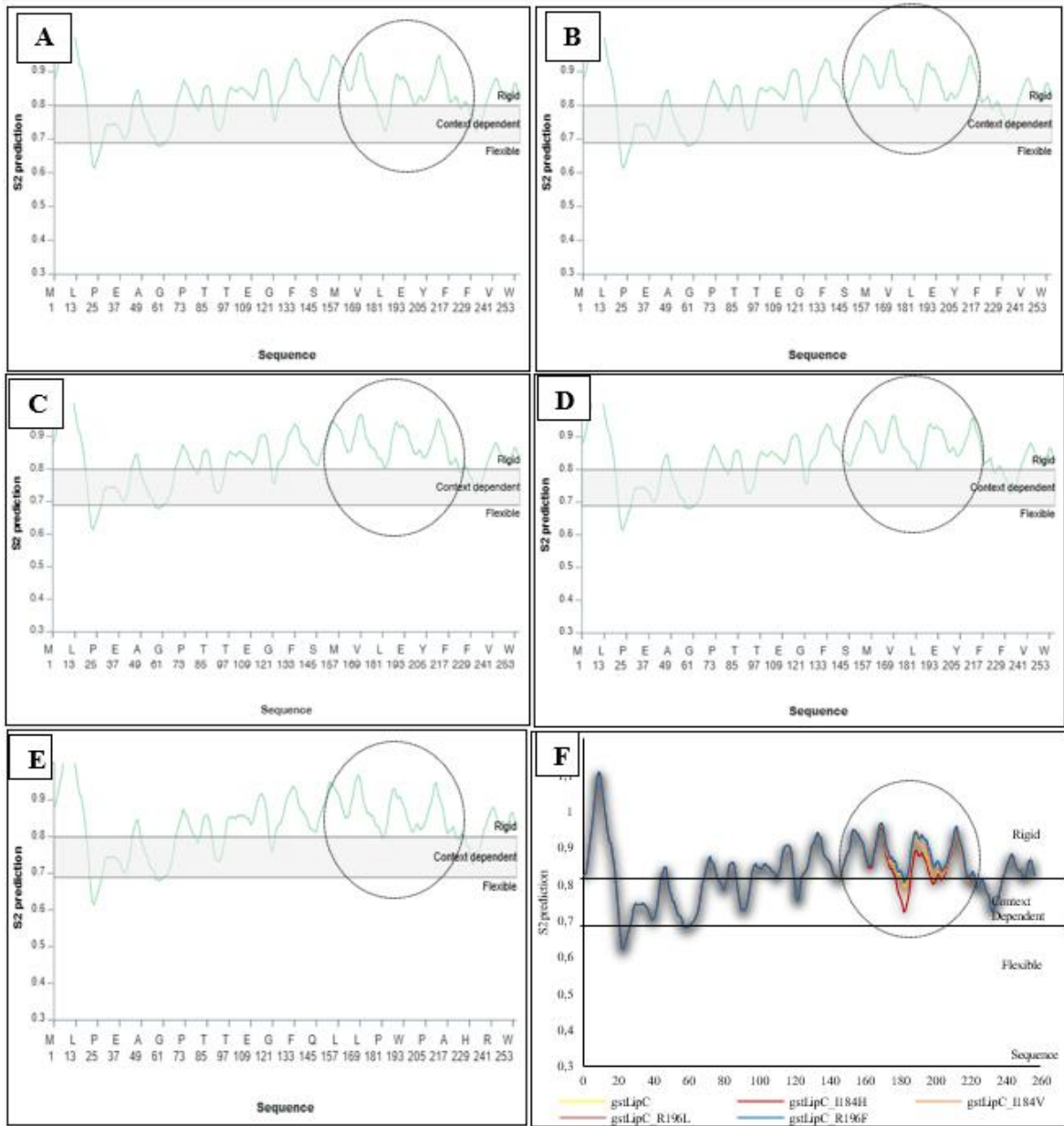
Protein-ligand etkileşimleri üzerinde mutasyonun etkisini anlamak için AutoDock4. ve COACH-D docking araçları kullanıldı. Homoloji modelleme yoluyla elde edilen üç boyutlu protein yapısı, potansiyel küçük moleküllerle etkileşimini simüle etmek amacıyla AutoDock4.0 yazılımı ve COACH-D web sunucusu kullanılarak analiz edildi. Docking işleminde, ligandların bağlanma enerjileri ve etkileşim bölgeleri değerlendirilerek, en düşük

bağlanma enerjisine sahip konformasyonlar seçildi. Ayrıca, protein-ligand etkileşimini anlamak için PyMOL ve Discovery Studio görselleştirme araçlarıyla, bağlanma yüzeyleri ve etkileşim ağları görselleştirildi. Docking sonucuna göre gerçekleştirilen mutasyonlar Tablo 23'te yer almaktadır. Sonuçlar, PyMOL ve Discovery Studio programlarında incelendi.

Tablo 19. GstLipC'nin mutasyon noktaları ve bağlanma enerjileri

Mutasyon Noktaları	Bağlanma Enerjisi
GstLipC	-5,48
GstLipC_I184V	-8,61
GstLipC_I184H	-7,74
GstLipC_R196F	-6,27
GstLipC_R196L	-6,52

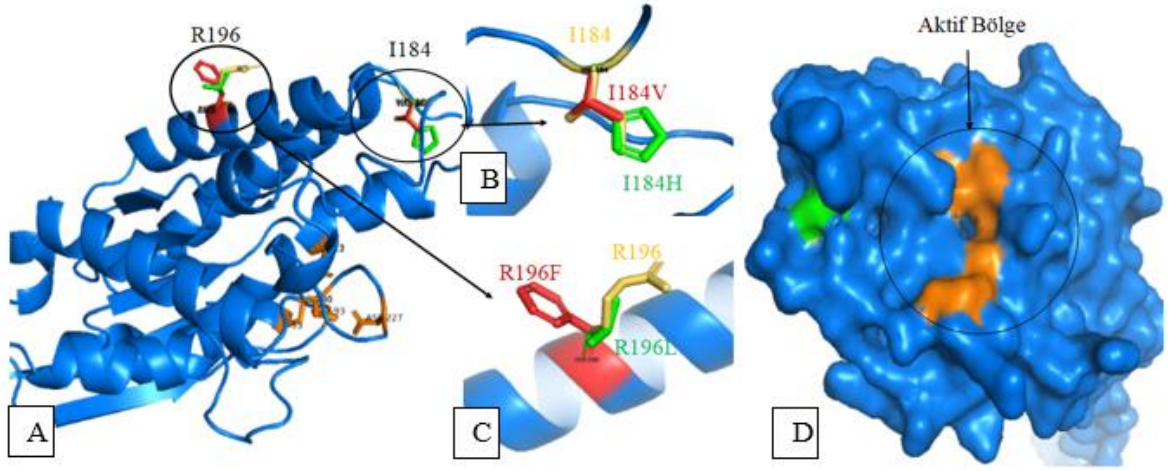
GstLipC üzerinde gerçekleştirilecek olan mutasyon bölgeleri belirlendikten sonra Moleküler dinamik ve simülasyon çalışmaları ile proteindeki yapısal değişiklikler incelendi. Bu analizlerde, DyneMine ve FlexServ sunucuları kullanıldı (Şekil 19). Son olarak, doğal ve mutant proteinler PyMOL ve Discovery Studio programlarında karşılaştırmalı olarak incelendi.



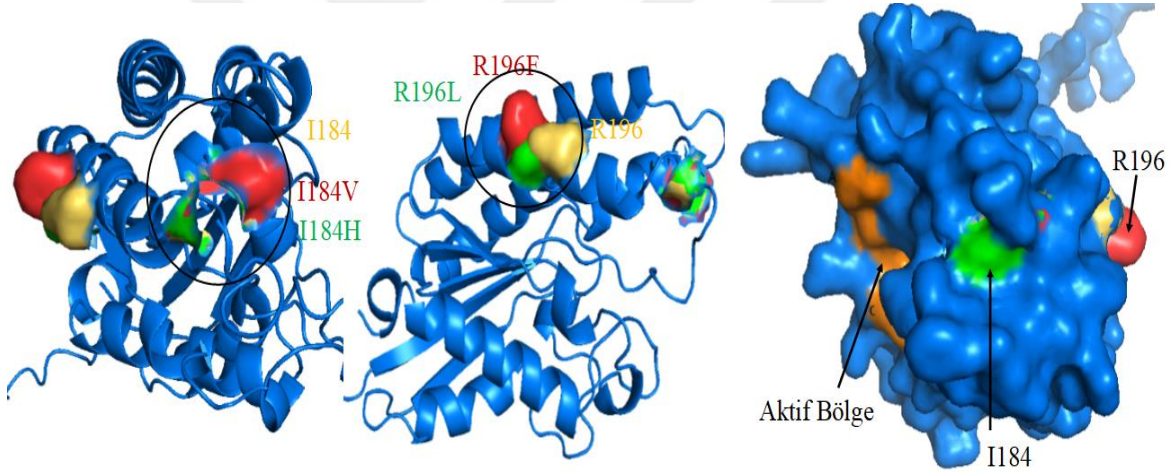
Şekil 19. GstLipC ve mutant proteinlerin DyneMine programı ile analizleri. A; GstLipC_I184H, B; GstLipC_I184V, C; GstLipC_R196L, D; GstLipC_R196F, E; GstLipC, F; yaban tip ve mutant enzimlerin DyneMine sonuçlarının üst üste getirilmesi sonucu.

DyneMine program ile Şekil 19'daki grafikler elde edildi. GstLipC_I184H mutasyonunun yaban tip ve diğer mutant enzimlere göre daha esnek bir yapıya sahip olduğu belirlendi.

PyMOL programı kullanılarak GstLipC'nin üç boyutlu yapısı ve mutasyon bölgeleri incelendi (Şekil 20, 21). Yapılan analizler sonucunda, mutasyonların proteinin üç boyutlu yapısında belirgin bir yapısal değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi.



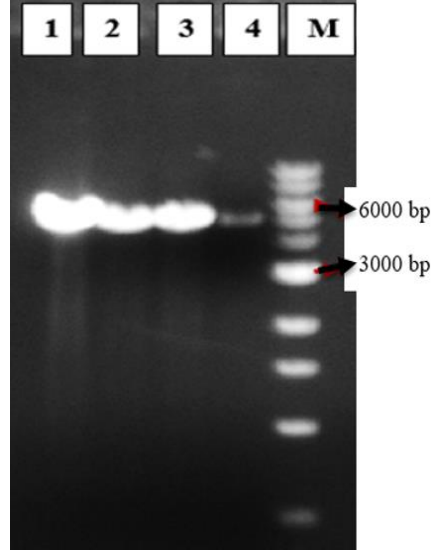
Şekil 20. GstLipC'nin mutasyon uygulanan pozisyonlarının genel gösterimi (PyMOL): A; GstLipC proteinin 3D yapısı gösterilmektedir. B; I184 pozisyonunda uygulanan mutasyonlar. C; R196 pozisyonunda uygulanan mutasyonlar D; GstLipC'nin aktif bölgesini gösteren genel üç boyutlu yapısı



Şekil 21. GstLipC'nin 3D yapısı ve mutasyon uygulanan bölgelerin PyMOL programının sonuç görüntüleri: Bu resimde mutasyon işlemi gerçekleştirildiğinde GstLipC'nin 3D yapısında oluşan değişiklik gösterilmektedir

3.3.2. *GstLipC* Geninde Mutasyon Oluşturulması

Mutasyon çalışmaları için Phusion™ High-Fidelity DNA Polimeraz enzimi kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği koşullarda PCR reaksiyonu gerçekleştirildi ve sonuçlar jel elektroforezi ile görüntülendi (Şekil 22).



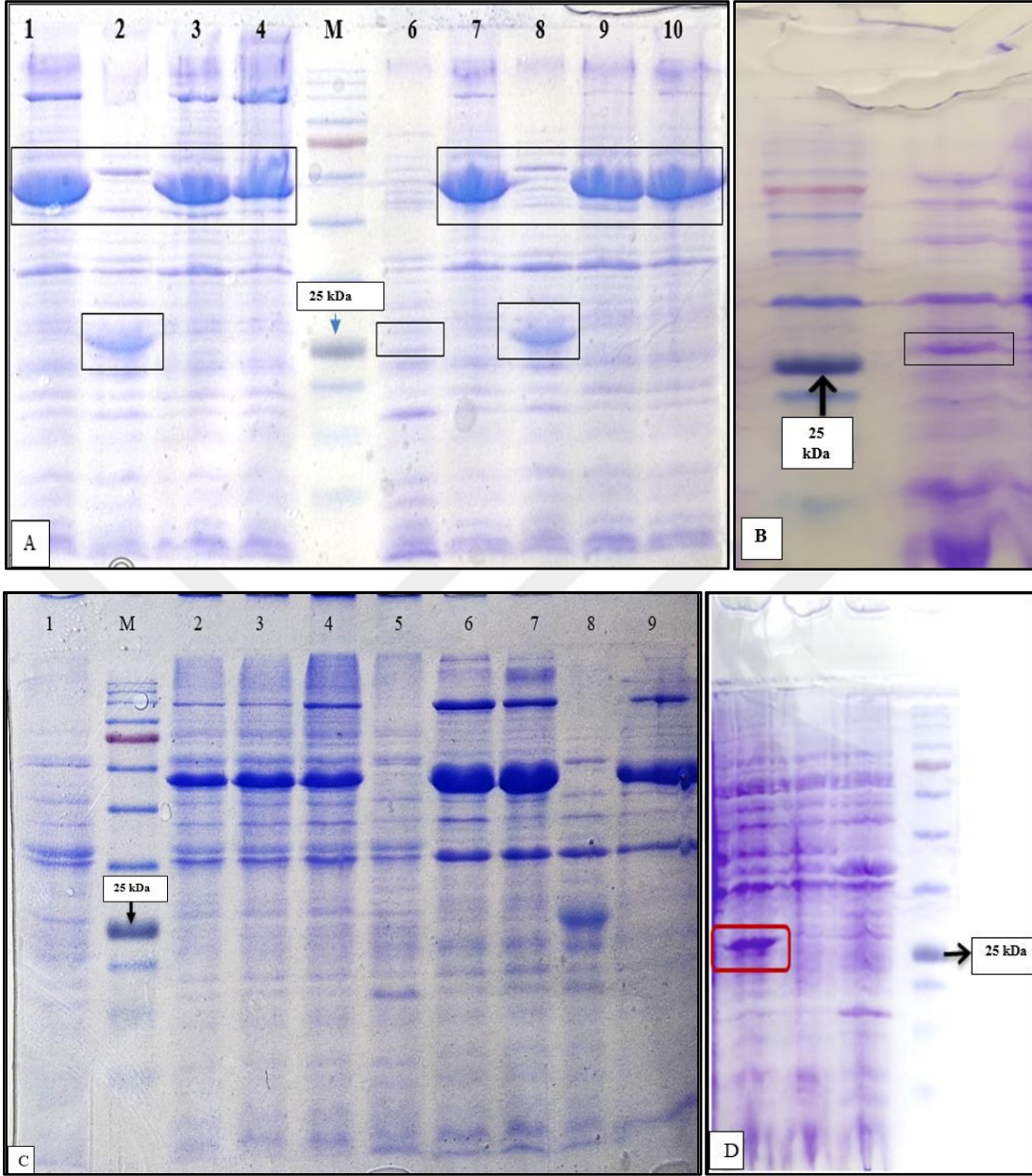
Şekil 22. Farklı GstLipC mutasyonlarının PCR ürünlerine ait jel elektroforez görüntüsü 1; GstLipC_R196L, 2; GstLipC_R196F, 3; GstLipC_I184H, 4; GstLipC_I184H M: Marker olarak NEB 1 kb DNA ladder (Marka Katalog no: N3232S) kullanıldı.

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen mutant ürünler, *E. coli* DH10 β kompetent hücrelerine transforme edildi. Elde edilen koloniler, ilk olarak koloni PCR ile tarandı. Ardından, birer tane koloni seçilerek, NGS analizi ile mutasyon işleminin doğruluğu teyit edildi. Son olarak, plazmitler, *E. coli* BL21 (DE3) Star'a transforme edildi.

3.4. Ekspresyon Çalışmaları

3.4.1. Yaban tip ve Mutant Enzimlerin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

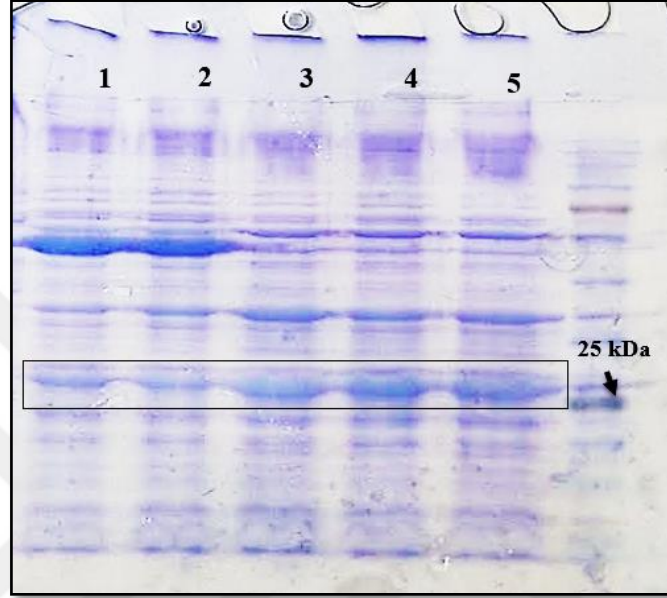
Proteinin tahlili için proteinler SDS-PAGE'de yürütüldü ve ardından Coomassie Brilliant Blue G-250 ile boyandı (Şekil 23). Şekil 23A'da yer alan 1–6 numaralı bantlar farklı enzim varyantlarının protein profillerini gösterirken, 7–10 numaralı bantlar aynı örneklerin 1 mM DTT ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein profillerini temsil etmektedir.



Şekil 23. GsLipC ve mutant ekspresyonların SDS-PAGE görüntüleri. A resmindeki örneklerden 1 ile 6 hatlar sırasıyla GsLipC-I184H, GsLipC_I184V, GsLipC_R196L, GsLipC_R196F, GsLipC, 7-10 arası örnekler 1 mM DTT ile muamele edilmiş GsLipC_I184V, GsLipC_I184H, GsLipC_R196L örnekleridir (30 °C). B; Siyah kutucukta gösterilen 18 °C’de ekspres edilen GsLipC’ye ait ekspresyon sonucu. C; 1 nolu örnek GsLipC, 2, 3 ve 4 hatlar sırasıyla GsLipC_I184H, GsLipC_R196L, GsLipC_R196F’ nin (18-21 °C) ekspresyon sonuçları. D; GsLipC enziminin 18-21 °C’deki ekspresyon sonucu.

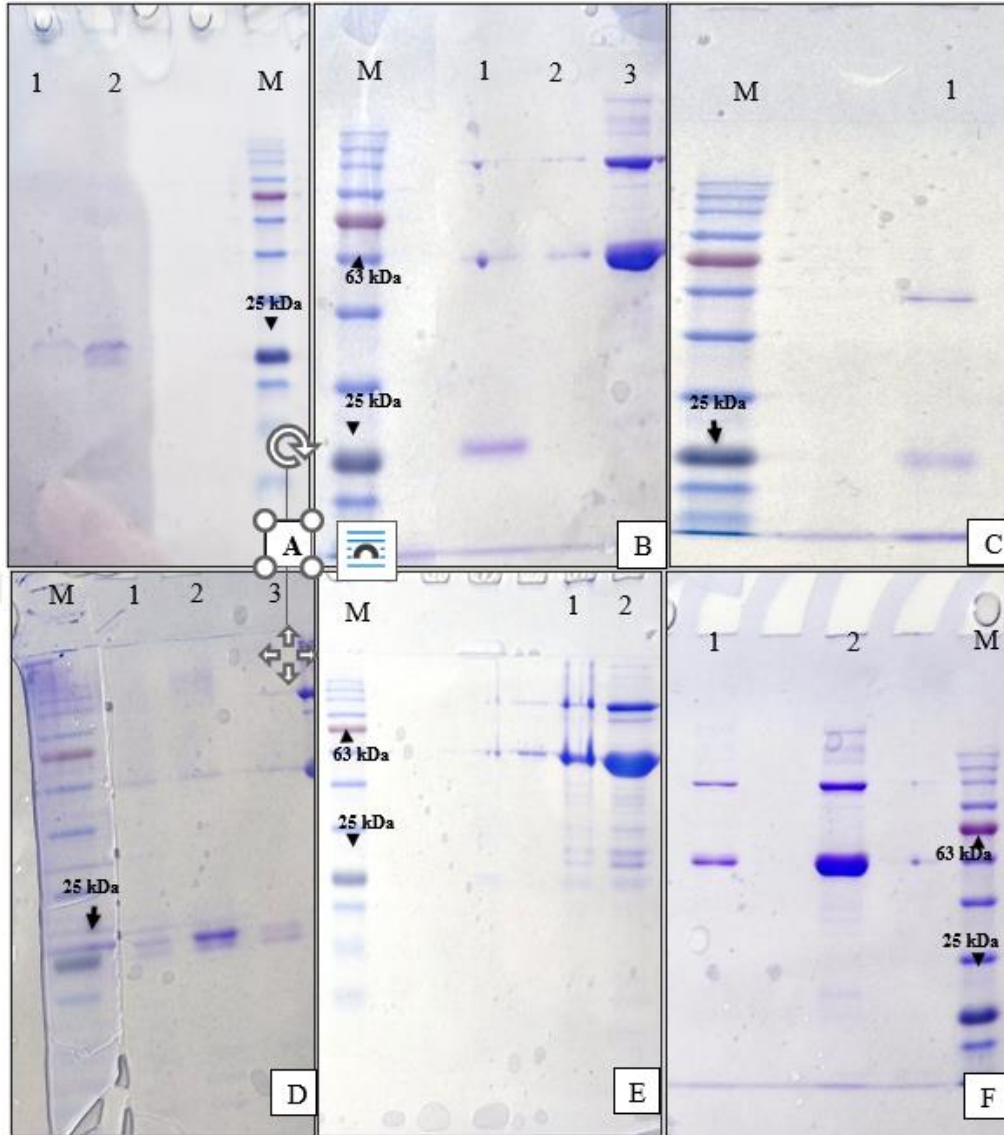
Bu çalışmanın sonucunda GsLipC ve GsLipC_I184V’nin bant profili ~28 kDa’da gözlemlenirken diğer örneklerin bulunduğu yer ise protein bandının iki katına denk gelen ~58 kDa’lık bölgede yer aldığı görüldü.

Ekspreyon sonucunda ~28 kDa'lık protein bandını elde edebilmek için ekspresyon koşullarında aynı şekilde 0,5 ve 1 mM DTT eklenerek ekspresyon işlemi gerçekleştirildi. 0,5 mM DTT varlığında proteinlerin daha düzgün bir katlanma işlemi gerçekleştirdiği görüldü (Şekil 24).



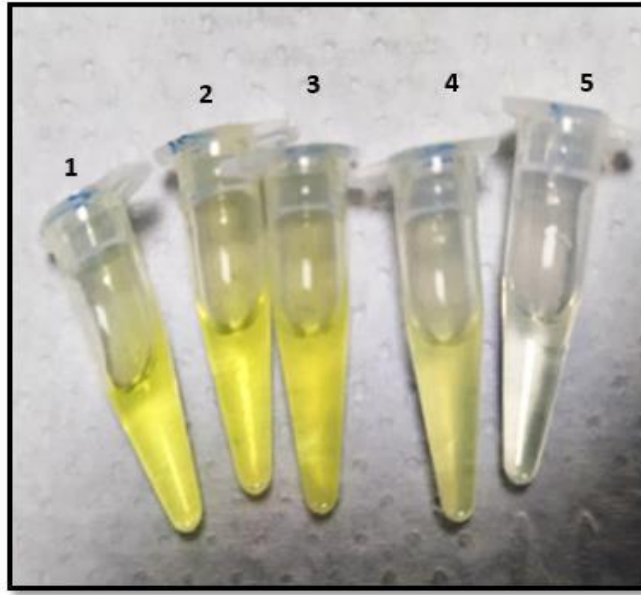
Şekil 24. DTT kullanılarak gerçekleştirilen ekspresyonların SDS-PAGE görüntüsü. 1; GstLipC_R196F, 2; GstLipC_R196L, 3; GstLipC_I184V, 4; GstLipC_I184H ve 5: GstLipC.

Şekil 24'de görüldüğü gibi 0,5 mM DTT varlığında yaban tip ve mutant enzimlerin ~28 kDa'da yoğun ekspresyon bandı elde edildi. Bütün proteinlerin aktiviteleri kontrol edildi ve Ni-HisTag rezini kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Saflaştırma yapılırken ~58 kDa da bulunan proteinin kolondan daha geç aktığı görüldü. Bu şekilde ~28 kDa ve ~58 kDa'da bulunan enzimler ayrıldı (Şekil 25).



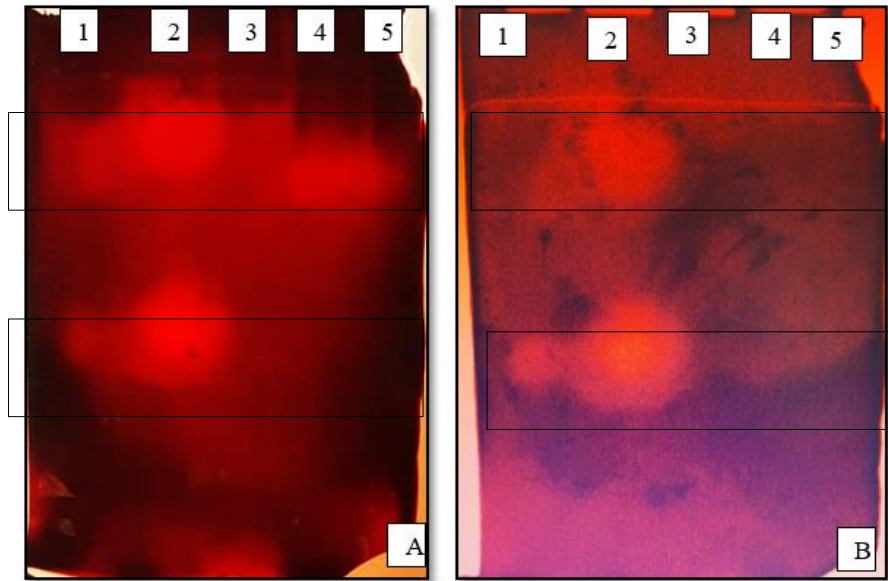
Şekil 25. GslLipC ve mutant enzimlerin saflaştırılması çalışmalarının SDS-PAGE görüntüleri, A; 1 ve 2 GslLipC enzimi saflaştırmaları, B: GslLipC_I184H mutasyonunun gradient saflaştırma sonucu sırasıyla ilk üç tüpe alınan örnekler, C; GslLipC_I184V mutasyonunun saflaştırmaları, D; D1: GslLipC_R196L, D2: GslLipC_I184H ve D3: GslLipC_R196F örneklerinin saflaştırılması sonucunda elde edilen ilk fraksiyon içerik görüntüsü, E ve F; GslLipC_I184H, GslLipC_R196F ve GslLipC_R196L proteinin gradient oluşturmada elde edilen saflaştırma görüntüsü, M olarak ifade edilen protein markırıdır (GeneDirex, Cat no:PM008-0500)

Gerçekleştirilen her ekspresyon çalışmasının sonunda ve saflaştırma çalışmalarının sonunda enzimlerin aktiviteleri *p*NPP substratı ile analiz edilerek renk değişimi görüldü (Şekil 26). Hepsinde benzer sonuç elde edildiği için örnek olarak şekil 24 e bir örnek gösterilmektedir.



Şekil 26. Saflaştırılmış GtsLipC1 ve mutant enzimlerin aktivite görüntüleri. A: Bu resimdeki protein bantlarının boyutu ~ 28 kDa 'dır. Örnekler sırasıyla GstLipC, GstLipC-I184V, GstLipC-I184H, GstLipC-R196L ve Negatif kontrol.

Saflaştırma işlemlerinin tamamlanmasının ardından, elde edilen protein bantlarının enzimatik aktiviteleri zimogram analizi yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 27). Yapılan analiz sonucunda, 58 kDa ve 28 kDa moleküler ağırlığındaki protein bantlarının enzimatik olarak aktif olduğu tespit edildi.



Şekil 27. Ticari ve mutant GtsLipC enzimlerin zimogram analizi sonucu. A-B1: Ticari Lipaz, A-B2: GstLipC_R196F , A-B2: GstLipC_R196L, A-B2: GstLipC_I184H, A-B2: GstLipC_I184V.

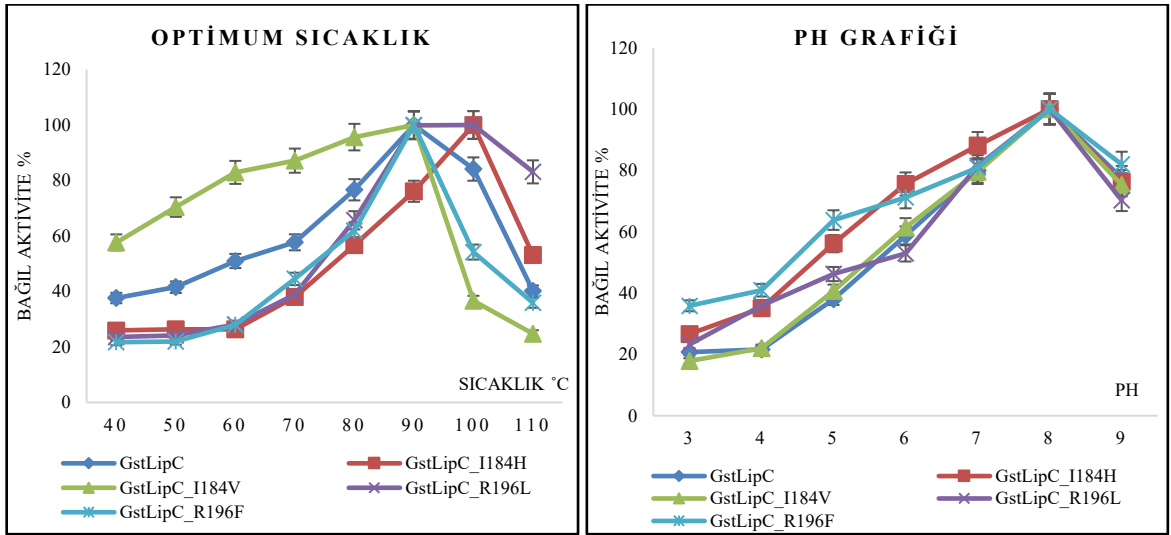
Zimogram analizine göre, GstLipC_R196F mutant enzimine ait her iki protein bandının (~58 kDa ve ~28 kDa) belirgin şekilde enzimatik aktivite gösterdiği tespit edildi. Diğer mutant enzimlerin ise hem ~58 kDa hem de ~28 kDa düzeyindeki protein bantlarında enzimatik aktivitenin bulunduğu, ancak bu bantlardaki aktivite düzeylerinin GstLipC_R196F enzimine kıyasla daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 27B).

Rekombinant yaban tip ve mutant GstLipC enzimlerinin *p*NPP substratına karşı aktivitesi gözlemlendi. Karakterizasyon çalışmaları yapılırken ~28 kDa protein kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan mutasyonların aktivitesi ile doğal enzimin aktivitesi arasında bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi için kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , K_{cat}) incelendi.

3.5. Yaban Tip ve Mutant Enzimlerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.5.1. Optimum Sıcaklık ve Optimum pH

Yaban tip ve mutant enzimlerin optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri *p*NPP substratı yardımıyla belirlendi. Enzimlerin optimum sıcaklık ve pH grafikleri Şekil 28’de yer almaktadır.



Şekil 28. GstLipC ve mutant enzimlerin optimum sıcaklık ve pH grafikleri

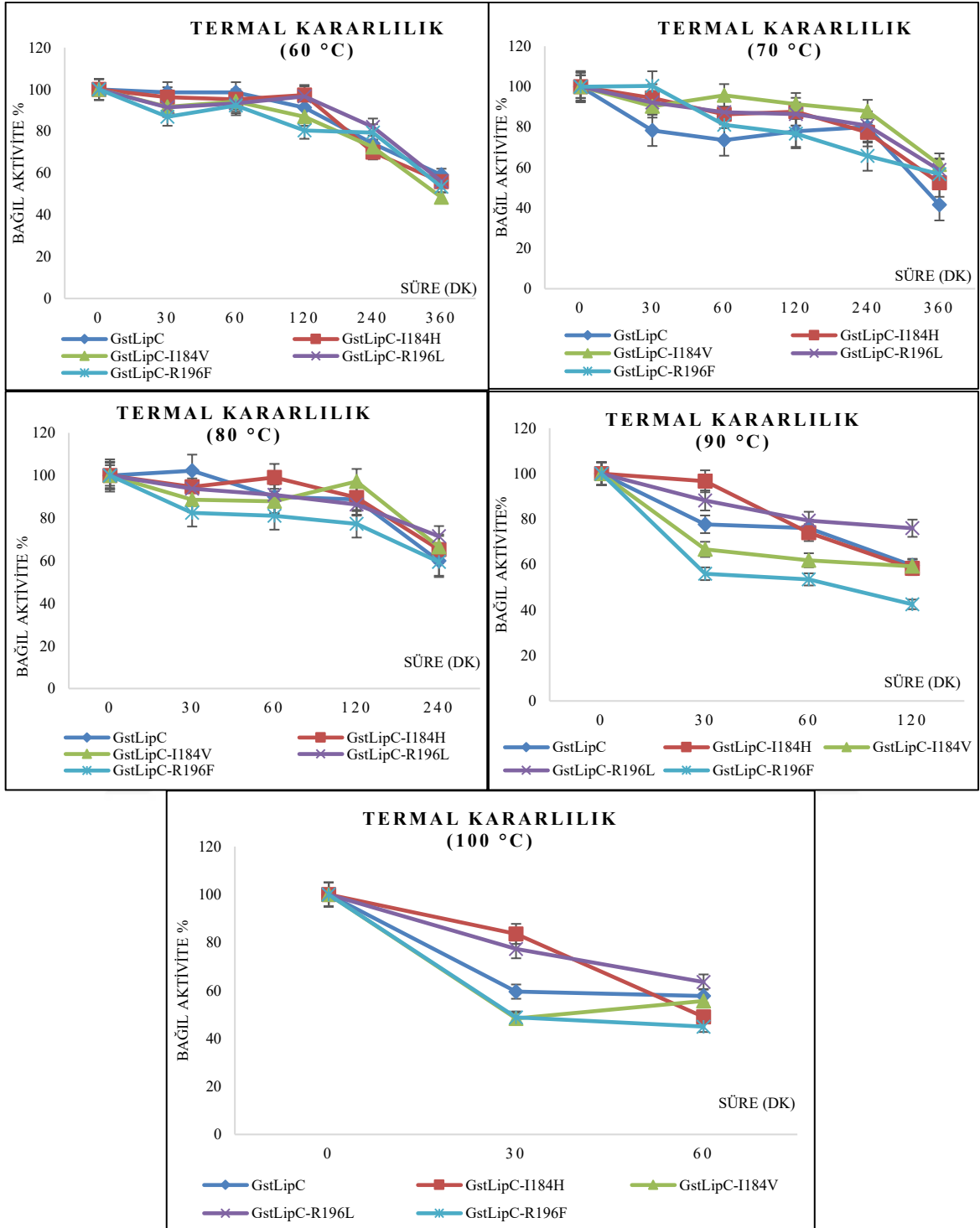
Test edilen enzimlerin optimum sıcaklıkları, yaban tip, GstLipC_I184H, GstLipC_R196L, GstLipC_I184V ve GstLipC_R196F için sırasıyla, 90, 100, 90-100, 90 ve 90 °C olarak belirlendi. Tüm enzimlerin, 100°C’nin üzerinde aktivitelerini kayb ettikleri gözlemlendi. Ayrıca, GstLipC_I184V mutantının düşük sıcaklıklarda, yaban tipe kıyasla daha

yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Tüm enzimlerin optimum pH'larının 8,0 olduğu gözlemlendi (Şekil 27).

3.5.2. Termal Kararlılık

Yaban tip ve mutant enzimlerin termal kararlılığını incelemek için belirli sıcaklıklara maruz bırakıldı ve belirli aralıklarda *p*NPP substratı ile aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Aktivitelerini kontrol etmek için OD₄₁₀ nm'de alınan ölçüm değerleri excel dosyasında hesaplandı ve grafikler oluşturularak termal kararlılığı incelendi (Şekil 29).





Şekil 29. GstLipC ve mutant enzimlerin termal stabilite grafikleri

60 °C’de gerçekleştirilen termal kararlılık analizlerinde hem yaban tip hem de tüm mutant enzimlerin 120 dakikalık inkübasyonları sonunda aktivitelerinin %80’inden fazlasını koruduğu görüldü. 240 ve 360 dakikalık inkübasyonlarda ise tüm enzimlerde aktivite düşüşü

gözlemlendi; 360. dakikada yaban tip enzim yaklaşık %40 aktivite gösterirken, mutant enzimler %50–60 aralığında aktivite gösterdi.

70 °C’de enzimlerin kararlılığında 60 °C’dekine benzer bulgular elde edildi.

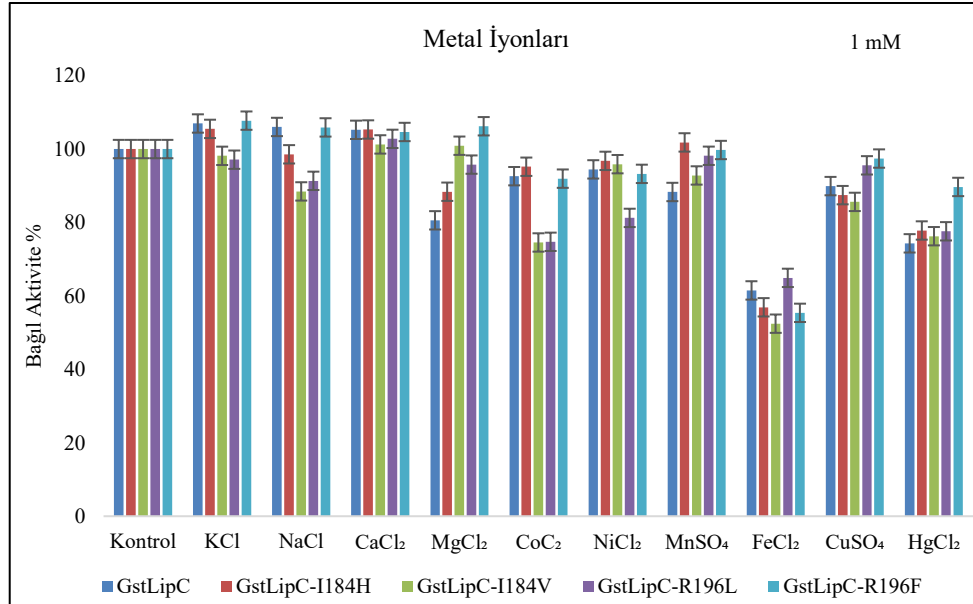
80 °C’de 240 dakikalık inkübasyon sonunda tüm enzimlerin aktivite oranını %60-70 arasında koruduğu gözlemlendi.

90 °C’de, 120 dakikalık inkübasyon sonunda, R196F ve R196L mutantları hariç tüm enzimlerin aktivite oranını %60 oranında koruduğu gözlemlendi. R196F mutantının aktivitesi bu sıcaklıkta %40 oranına düşerken, R196L mutantının yaklaşık %76 aktivitesini koruduğu gösterdi.

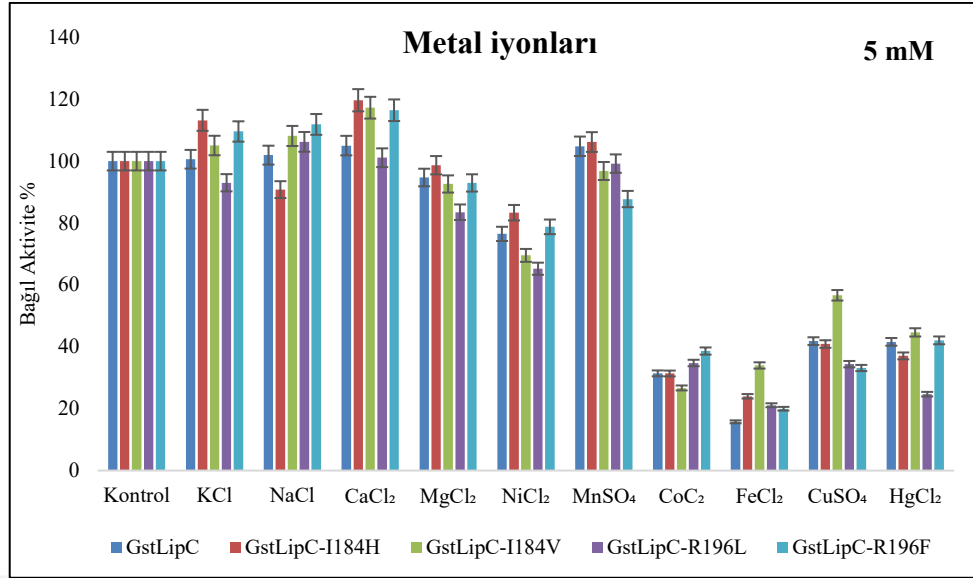
100 °C’de yapılan testlerde, 60 dakikalık inkübasyon sonunda, R196F dışındaki tüm enzimlerin aktivitesi %50’nin üzerinde olmakla birlikte, R196F %44 oranında bir aktivite gösterdi.

3.5.3. Metal İyon Etkisi

Metal iyonlarının yaban tip ve mutant enzimler üzerindeki etkisi Şekil 30’da yer almaktadır.



Şekil 30. 1 mM metal tuzlarının yaban tip ve mutant enzimlerin üzerindeki etkisi



Şekil 31. 5 mM metal tuzlarının yaban tip ve mutant enzimlerin üzerindeki etkisi

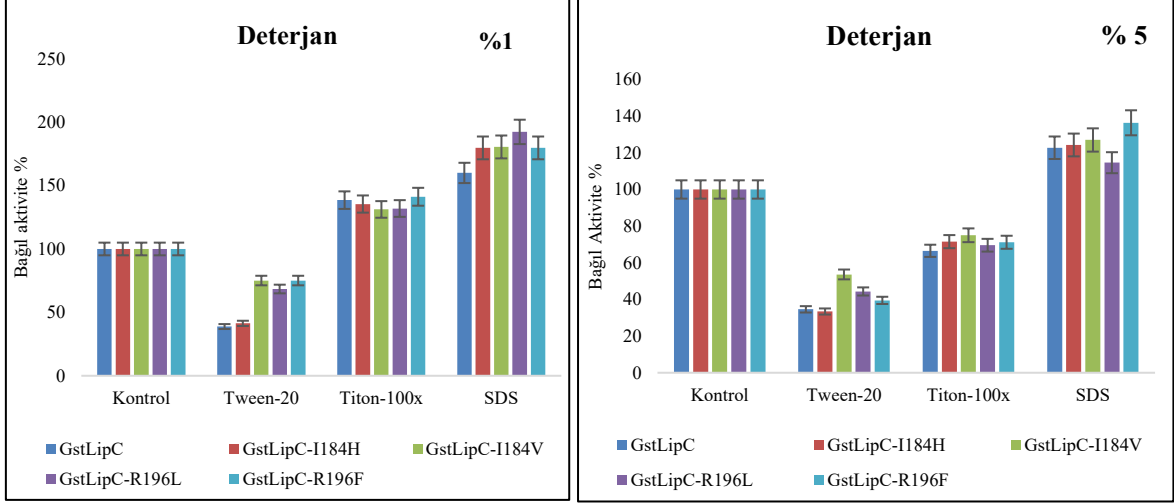
1 mM metal tuzlarıyla yapılan testlerde, ağır metal olan HgCl₂'nin enzimlerin aktivitesini % 15-20 oranında azalttığı, R196F mutantının %10 oranında azalttığı gözlemlendi.

Şekil 31'deki grafikte de görüldüğü gibi Fe²⁺ iyonu hem doğal hem de mutant enzimlerin üzerinde yüksek oranda inhibe edici etkiye sahip olduğu görüldü. Bunun dışında Hg²⁺ iyonu varlığında enzimlerin aktivitesi % 80'nin altına düştüğü görüldü. Co²⁺ iyonu GstLipC_I184V ve GstLipC_R196L'nin aktivitelerini %80'nin altına düşürürken diğer enzimleri önemli ölçüde etkilemedi.

5 mM metal iyonu varlığında, Hg²⁺, Co²⁺, Fe²⁺ ve Cu²⁺ gibi ağır ve geçiş metalleri, hem yaban tipi hem de mutant enzimlerin aktivitesinde yaklaşık %50–60 oranında inhibe etti (Şekil 31). Bununla birlikte diğer metaller enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde etkilemedi.

3.5.4. Deterjanların, İnhibitörlerin ve Organik Çözücülerin Etkileri

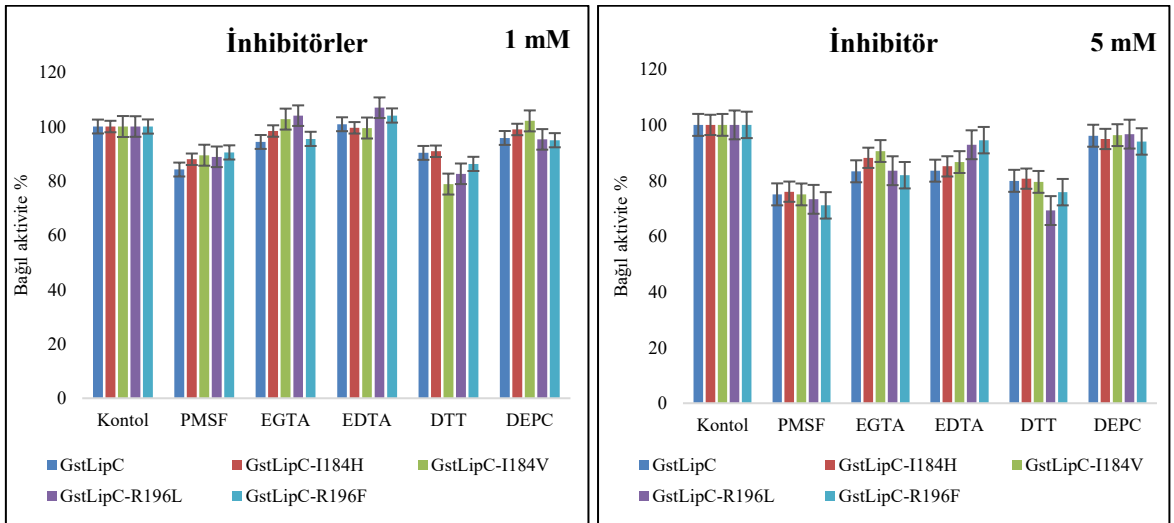
GstLipC ve mutant enzimler üzerinde deterjanlar organik çözücüler ve inhibitörlerin etkisi incelendi (Şekil 32).



Şekil 32. Deterjanların GstLipC ve mutant enzimler üzerindeki etki grafikleri, %1 ve %5 oranında deterjan varlığında GstLipC ve mutant enzimlerin aktivitelerinin değişimini göstermektedir.

Deterjanların GstLipC ve mutant enzimleri üzerindeki etkisi incelendiğinde benzer sonuçlar verdiği görüldü. %1 ve %5 Tween® 20 varlığında enzimlerin yaklaşık %60-70 oranında aktivitelerinin azaldığı görüldü. Bununla birlikte %1 Triton™ X-100 varlığında enzimlerin aktivitesi yaklaşık %50 oranında artırırken, Triton™ X-100'in oranı arttırıldığında (%5) enzimlerin aktivitelerinin %80'nin altına düştüğü görüldü. %1 SDS varlığında enzimlerin aktiviteleri % 70-80 oranında arttığı görüldü. %5 SDS varlığında ise enzimler % 20 daha az aktivite sergilediği görüldü.

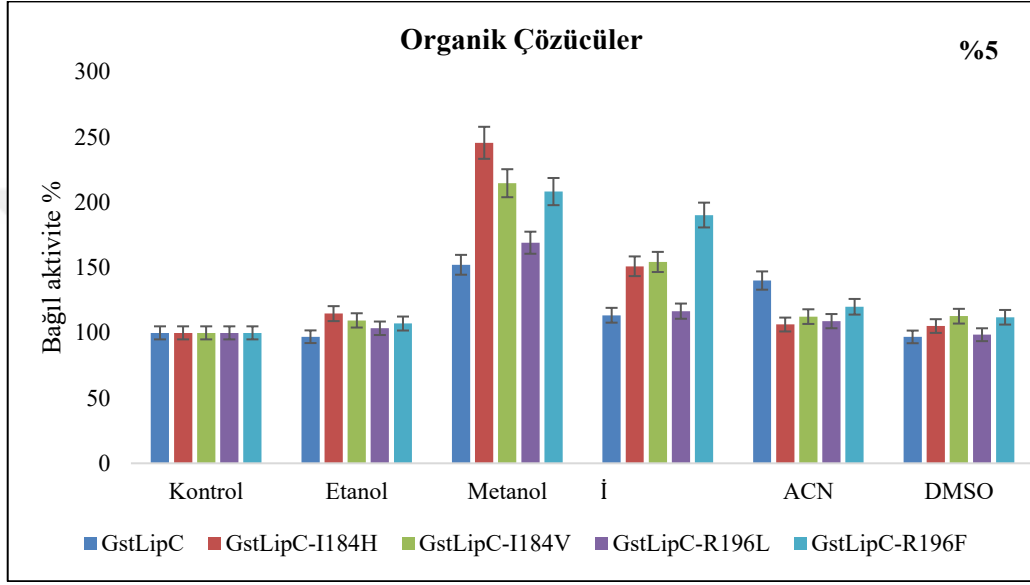
İnhibitörlerin doğal ve mutant enzimler üzerindeki etkisi Şekil 33'te yer alan grafikte gösterilmektedir.



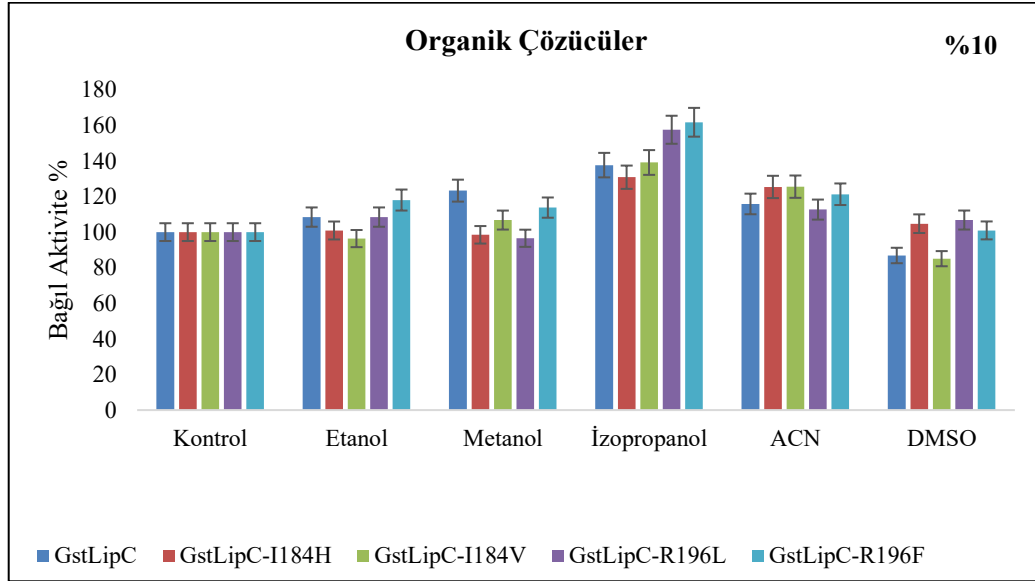
Şekil 33. İnhibitörlerin GstLipC ve mutantları üzerindeki etkisi

Ortamda 1 mM PMSF (fenilmetilsülfonil florür) varlığında enzimlerin aktiviteleri yaklaşık %10 oranında azaldığı görülürken 5 mM PMSF varlığında ise yaklaşık %20-25 azaldığı görülmektedir. Aynı durum DTT (Ditiotreitol) varlığında da geçerlidir.

Enzimlerin organik çözücülere karşı toleransını değerlendirmek amacıyla, %5 ve %10 (v/v) oranlarında organik çözücü içeren ortamlara maruz bırakıldı ve sonuçlar grafiksel olarak incelendi (Şekil 34-35).



Şekil 34. %5 oranında organik çözücülerin GstLipC ve mutantları üzerindeki etki grafikleri



Şekil 35. %10 organik çözücülerin GstLipC ve mutantları üzerindeki etki grafikleri

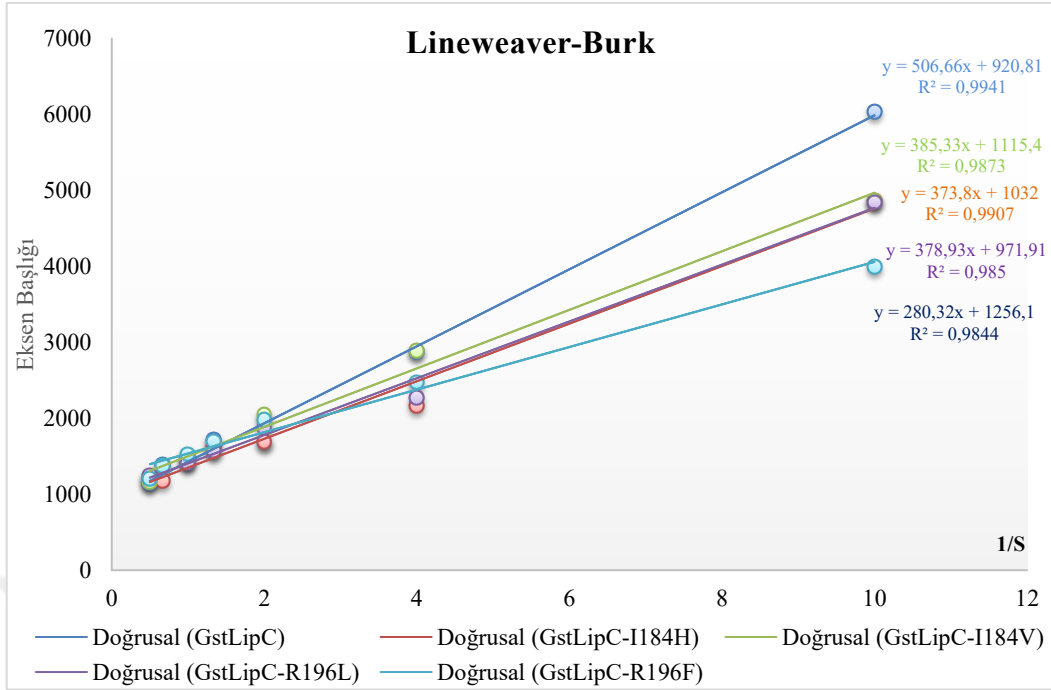
Organik çözücülerin GstLipC ve mutant enzimleri üzerindeki etkisi incelendiğinde, bu enzimlerin aktivitelerini negative yönde etkilemediği görüldü. Öncelikle GstLipC ve mutant enzimler %5 oranında organik çözücülere maruz bırakıldı. Devamında aktiviteleri ölçüldüğünde, Etanol, ACN ve DMSO varlığında enzimlerin aktiviteleri önemli oranda etkilenmezken, metanol varlığında enzimlerin aktivitesinin %200-250 oranında arttığı görüldü. Metanolün GstLipC ve mutant enzimler üzerinde farklı etki gösterdiği görüldü. GstLipC ve GstLipC_R196L'nin aktivitesini yaklaşık olarak %150-160'a yükseltirken diğer mutant enzimlerin aktivitesini %200'ün üzerine yükselttiği görüldü. %10 Metanol varlığında ise enzimler aynı aktiviteyi gösteremediler. GstLipC_R196F enzimi %5 izopropanol varlığında yaklaşık olarak % 200 aktivite gösterirken, izopropanol miktarı arttıkça (%10) aktivitesi %150'ye düştü. GstLipC ve GstLipC_R196L enzimleri için bakıldığında %5 izopropanol varlığında aktiviteleri yaklaşık %110 civarında iken izopropanol miktarı arttıkça her iki enziminde aktivitesi yaklaşık olarak %140-150'ye yükseldi. %5 ve %10 oranında DMSO varlığında enzimlerin aktivitelerinde önemli bir değişiklik olmadığı görüldü.

3.5.5. Kinetik Çalışmalar

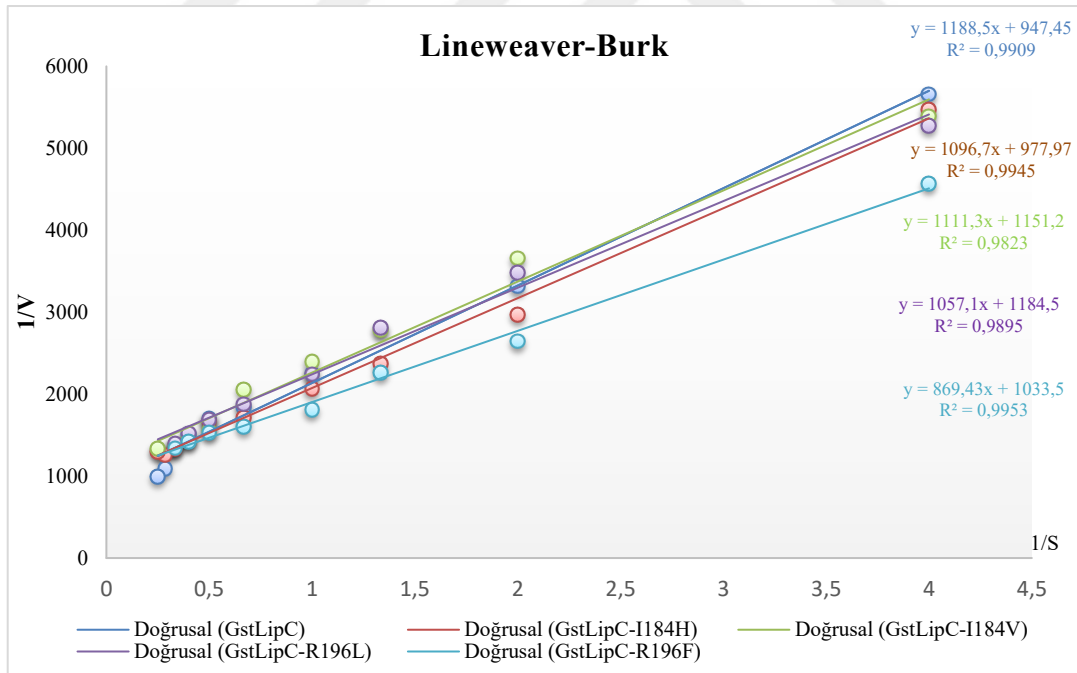
GstLipC ve mutant enzimlerin *p*NPP substratı ile substrat-aktivite grafikleri çizilerek enzimlerin Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Enzimlerin kinetik parametre hesaplaması için, Triton™ X-100 ve imidazol içeren reaksiyon ortamı oluşturuldu. Çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri olarak hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 36 ve 37'de gösterilmektedir. Enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri Tablo 24'te yer almaktadır.

Tablo 20. GstLipC ve mutant enzimlerin kinetik değerleri

Enzim	0,1 mM Triton™ X-100				1 mM imidazol			
	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	K_{cat} (1/s)	K_{cat}/K_m (1/s/mM)	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	K_{cat} (1/s)	K_{cat}/K_m (1/s/mM)
GstLipC	0,550233	9,179278	4,55934	8,286199	1,077429	8,416489	4,180463	3,880036
GstLipC-I184H	0,389882	6,897359	3,425913	8,78705499	1,121405	6,561385	3,259035	2,906208
GstLipC-I184V	0,345464	5,52317	2,743354	7,941082	0,965341	5,351411	2,658041	2,753475
GstLipC-R196L	0,362209	6,193095	3,076105	8,492617	0,892444	5,395757	2,680068	3,003065
GstLipC-R196F	0,223167	5,064989	2,515776	11,27307	0,841219	6,025194	2,992709	3,557585



Şekil 36. 0,1 mM Triton™ X-100 varlığında GstLipC ve Mutant enzimlerin Lineweaver-Burk grafiği



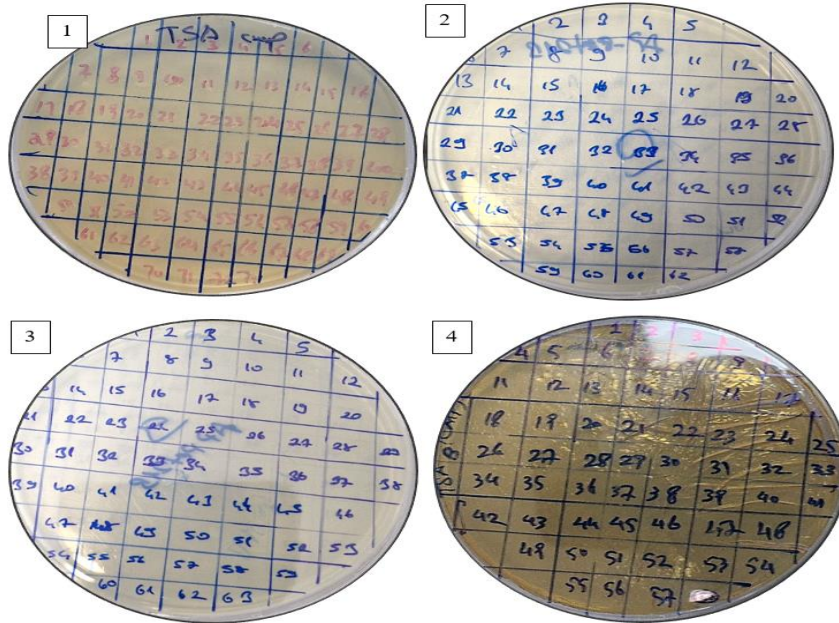
Şekil 37. 1 mM imidazol varlığında GstLipC ve Mutant enzimlerin Lineweaver-Burk grafiği

Tabloda yer alan sonuçlar incelendiğinde Triton™ X-100 ve imidazol varlığında enzimlerin K_m değerlerinde farklılık oluşmakla birlikte V_{max} değerlerinin önemli ölçüde etkilenmediği görüldü. Etkilenen bir diğer sonuç ise K_{cat}/K_m değeridir. GstLipC diğer mutant

enzimleri ile karşılaştırıldığında yüksek K_m , V_{max} ve K_{cat} değerine sahip olduğu görüldü. K_{cat}/K_m değerleri kontrol edildiğinde imidazol varlığında GstLipC daha yüksek değere sahipken Triton™ X-100 varlığında ise GstLipC_I184V haricinde diğer mutant enzimlerin değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü.

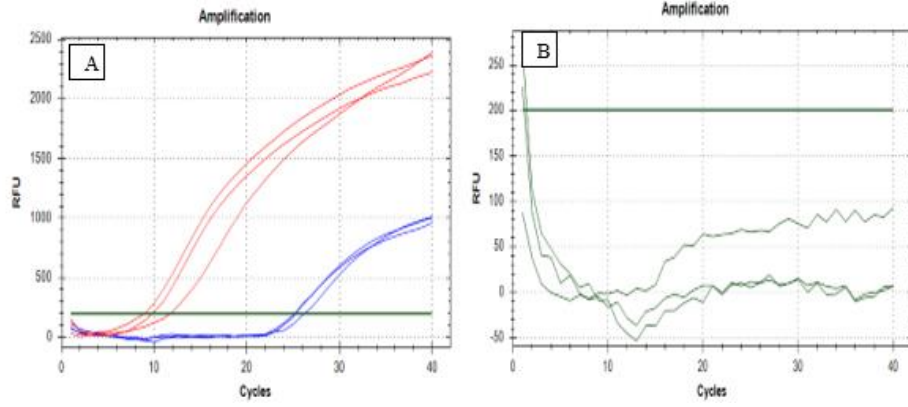
3.6. *Geobacillus stearothermophilus*'a Gen Entegrasyonu

Homolog rekombinasyon çalışması için rekombinant pNW33N plazmitin bulunduğu *Geobacillus stearothermophilus* (GstpNW33N_I184H, GstpNW33N_I184V, GstpNW33N_R196L, GstpNW33N_R196F) 25 µg/ml TSA da inkübe edildi. Sonrasında homolog rekombinasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Homolog rekombinasyon sonucunda bakteri hem antibiyotikli hem de antibiyotiksiz besi ortamında kontrol edildi (replika plate yöntemi ile) (Şekil 38). Bu çalışma dört mutasyon örneği için gerçekleştirildi.



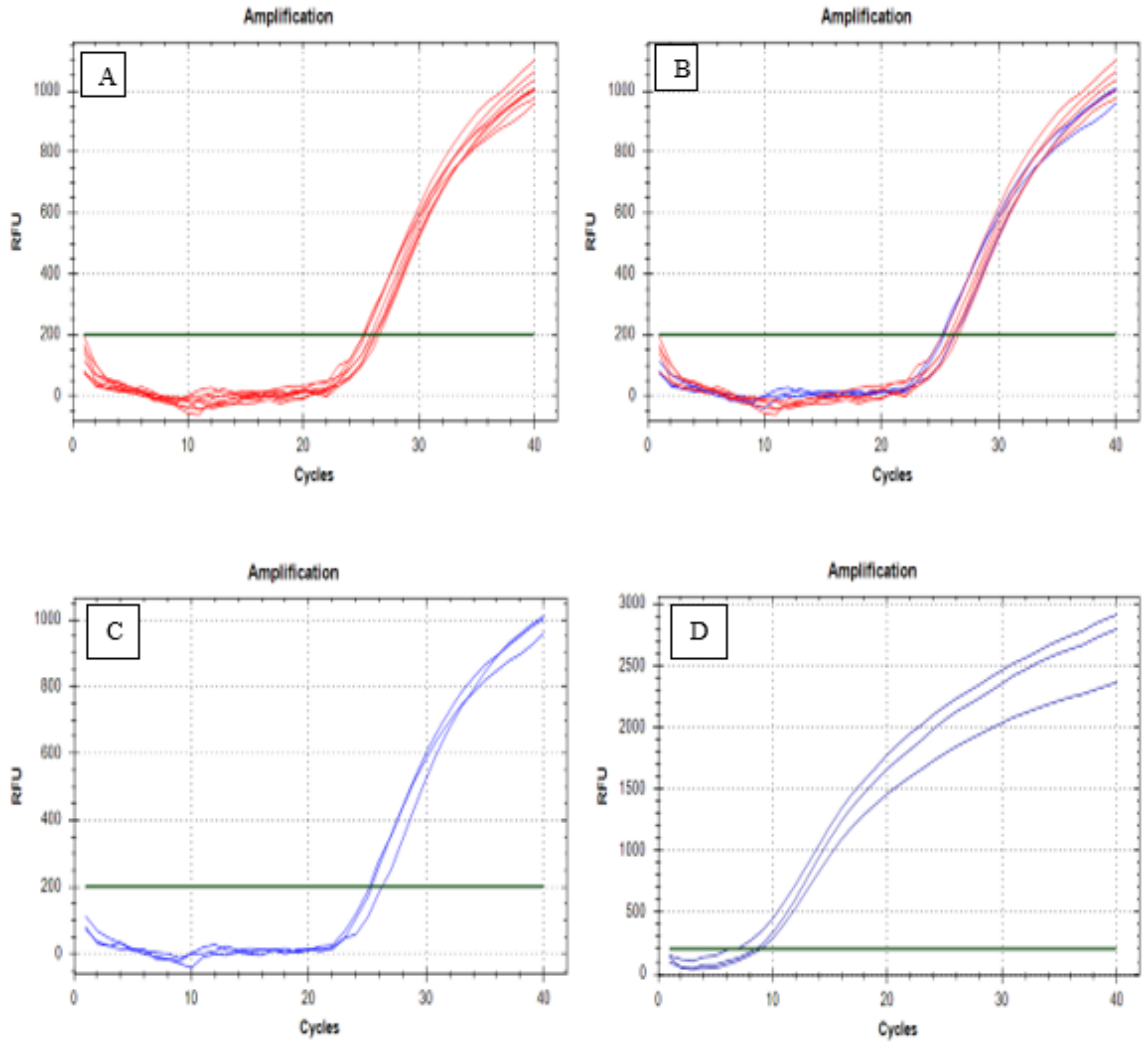
Şekil 38. Homolog rekombinasyon sonrası hazırlanan replika plate örnekleri, 1; *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184H), 2; *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184V), 3; *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (R196L), 4; *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (R196F) mutasyonları için oluşturulmuştur.

Replika plate yönteminde elde edilen kolonilerin hem antibiyotikli hem de antibiyotiksiz ortamda çoğaldığı gözlemlendi. Bir kaç tekrar sonucunda antibiyotikli ortamda çoğalmayan bakteriler de qPCR yöntemi ile kontrol edildi (Şekil 39).



Şekil 39. qPCR sonuçları: A; Kırmızı renk ile gösterilen örnekler mutasyon işlemi gerçekleştirilen *GslipC*'ye aittir, mavi renk ile gösterilen ise mutasyon işlemi gerçekleştirilmeyen *GslipC* örneğine aittir. B; Negatif controlün gösterimi.

Şekil 39'da gösterilen pikler incelendiğinde mutasyonları tanınması için tasarlanan problemlerin hem mutasyonun bulunduğu bölgeye hem de mutasyonsuz bölgeye bağlandığı görüldü. Fakat mutasyon bölgesini bulunduran örneklerde gösterge piki 10'ucu döngüden sonra yükselirken mutasyon olmayan *gstLipC*'de ise yaklaşık 24'ncü döngüden sonra yükseldiği görüldü. Bu sonuçlar dikkate alınarak homolog rekombinasyon sonucunda kloramfenikollü ortamda çoğalmayan bakteriler kontrol edildi. Kontrol olarak yaban tip *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 kullanıldı (Şekil 40).



Şekil 40. Homolog rekombinasyon çalışması qPCR sonuçları, çalışmalarda homolog rekombinasyon sonrasında elde edilen koloniler kullanıldı. Pozitif kontrol olarak içinde *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184H, I184V, R196L, R196F) kullanıldı. A; Homolog rekombinasyon sonrasında oluşan kolonilerin qPCR sonucu, B; Mavi renk ile gösterilen mutasyon işlemi gerçekleştirilmeyen *Geobacillus stearothermophilus*, kırmızı ile gösterilen homolog rekombinasyon sonucunda elde edilen kolonilerin sonucu, C; Doğal *Geobacillus stearothermophilus*, kullanılan control örneği, D; pNW33N-mutant gstLipC'rekombinant plazmitin bulunduğu *Geobacillus stearothermophilus* sonucu.

Şekil 40'da yer alan sonuçlar incelendiğinde homolog rekombinasyonun başarısız olduğu görüldü. Homolog rekombinasyon sonucunda eğer *Geobacillus stearothermophilus*'un genine mutasyon işlemi gerçekleştirilen *gstLipC* rekombine edilmiş olsaydı, sonuçlar Şekil 39D'de gösterilen qPCR sonucu gibi olması gerekmektedir. Fakat homolog rekombinasyondan sonraki kolonilerde qPCR sonucu 23-24'ncü döngüden sonra pik vermeye başladı. Bu pik oluşumu doğal *Geobacillus stearothermophilus* ile aynı

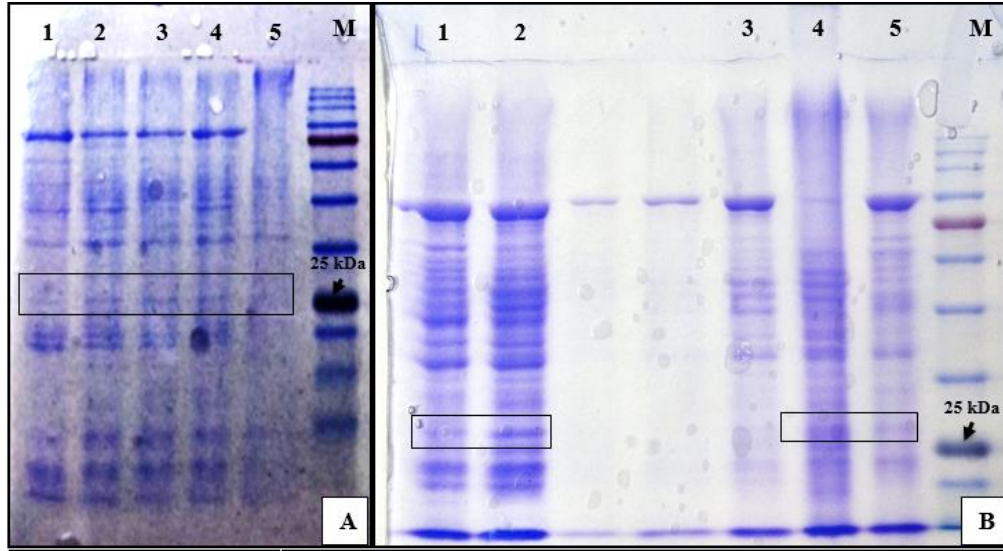
döngüde olduğu görülmektedir. Bu nedenle homolog rekombinasyon sonucu başarısızlıkla sonuçlandı. Homolog rekombinasyon başarısız olduğu için tez önerisinde belirtilen B planı yöntemine geçildi.

3.7. Rekombinant pNW33N plazmitinin *Geobacillus stearothermophilus* içinde ekspresyon çalışmaları

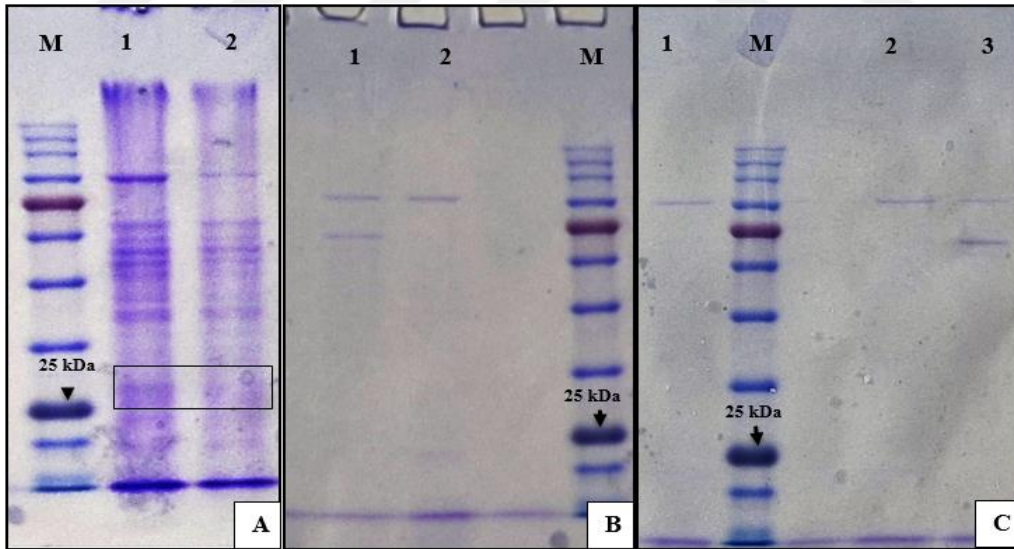
Bu aşamada hem rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184H, I184V, R196L, R196F) hem de yaban tip *Geobacillus stearothermophilus* bakterisinde ekspresyon çalışmaları yapıldı ve sonuçlar SDS-PAGE jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 41-42).

Şekil 41A'da yer alan görüntüde, hücreler sonikasyon işlemine ve ardından 60 °C'de ısı şokuna tabi tutuldu, daha sonra santrifüjleme yapılarak süpernatant fraksiyonları elde edildi. Eşit miktarda süpernatant örneği jele yüklenerek analiz edildi. Şekil 41B'de ise herhangi bir lizis protokolü uygulanmadan, hücreler doğrudan 95 °C'de ısıtılarak parçalanmış ve elde edilen örnekler doğrudan jele yüklendi.

Şekil 42A'da yer alan görüntüde, örnekler herhangi bir lizis protokolüne tabi tutulmadan, eşit OD₆₀₀ değerine sahip kültürlerden alındı, hücreler 95 °C'de ısıtılarak parçalanmış ve elde edilen hücre içerikleri doğrudan jele yüklendi. Şekil 42B ve 42C'de ise, ekspresyon sonrası kültürlerin süpernatant fraksiyonları analiz edildi. Bu fraksiyonlar, özellikle hücre dışına salgılanan proteinleri tespit edebilmek amacıyla alındı ve SDS-PAGE üzerinde görüntülendi.



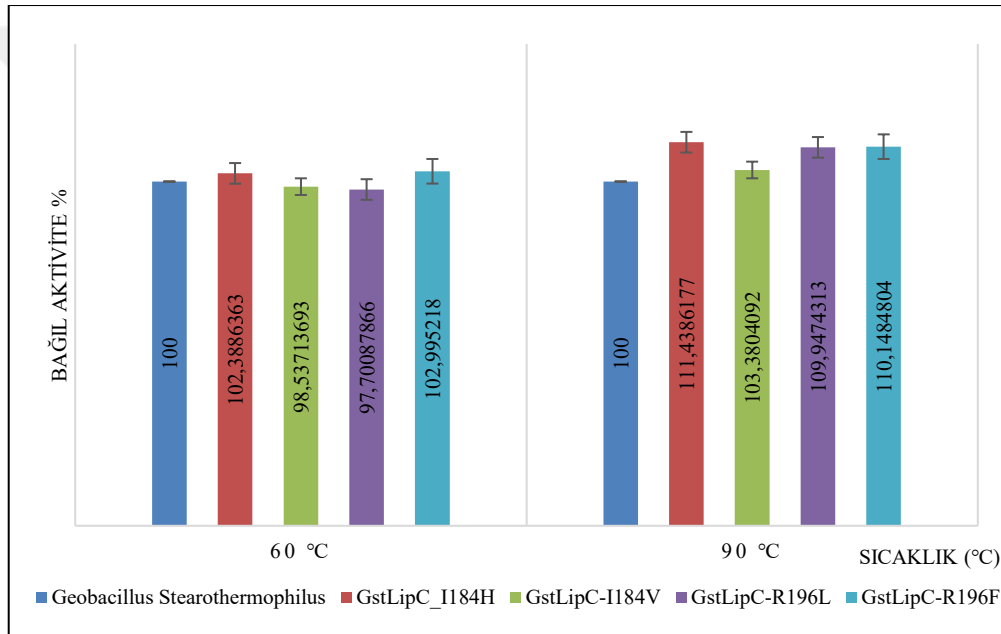
Şekil 41. Yaban tip ve mutant GstLipC'lerin *Geobacillus stearothermophilus*'ta ekspresyon sonucunun SDS- PAGE görüntüleri, A1: gstLipC_I184V, A2: gstLipC_I184H, A3: gstLipC_R196L, A4: rekombinant gstLipC_R196F ve A5: yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*, B1: yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*., B2: gstLipC_I184H, (B1 ve B2 nolu bakterinin OD600 değeri eşitlendi), B3: gstLipC_I184V, B4: gstLipC_R196L, B5: gstLipC_R196F (B4 ve B5 nolu örneklerin OD600 değeri eşit değildir fakat doğal bakteriye yakın olarak ayarlanmıştır).



Şekil 42. Yaban tip ve mutant GstLipC'lerin *Geobacillus stearothermophilus*'ta ekspresyon sonucunun SDS-PAGE görüntüleri, A1: gstLipC_I184V ve C2: doğal *Geobacillus stearothermophilus*, B1: yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*, B2: gstLipC_R196L, C1: gstLipC_I184V, C2: gstLipC_R196F ve C3: gstLipC_I184H. M olarak ifade edilen örnek protein (GeneDirex, Cat no:PM008-0500) markırıdır.

Yaban tip ve rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184H, I184V, R196L, R196F) ekspresyon sonuçları SDS-PAGE ile incelendi. Şekil

41A'da yer alan görüntü incelendiğinde rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184H, I184V, R196L, R196F)'de ~28 kDa'da ince bir protein bandı görüldü fakat doğal bakteride bu bant daha az olarak görüldü. Şekil 41B de yer alan; SDS-PAGE jelinde de görüldüğü gibi GstLipC_I184H mutasyon örneğinde yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*'a göre ~28 kDa protein bandının olduğu yerde daha yoğun protein bandı görüldü. Bu nedenle her iki hücrenin protein aktivitesi arasındaki farkı görebilmek için pNPP (*p*-nitrofenil palmitat) ile aktivite kontrol edildi. Aktivite kontrolleri hem 60 °C de (sporların germinasyona girdiği sıcaklık) hem de 90 °C de (GstLipC'nin optimum sıcaklığı) aktiviteleri kontrol edildi (Şekil 43).



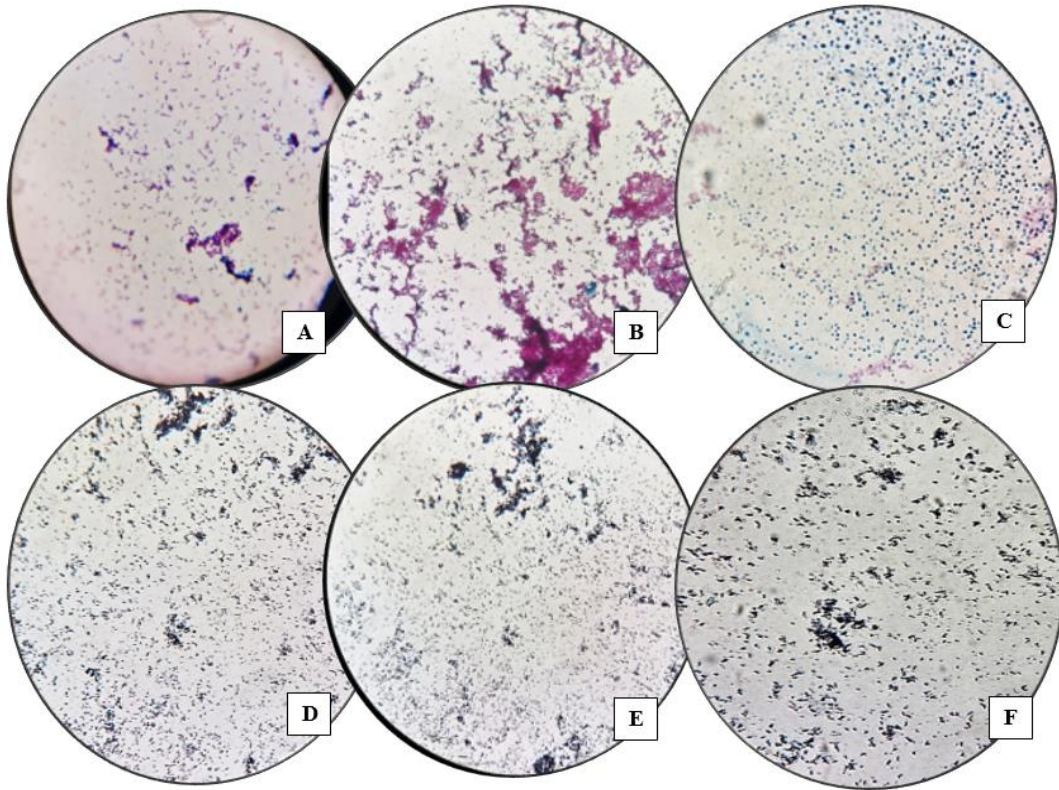
Şekil 43. Yaban ve rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184H, I184V, R196L, R196F) pNPP substratına karşı aktivitesi

Şekil 43'te yer alan grafikte de gösterildiği gibi mutant bakteriler ile doğal *Geobacillus stearothermophilus* arasında pNPP substartına karşı aktivite farklılığı gözlemlendi. Rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184H, R196F) örnekleri hem 60 °C'de daha yüksek aktivite gösterirken, rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC (I184V, R196L,) örneklerinin 60 °C'deki aktivitesinin doğal bakteriye göre daha düşük olduğu görüldü. Buna karşı 90 °C bütün mutant bakterilerin aktiviteleri doğal *Geobacillus stearothermophilus*'ye göre yüksek aktivite gösterdi.

3.8. Sporulasyon Çalışmaları

3.8.1. *Geobacillus stearothermophilus*'tan Endospor Üretimi ve Malaşit Yeşili Boyama Metodu

Elde edilen sporlar saflaştırıldı ve malaşit yeşili ile boyaması yapılarak ışık mikroskobunda görüntülendi (Şekil 44).



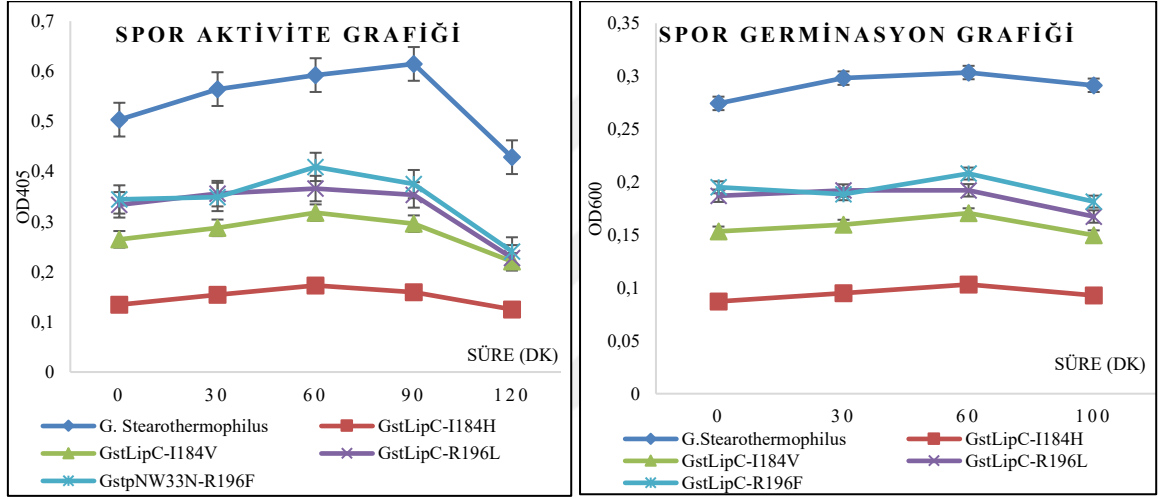
Şekil 44. Sporların malaşit yeşili ile boyama görüntüsü, A; Sporulasyon aşamasında üçüncü gün sonunda alınan örneğin görüntüsü. B; Sporulasyon sonucunda elde edilen ürünün görüntüsü. C; Sporların saflaştırıldıktan sonraki boyama görüntüsü. D, E, F; Sporların ikinci bir sukroz gradient ile saflaştırılması sonucunda boyama ile görüntülenmesi (D; Yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*. E; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H, F; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196L)

Sporulasyon çalışmasının üçüncü gününde alınan örnekte hem spor hem de vejetatif hücrenin varlığı görüldü (Şekil 44A). Sporulasyon için gerekli aşamalar tamamlandıktan sonra tekrar malaşit yeşili ile boyama işlemi gerçekleştirildiğinde ortamda bulunan vejetatif hücre rezidüleri parçalanmış şekilde görüldü (Şekil 44B). Sporların saflaştırılma işlemi tamamlandıktan sonra tekrar boyama işlemi gerçekleştirildiğinde hala ortamda vejetatif

hücre rezidüsü olduğu gözlemlendi (Şekil 44C). Bu nedenle saflaştırma metodunda yer alan sukroz gradinyenti aşaması tekrarlandı. İkinci tekrar sonra sporlar saf olarak elde edilmiştir (Şekil 44D, E, F).

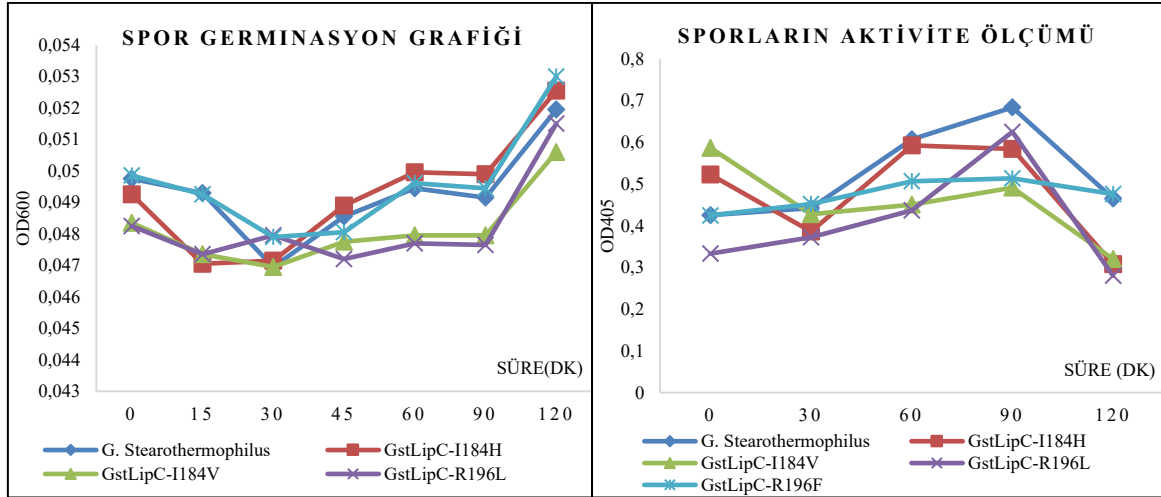
3.9. Germinasyon Çalışmaları

Sporların çimlendirme aşamasında hem OD₆₀₀ hem de OD₄₀₅ nm dalga boylarında ölçüm alınarak germinasyon aşaması takip edildi. Bu süreçte hem OD₆₀₀ hem de OD₄₀₅ de ölçümler alındı (Şekil 45).



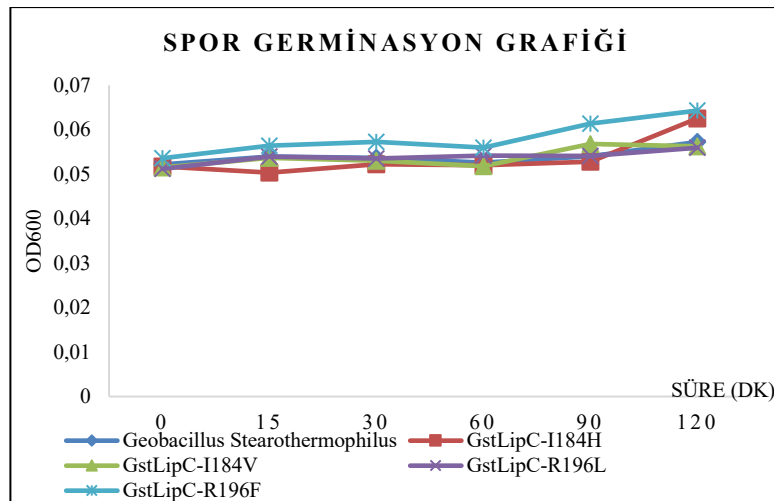
Şekil 45. Sporların çimlenmesi aşamasında alınan ölçümler: A; Sporların çimlenmesi aşamasında yaban tip ve mutant GtsLipC nin aktivitesinin zamanla ölçümleri. B; Sporların çimlenmesini takibi için OD₆₀₀ dalga boyunda ölçümü. Bu çalışmada ~ 10⁸ spor kullanıldı.

Bu deneyde, OD₄₀₅ dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda spor germinasyonu sürecinde lipaz enzimi aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmedi; ancak 90. dakikadan itibaren enzim aktivitesinde bir azalma eğilimi belirlendi. Bu çalışmalar farklı spor konsantrasyonu ile tekrarlandı (Şekil 46).



Şekil 46. Sporların çimlenmesi sürecinde OD₆₀₀ nm ve OD₄₀₅ nm absorbans değerleri, çalışmada $\sim 10^6$ - 10^7 spor kullanılmıştır.

Bu çalışmada, sporların çimlenme süreci grafiksel verilerle değerlendirilmiş olup, spor yapısında bulunan lipazlarının 30–90. dakikalar arasında aktif olduğu belirlendi. Şekil 45’te sunulan verilere göre, sporların çimlenme süreci yaklaşık 15. dakikada başladığı görüldü. Yaban tip *Geobacillus stearothermophilus* ile rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N-gstLipC_R196F sporları karşılaştırıldığında, 120. dakikada rekombinant suşun daha yüksek OD₆₀₀ değerine ulaştığı gözlemlendi. Yaban tip suşta enzim aktivitesinin 30. dakikada artmaya başladığı, 90. dakikada maksimum seviyeye ulaştığı ve 120. dakikada azaldığı tespit edildi. Bu bulgular doğrultusunda, deneyler artan spor yoğunluğu ile tekrar edilmiş ve elde edilen veriler Şekil 47’te sunulmaktadır.

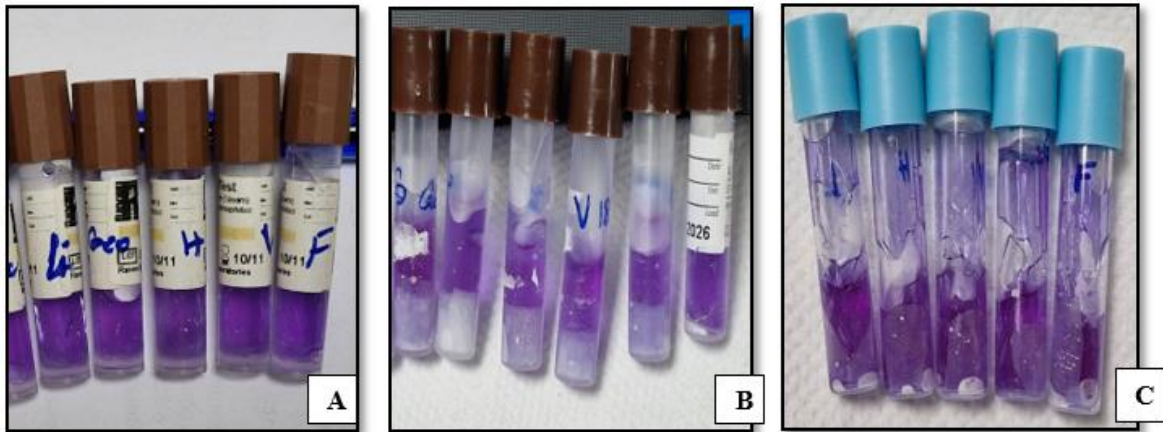


Şekil 47. Sporların çimlenmesi sürecinde OD₆₀₀ nm absorbans değerinin grafiksel olarak gösterimi, çalışmada $2 \times (\sim 10^6$ - $10^7)$ spor kullanılmıştır.

Şekil 47’te yer alan grafikte 2 kat artırılmış ($\sim 10^6$ – 10^7 spor/ml) spor yoğunluğu kullanılmıştır. Grafik verilerine göre, genel olarak ilk 60 dakika boyunca optik yoğunlukta bir azalma gözlemlenmedi. Rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H suşunda ise ilk 15. dakikada optik yoğunlukta azalma meydana geldi, takip eden dakikalarda artış kaydedildi. Rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196F suşunda 60’ıncı dakikada optik yoğunlukta artış gözlemlendi.

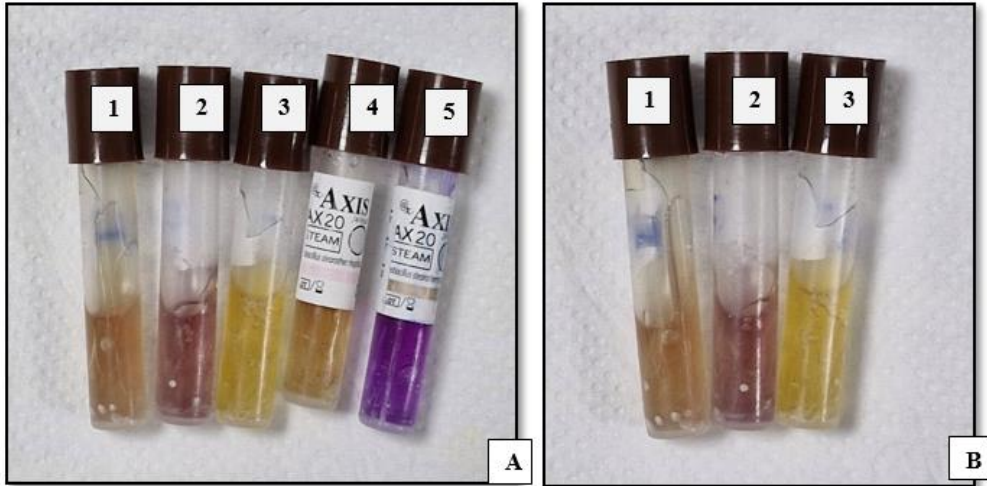
3.10. Biyolojik İndikatör Çalışmaları

Farklı marka biyolojik indikatörlerin karşılaştırılması amacıyla, bu indikatörlerin içerisinde bulunan spor çimlenme besiyeri kullanılarak yaban tip ve rekombinant *Geobacillus stearothermophilus* sporları ile çimlenme çalışmaları gerçekleştirildi (Şekil 48).



Şekil 48. Sporların farklı biyolojik indikatörler içine yerleştirilmiş görüntüsü. A; BIONOVA marka biyolojik indikatör, B; AXIS marka biyolojik indikatör, C; LISTER marka biyolojik indikatör. Bu biyolojik indikatörlerin içerisinde laboratuvarında üretilen sporlar yer almaktadır.

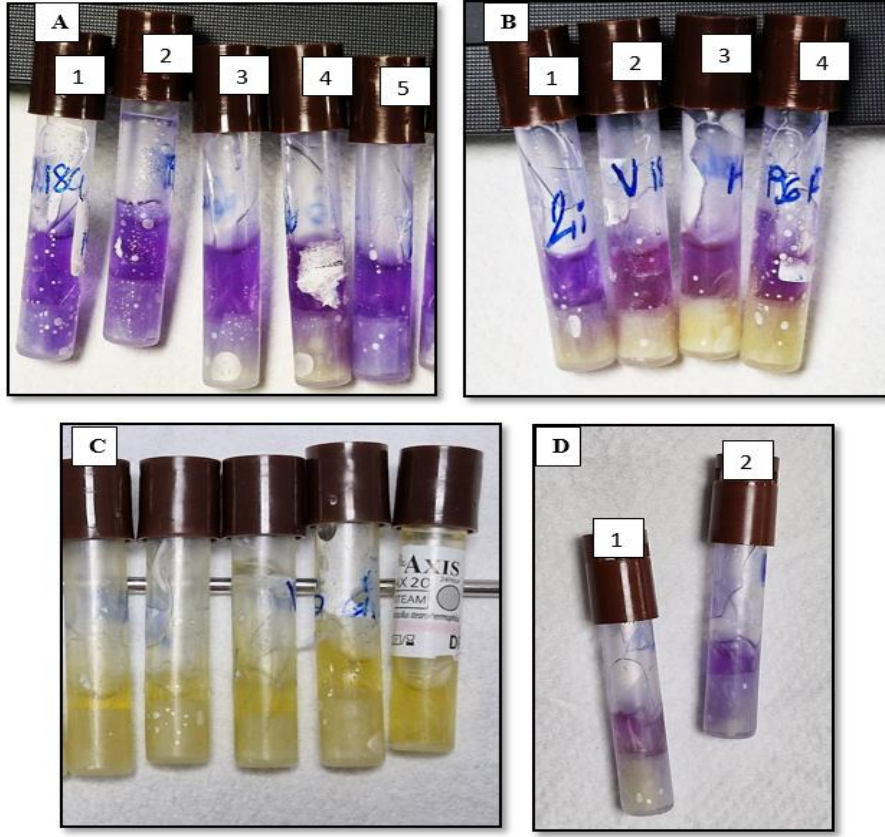
Biyolojik indikatör çalışmaları için ilk olarak AXIS marka biyolojik indikatörler kullanıldı. Biyolojik indikatörlerde sporların miktarının etkisini görmek için farklı spor konsantrasyonları denendi (Şekil 49).



Şekil 49. Farklı spor konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyolojik indikatörlerin sonuçlarının gösterimi. A; Yaban tip *Geobacillus stearothermophilus* sporları kullanılarak farklı spor konsantrasyonu ile hazırlanan biyolojik indikatörlerin sonucu, A1; $\sim 10^7$ - 10^8 spor, A2; $\sim 10^8$ - 10^9 spor, A3; 10^5 - 10^6 spor, A4; 10^6 - 10^7 spor, A5; 10^9 üzeri spor bulunmaktadır. B; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus* /pNW33N_gstLipC_I184H sporları kullanılarak farklı spor konsantrasyonu ile hazırlanan biyolojik indikatörlerin sonucu. B1; $\sim 10^7$ - 10^8 spor, B2; $\sim 10^8$ - 10^9 spor, B3; 10^5 - 10^6 spor bulunmaktadır. Bu indikatörlerden sadece A3 ve B3 olan indikatör 3 saat sonra sonuç vermiştir. Diğerleri yaklaşık 6-24 saat arasında renk değişimi olduğu görüldü.

Farklı spor konsantrasyonlarının dört mutant suş için denenmesi sonucunda, elde edilen verilerde anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi. Şekil 49'de biyolojik indikatörlerin deney sonunda ulaştığı renk değişimleri gözlemlendi. Pozitif sonuç beklenen koşullarda indikatörlerin sarı renge dönmesi gerekirken, farklı spor konsantrasyonlarında farklı renk değişimlerinin meydana geldiği kaydedildi. Yapılan son değerlendirmelerde, en etkili sonucun 10^5 - 10^6 spor/ml konsantrasyonunda elde edildi. Şekil 49A'ya göre, 10^6 - 10^7 spor/ml içeren indikatörlerin yaklaşık 6 saat içinde sonuç verdiği; buna karşılık 10^7 - 10^8 ve 10^8 - 10^9 spor/ml içeren indikatörlerin 12 saatten önce sonuç vermediği tespit edildi. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, biyolojik indikatör uygulamalarında 10^5 - 10^6 spor/ml konsantrasyonunun kullanılması kararlaştırıldı.

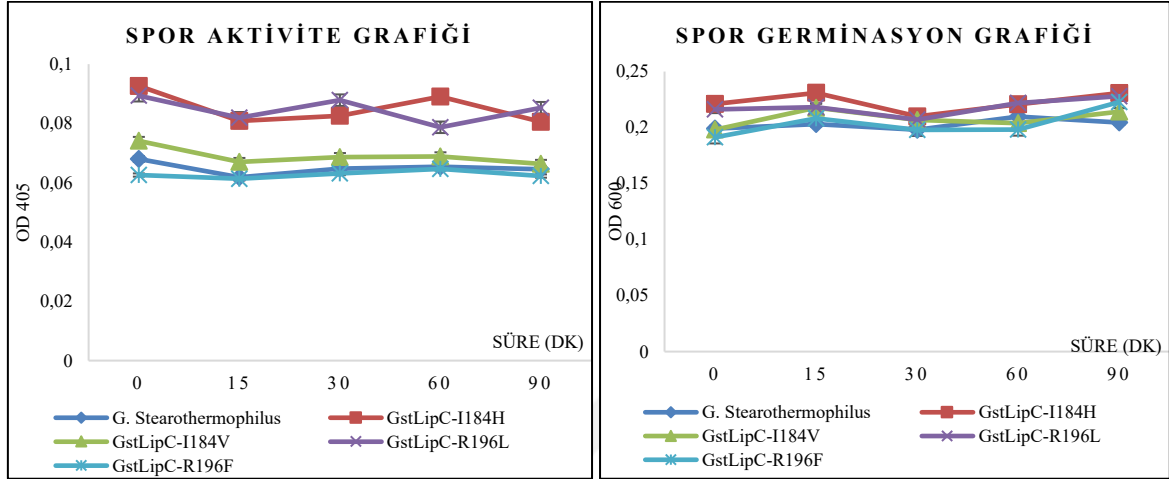
İlk aşamada, sporlar (10^5 - 10^6 spor/ml) herhangi bir yüzeye sabitlenmeden doğrudan sıvı indikatör ortamına eklendi. Bu koşullarda, biyolojik indikatörlerin 3 saat içerisinde sonuç vermesi beklenirken, sonuç süresinin uzayarak 4 saate çıktığı gözlemlendi (Şekil 50).



Şekil 50. Laboratuvarda hazırlanan biyolojik indikatörlerin renk değişiminin gösterimi, Bu çalışmada AXIS marka biyolojik indikatörler kullanılarak laboratuvarda üretilen sporlar üzerinde çalışılmıştır. A: Biyolojik indikatörlerin renk değiştirmeye başladığı ilk dakikalar, A1; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184V, A2; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196F, A3; Yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*. A4; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H, A5; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N- gstLipC_R196L, B: Biyolojik indikatöre renk değiştirmeye başladıktan yaklaşık 10 dakika sonraki renk değişimi, B1; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196L, B2; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184V, B3; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H, B4; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196F, C; Biyolojik indikatörlerin renk değişiminin son görüntüsü. D: Bionova Biyolojik indikatör kullanılarak oluşturuldu. D1; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H, D2; Yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*.

Şekil 50'deki verilere göre, rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H içeren biyolojik indikatör, diğer örneklerden daha erken sararmaya başladığı görüldü. *Geobacillus stearothermophilus* içeren biyolojik indikatör, bu örnekten hemen sonra sararma gösterdi. Aynı deneysel koşullar altında Bionova marka biyolojik indikatörde benzer sonuçlar elde edildi. Tüm indikatörlerde renk değişiminin

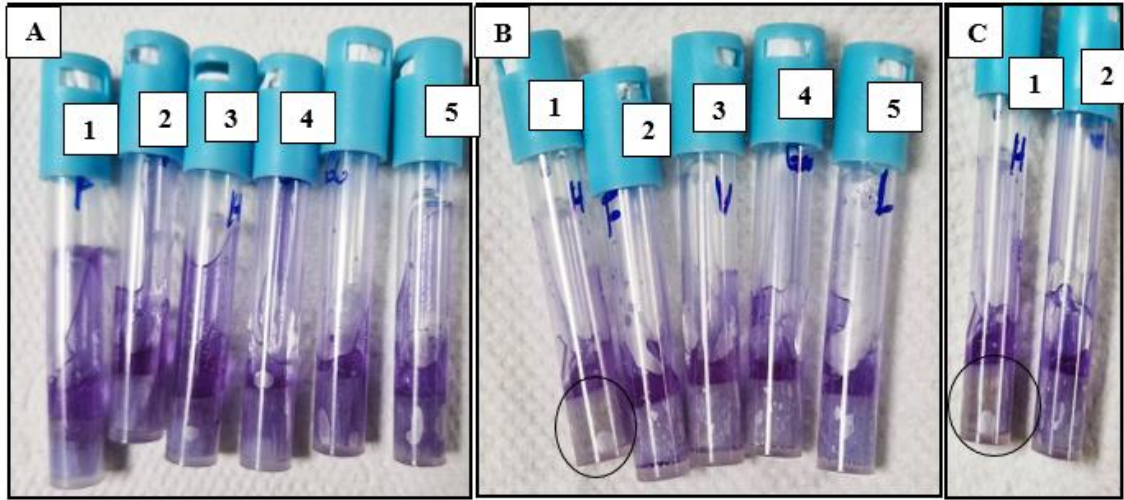
başlama süresi farklılık göstermesine rağmen, tam renk değişimi eş zamanlı olarak tamamlandığı görüldü. Biyolojik indikatörlerdeki germinasyon süreci, OD₆₀₀ ve OD₄₀₅ absorbans ölçümleri ile izlendi (Şekil 51).



Şekil 51. Biyolojik indikatörün OD₆₀₀ ve OD₄₀₅ nm’de aktivite sürecinin değişim grafiği

Bu çalışmada sporların germinasyon süreci takibi için OD₆₀₀ değeri incelendi, ancak takip edilebilir bir sonuç elde edilemedi. OD₄₀₅ nm’de lipaz aktivitesi ölçüldü ve rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H örneği dışında diğer örneklerde anlamlı bir fark gözlemlenemedi. Rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H örneği 60 °C’de lipaz aktivitesi gösterdi.

Bir sonraki çalışma Lister marka olan biyolojik indikatörler üzerinde gerçekleştirildi (Şekil 52).



Şekil 52. Lister marka biyolojik indikatör kullanılarak hazırlanan indikatörler, A; Biyolojik indiatörün germinasyona başlatılmadan önceki görüntüsü: A1; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196F, A2; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184V, A3; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H, A4; Yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*, A5; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196L, B; Biyolojik indikatörlerin 60 °C’de iki saat inkübasyonundan sonraki grüntüleri. B1; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H, B2; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196F, B3; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184V, B4; *Geobacillus stearothermophilus* B5; rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_R196L, C; Gstp rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H ve Yaban tip *Geobacillus stearothermophilus*’nin görüntüsü.

Lister marka biyolojik indikatör ile gerçekleştirilen bu çalışmada da önceki indikatörlerde olduğu gibi rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H, sporunun daha erken sararmaya başladığı görüldü. Lister marka biyolojik indikatörün fotometrik ölçümlerine bakıldığında rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H, sporunun daha yüksek aktivite verdiği görüldü (Tablo 21).

Tablo 21. Biyolojik indikatörlerin ilk 2'dakika florometrik değerleri

Eş zamanlı ölçüm	Hızlı indikatör (10 ⁵ -10 ⁶ spor)	Hızlı indikatör (2x (10 ⁵ -10 ⁶) spor)	Normal indikatör (10 ⁵ - 10 ⁶ spor)
Yaban tip <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	156	204	166
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> /pNW33N_ gstLipC_I184H	174	218	178
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> /pNW33N_ gstLipC_I184V	156	206	164
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> /pNW33N_ gstLipC_R196L	150	200	162
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> /pNW33N_ gstLipC_R196F	156	204	160

Tablo 21'de yer alan florometrik ölçümler dikkate alındığında rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H sporunun florometrik değeri diğerlerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak diğer sporlardan daha erken sonuç verdi.

4. TARTIŞMA

Lipazlar, triaçilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen gliserol ester hidrolazlardır (EC 3.1.1.3). Katalitik aktivite açısından esterazlara (EC 3.1.1.1) benzerler ancak substratlarda farklılık gösterirler. Gerçek lipazlar, orta ve uzun zincirli yağ asitleri içeren suda çözünmeyen yağları tercih eder. Lipazlar, substrat spesifikliğı, organik çözücülerdeki stabilitesi ve yüksek derecede bölgesel seçicilik gibi yüksek verimlilikleri ve çeşitlilikleri nedeniyle deterjan, gıda, süt ürünleri, kâğıt hamuru ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Glogauer vd., 2011).

NCBI CCD veritabanında *Geobacillus stearothermophilus*'un GDSL lipazı amino asit dizisi incelenmiş ve SGNH-hidrolaz-YpmR benzeri lipaz olarak sınıflandırıldığı belirlenmiştir. Ayrıca GstLipC'nin amino asit dizisi incelendiğinde Asp amino asidine sahip olduğu tespit edilmiştir. SGNH-hidrolaz-YpmR olarak bilinen bu enzim grubunun alfa/beta hidrolaz ailesinden farklı bir üçüncül yapıya sahip olduğu ve Ser-His-Asp (veya Glu) üçlüsüne benzer bir aktif bölge içermesine rağmen, bilinen hidrolaz enzimleri arasında genel olarak benzersiz olduğu rapor edilmektedir. Ancak bu enzim karboksilik asit rezidüsünden yoksun olabilmektedir (Touray vd., 2020).

GstLipC'nin amino asit dizisi SignalP 5.0 web sunucusunda incelendiğinde lipo sinyal peptit dizisine sahip olduğu saptanmıştır. GDSL ailesi lipazlarındaki Lipo (Sec/SPII) sinyal peptidi, endospor oluşumunda yer alanlar da dâhil olmak üzere bakterilerde salgılama ve membrana tutunma için enzimi yönlendiren bir hedefleme dizisi olarak işlev görür. Bu sinyal peptidi, lipazı, iç membran boyunca taşındığı Sec'e bağlı salgılama yoluna yönlendirir. Periplazmaya girdiğinde, sinyal peptidaz II (SPII), lipobox motifindeki (LVI-XXX-C) sinyal peptidini keserek, lipit modifikasyonlarına uğrayan bir sistein rezidüsünü açığa çıkarır ve enzimin bir lipoprotein olarak membrana tutunmasını sağlar (Juncker vd., 2003). *Bacillus* türleri gibi spor oluşturan bakterilerde, membranla ilişkili GDSL lipazları, spor gelişimi ve direnci için gerekli olan lipit substratlarını hidrolize ederek spor kılıfı oluşumuna, lipit yeniden şekillenmesine veya çimlenme süreçlerine katkıda bulunabilir. Bu lipazlar ayrıca spor canlılığı ve uyku halinin sürdürülmesinde rol oynayabilir ve sporulasyon ve çimlenme sırasında membran lipitlerinin uygun bileşimini sağlar (Kaushik vd., 2022).

GstLipC proteini üzerinde mutasyon bölgelerine karar vermek için Swiss-Model'de modelleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 3D model öncelikle Verify3D ve ProSA

web sunucularında kontrol edilmiştir. Verify3D Errat skoru 97,2973 olarak tespit edilmiştir; bu değerin %95'in üstünde olması, modelin yüksek kalitede ve çözünürlükte olduğunu göstermektedir. Daha düşük çözünürlüğe sahip modeller için ortalama genel kalite faktörü yaklaşık %91 olması beklenmektedir. ProSA programında Z-skor grafiği ve model kalitesini gösteren grafikler kontrol edildiğinde modelin yüksek kalitede olduğu belirlenmiştir. Şekil 17A'da gösterilen negatif Z-skor değeri, modellemenin kaliteli olduğunu göstermektedir (Kwofie vd., 2018). Şekil 17B'de yer alan grafikte ise genellikle amino asit dizisi boyunca her rezidüyle ilişkili enerji veya puan görüntülenir ve bu grafik, yapıda sorunlu veya daha az güvenilir olabilecek bölgelere ilişkin ipuçları vermektedir (Kwofie vd., 2018). Bu grafikte değerlerin negatif olması, kararlı bölgeleri ifade etmektedir.

Modellemesi tamamlanan GstLipC proteini üzerinde, AutoDock 4.0 yazılımı ve COACH-D sunucusu kullanılarak moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her iki programdan elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Her iki araçtan elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve AutoDock 4.0 ile COACH-D'nin otomatik hesaplamalarının büyük ölçüde benzer çıktılar sunduğu gözlemlenmiştir. Ardından, Hotspot Wizard sunucusu kullanılarak mutasyon yapılabilecek bölgeler analiz edilmiştir. Devamında, farklı biyoinformatik veritabanlarından yararlanılarak bu bölgeler daha ayrıntılı şekilde incelenmiştir.

Protein yapısında nokta mutasyonu bölgesine karar vermek, proteinin işlevi, stabilitesi veya etkileşim özelliklerini değiştirme amacı taşıdığından, dikkatli bir şekilde planlanması gereken bir süreçtir. Bu süreçte öncelikle proteinin üç boyutlu yapısı ve yüksek kaliteli bir modeli elde edilmiştir. Hedef bölgenin seçiminde proteinin aktif bölgesi, bağlanma bölgeleri, stabilite açısından kritik veya deneysel verilerle desteklenmiş bölgeler dikkate alınmıştır.

Mutasyon çalışması yapılacak olan aminoasit rezidülerine karar verildikten sonra tekrar modelleme ve moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Moleküler docking sonucunda mutasyonların etkisini tahmin edebilmek için bağlanma enerjisi incelenmiştir. Bağlanma enerjisi, bir protein ve bir ligand arasındaki etkileşimin gücü ve kararlılığı hakkında fikir verdiği için moleküler yerleştirme (docking) çalışmalarında önemli bir parametredir (Meng vd., 2012). Genellikle kcal/mol cinsinden ifade edilen serbest enerji değişimi (ΔG) ne kadar negatifse, bağlanma afinitesi o kadar güçlü ve termodinamik olarak daha elverişli kabul edilmektedir. Bu durum, özellikle yüksek bağlanma afinitesine sahip ligandları belirlenmesi yoluyla daha etkili inhibitör veya substrat tasarımına olanak

sağlayarak ilaç keşfi ve enzim inhibisyonu çalışmalarında faydalıdır. Güçlü bir bağlanma enerjisi, ligandın proteine sıkı şekilde bağlanma olasılığının yüksek olduğunu ve bunun da biyolojik aktivite açısından önemli olduğunu göstermektedir (Morris vd., 2009).

Moleküler docking sonucuna göre karar verilen bölgelerde nokta mutasyonu gerçekleştirilerek yeniden modelleme çalışmaları yapılmıştır ve elde edilen 3D modellerin kalitesi ve uygunluğu analiz edilmiştir. Elde edilen mutant proteinlerin 3D yapıları ilk olarak DyneMine sunucusunda incelenmiştir. DyneMine, dizi tabanlı yöntemler kullanarak protein omurgası esnekliğini tahmin eden bir web sunucusudur. Protein omurgası esnekliğini dizi tabanlı yöntemlerle tahmin etmek, protein işlevini, etkileşimlerini ve yapısal kararlılığını anlamak için önemlidir. Birçok protein, allosterik düzenleme, ligand bağlanması ve enzimatik aktivite gibi biyolojik rolleri için kritik olan konformasyonel değişikliklere uğramaktadır (Sinha vd., 2022).

DyneMine ile yapılan analizler, aynı zamanda protein mühendisliği çalışmaları açısından da önem arz eder; zira bu analizler sayesinde yapısal olarak rijit ya da esnek bölgeler belirlenerek kararlı mutant proteinler tasarlanabilir. Bu da araştırmacıların mutasyonların protein işlevi ve kararlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmesine olanak tanımaktadır (Sljoka, 2021).

Biyoinformatik çalışmalar tamamlandıktan sonra, *gstLipC* gen dizisi üzerinde mutasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yaban tip ve mutant enzim genleri *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) konak hücresinde yüksek düzeyde ekspresyon için klonlanmış ve çeşitli koşullar altında protein ekspresyonları analiz edilmiştir. Farklı şartlarda yürütülen gen ekspresyonları sonucunda, yaban tip ve mutant enzimlerin farklı ekspresyon bant profilleri sergilediği görülmüştür. Ekspresyon sonucunda ekspresyon bandının farklı yerde lokalize olmasının ve farklı bantların elde edilmesi durumunun proteinin N-terminalinde yer alan “Lipo (Sec/SPII)” sinyal bölgesinden kaynaklı olduğu öngörülmektedir.

Lipaz proteinlerindeki lipo (Sec/SPII) kuyruğu, lipoprotein sinyal peptidi olarak görev yapar ve proteini bakterilerde Sec'e bağlı salgılama yolundan yönlendirilir. Bu sinyal peptidi, Sinyal Peptidaz II (LspA) tarafından spesifik olarak kesilerek, kesim bölgesinde korunan sistein rezidüsünün lipit modifikasyonuna uğramasını sağlar. Böylece enzim, membran yüzeyine bağlanabilir hâle gelir. Bu modifikasyon, enzimin uygun membran bölgesine lokalize olmasını ve stabilitesini önemli ölçüde artırır. Ayrıca, lipazın iç membrana (IM) ya

da dış membrana (OM) yönlendirilmesi, ek sıralama sinyallerine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (Kaushik vd., 2022).

Öte yandan, *E. coli* BL21 Star (DE3) hücrelerinde lipo (Sec/SPII) kuyruğu içeren lipaz proteinlerini ifade etmek zorluklar oluşturabilir. Bu suşun, azaltılmış RNaz aktivitesi nedeniyle oluşan yüksek ifade kapasitesi, özellikle Sec mekanizması aşırı yüklenmişse, proteinin yanlış katlanmasına, agregasyonuna veya yanlış yerleşmesine yol açabilir. Proteinlerin uygun şekilde işlenmemesi, hücre içi ortamda (özellikle sitoplazmada veya inklüzon cisimcikleri olarak bilinen yoğun protein yığınlarında) doğru şekilde katlanmamış ya da tamamen katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olabilir. *E. coli* BL21 Star hücrelerinde N terminalinde lipo (Sec/SPII) sinyal peptidi içeren bir lipaz proteininin ekspresyonu, uygun translokasyonu, katlanması ve aktivitesini sağlamak için ekspresyon koşullarının dikkatli bir şekilde optimize edilmesini gerektirmektedir (Sabate vd., 2010).

GstLipC ve mutant enzimlerin beklenen büyüklükte ve aktif formda elde edilebilmesi için farklı ekspresyon şartları denendi fakat hepsi için başarılı bir sonuç elde edilememiştir. İlginç bir şekilde, GstLipC enzimi bütün ekspresyon şartlarında az miktarda ekspres olurken, GstLipC_I184V mutantı beklenen moleküler ağırlıkta güçlü bir ekspresyon bandı vermiştir. Buna karşılık, üç farklı mutant proteine ait analizlerde beklenen moleküler ağırlıkta protein bantları yalnızca çok düşük miktarda saptanmış; buna ek olarak, yaklaşık iki kat daha yüksek moleküler ağırlığa (~58 kDa) sahip ek bantlar gözlemlenmiştir. Bu durum, mutant proteinlerin dimer oluşturma eğiliminde olabileceğini ya da doğru şekilde katlanamadıkları için anormal formlarda biriktiklerini düşündürmektedir.

Bu durumu önlemek için indüksiyon sırasında ortama, katlanmaya yardımcı ajan olarak Dithiothreitol (DTT) eklenmiştir. Dithiothreitol (DTT), biyokimya ve moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan bir indirgeyici maddedir. Proteinler içindeki veya arasındaki disülfür bağlarını (-S-S-) kırarak bunları serbest tiyol (-SH) gruplarına indirger. İndirgeyici gücü, deneysel koşullara bağlı olarak proteinlerin doğal veya katlanmamış hallerinde kalmasına yardımcı olur. Denatürasyon-renatürasyon deneylerinde sıklıkla tercih edilen bu ajan, ısı, pH değişiklikleri ya da üre ve guanidyum klorür gibi kimyasalların etkisiyle oluşabilecek yanlış disülfür köprülerini ortadan kaldırarak düzgün yeniden katlanmayı kolaylaştırır (Ho vd., 2003).

DTT bu yanlış bağları kırmaya yardımcı olarak yeniden düzgün katlanmaya olanak tanır (Wang Y., vd., 2024). Ayrıca, DTT, istenmeyen oksidasyonu engelleyerek yanlış katlanmayı önler ve aktiviteleri için belirli disülfür bağları oluşturan sistein rezidülerine

bağımlı olan proteinler için gerekli olan indirgen ortamı korur. Bazı proteinler, özellikle yanlış disülfür bağları oluşursa, renatürasyon sırasında kümeleşme eğilimindedir (Wang Y., vd., 2017). DTT, sistein rezidülerini indirgenmiş hallerinde tutarak kümeleşmeyi azaltabilir. Bu bilgiler dâhilinde GslLipC ve mutant enzimlerin ekspresyonu aşamasında DTT kullanılarak yanlış katlanmanın büyük oranda engellendiği değerlendirilmiştir. Ayrıca, indüksiyon sırasında DTT ilavesinin, GslLipC ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır. Ayrıca diğer mutant enzimlerin de beklenen moleküler ağırlıkta (~29kDa) daha iyi ekspresyon profili sergiledikleri gözlemlenmiştir.

Ekspresyonu gerçekleştirilen GslLipC ve mutant enzimler, Ni-HisTag kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimlerin öncelikle optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri belirlenmiştir. GslLipC ve mutant enzimler incelendiğinde, optimum pH değerlerinde bir farklılık olmadığı ve Tris-HCl pH 8,0 tamponunda en yüksek aktiviteyi sergiledikleri görülmüştür.

GDSL lipazları, genellikle nötr ile alkali koşullarda optimum aktivite göstermektedirler. Örneğin, *Geobacillus thermocatenulatus*'un bir GDSL lipazı, pH 9,5'da optimum aktivite gösterdi (Jo vd., 2021b). Benzer şekilde, *Geobacillus thermoleovorans*'un bir lipazı pH 9,0'da en yüksek aktiviteyi göstermektedir (Qin vd., 2024b). Buna karşılık, *Ipomoea batatas*'tan (tatlı patates) elde edilen GDSL lipaz benzeri bir enzim, 6,3'lük hafif asidik bir pH'ta en yüksek aktivitesini göstermektedir (Miguel vd., 2020). Bu bulgular, GDSL lipazlarının farklı pH ortamlarına uyum sağlama yeteneğiyle birlikte, çeşitli biyolojik fonksiyonlar ve endüstriyel uygulamalar açısından hayati bir role sahip olduğunu göstermektedir.

GslLipC, GslLipC_I184V ve GslLipC_R196F enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri, 90 °C olarak belirlenmiştir. GslLipC_I184H 100 °C'de daha yüksek aktivite gösterirken, GslLipC_R196L 90 ve 100 °C'de eş seviyede aktivite göstermiştir. GDSL lipazlarının kaynak organizmalarına bağlı olarak oldukça geniş bir sıcaklık aralığında optimum aktivite gösterdiği bilinmektedir. Termofilik, mezofilik ve psikrofilik organizmalardan türetilmiş lipazlar, çevresel adaptasyonları doğrultusunda farklı sıcaklık aralıklarında maksimum katalitik verimlilik sergileyebilir.

Isıyı seven organizmalardan türetilen termofilik GDSL lipazlar, tipik olarak 50 °C ile 80 °C arasında optimum bir sıcaklığa sahiptir ve bazı varyantları 90 °C veya daha yüksek sıcaklıklara kadar aktif kalır. *Bacillus stearothermophilus*'tan elde edilen başka bir lipaz (L1) 68 °C'de yüksek aktivite sergilemektedir (Kim vd., 2000). *Archaeoglobus fulgidus*'dan

elde edilen lipazlardan biri 60 °C’de optimum sıcaklığa sahipken aynı bakteriden elde edilen diğer lipaz ise 90 °C’de optimum sıcaklık sergilemektedir (Zhang vd., 2015). Bu enzimler yüksek sıcaklıklarda oldukça kararlıdır ve bu da onları biyoyakıt üretimi ve deterjan formülasyonu gibi endüstriyel süreçlerde değerli kılar.

Buna karşılık, orta sıcaklıklarda gelişen mezofilik GDSL lipazları, 30 °C ila 45 °C arasında optimum bir aralığa sahiptir ve genellikle gıda işleme ve biyokatalizde kullanılır. 5 °C ile 20 °C arasında optimum bir sıcaklığa sahip olan psikrofilik organizmalardan elde edilen soğuk adaptasyonlu GDSL lipazları, soğuk yıkama deterjanları gibi düşük sıcaklık uygulamaları için optimize edilmiştir. GDSL lipazlarının termal kararlılığı ve sıcaklık hassasiyeti, aşırı sıcak koşullardan soğuk koşullara kadar değişen ortamlarda optimum performans gösterdikleri endüstriyel uygulamaları belirlemede önemli faktörlerdir (Qin vd., 2024b).

GstLipC ve mutant enzimlerinin termal stabiliteleri incelendiğinde 60 °C’de dört saate kadar hem yaban tip hem de diğer mutant enzimlerin aktivitelerini %70 oranında koruduğu görülmüştür. Benzer şekilde, 70 °C’de enzimler dört saate kadar %60 aktivitelerini korumuştur. Sıcaklık yükseldikçe enzimlerin kararlılıklarının azaldığı görülmüştür.

80 °C’de enzimler dört saatin sonunda aktivitelerini %50-60 oranında kaybetmiştir. Bununla birlikte, 90 °C’de, GstLipC_I184V ve GstLipC_R196F mutantların ilk 30 dakikada aktivitelerini önemli derecede kaybettiği görülmüştür. Buna karşın, aynı sıcaklıkta GstLipC_I184H aktivitesini %96 oranında korurken, GstLipC_R196L %88 oranında korumuştur. Yaban tip enzimin ise yine %75 üzerinde aktivitesini koruduğu görülmüştür. Bu üç enzimin, 60 dakikanın sonunda aktivitelerinin yaklaşık %70’ini korudukları gözlenmiştir.

100 °C sıcaklıkta, ilk 30 dakikada, GstLipC, GstLipC_I184V ve GstLipC_R196F enzimlerinin aktivitelerinin %50’nin altına düştüğü gözlenmiştir. Fakat GstLipC_I184H %83 ve GstLipC_R196L aktiviteleri %77 oranında korunduğu saptanmıştır. Bir saatin sonunda her iki enzimin aktivitesi %65’in altına düştüğü tespit edilmiştir.

GDSL lipazları, kaynak organizmalarına ve yapısal adaptasyonlarına bağlı olarak değişen derecelerde termostabilite gösterir. Özellikle *Geobacillus thermocatenulatus* ve *Geobacillus thermoleovorans* gibi termofilik türlerden izole edilen GDSL lipazlar, 50–70 °C gibi yüksek sıcaklıklarda uzun süre aktivite koruyarak yüksek termal stabilite sergiler (Jo vd., 2021b). Bu stabilite, yüksek hidrojen bağları, disülfid köprüleri ve yüksek sıcaklıklarda

enzim bütünlüğünün korunmasına yardımcı olan kompakt bir hidrofobik çekirdek gibi yapısal özelliklere atfedilir.

GDSL lipazları genellikle hidrofobik bir çekirdeğe sahiptir, bu da hidrofobik rezidülerin suya maruz kalmasını en aza indirir ve böylece yüksek sıcaklıklarda açılmayı önler. Ek olarak, yapıları içindeki güçlü hidrojen bağları enzim bütünlüğünün korunmasına yardımcı olurken, sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprülerinin varlığı stabilitelerini daha da güçlendirir (Lv vd., 2011). Termofilik GDSL lipazları ayrıca kompakt ve sert bir yapıya sahip olma eğilimindedir, bu da esnekliği azaltır ve onları ısı denatürasyonuna karşı daha az duyarlı hale getirir (Anderson vd., 2022).

GstLipC ve mutant enzimler üzerinde metal iyonların etkisi incelendiğinde enzimler arasında belirgin bir aktivite farklılığı gözlemlenmemiştir. Ancak bazı iyonların varlığında genel bir inhibisyon eğilimi tespit edilmiştir. 1 mM Hg^{2+} varlığında tüm enzimlerin aktivite düzeyleri %80'in altına düşerken, 1 mM Fe^{2+} iyonu varlığında bu oran %60'ın da altına inmiştir. Ayrıca, 1 mM Co^{2+} iyonu bulunduğunda GstLipC_I184V ve GstLipC_R196L enzimleri %80'in altında kalırken, diğer üç enzim yaklaşık %90 aktivite koruma düzeyi sergilemiştir.

Metal iyonlarının konsantrasyonu 5 mM'ye çıkarıldığında, bazı geçiş metalleri ve ağır metallerin (Hg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}), tüm enzimlerin aktivitelerini ciddi bir şekilde etkileyerek %50'nin altına kadar inmelerine neden olmuştur. Bu sonuçlar, söz konusu iyonların enzimler üzerinde inhibe edici etki gösterdiğini ve bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmaların, iyonlara özgü kimyasal özelliklerle ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Güçlü inhibitör etkileriyle bilinen Hg^{+2} , enzimin aktif bölgesinde veya başka bir yerinde bulunan sistein rezidülerinin tiyol gruplarına (-SH) bağlanabilir ve böylece enzimin yapısını ve işlevini bozabilir (Carvalho vd., 2008; Stratton vd., 2017). Benzer şekilde, Fe^{+2} ve Cu^{+2} iyonları, amino asit rezidülerinde oksidatif modifikasyonlara neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek oksidatif stresi indükleyerek enzimlerin 3D yapılarını etkiler (Tiwari vd., 2019). Co^{+2} metal bağımlı kofaktörlerle rekabetçi bir şekilde etkileşime girerek aktif bölgedeki doğru metal iyon koordinasyonunu bozar ve enzimin katalitik aktivitesini inhibe edebilir (Husain ve Mahmood, 2019).

Bu bağlamda, Hg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} ve Co^{2+} gibi metal iyonlarının hem yaban tip hem de mutant GstLipC enzimleri üzerinde güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği ve yapısal bütünlüğü bozarak enzimatik aktiviteyi önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır.

GstLipC ve mutant enzimler, çeşitli deterjanlarla muamele edilerek aktivite değişimleri değerlendirilmiştir. %1 oranında uygulanan yüzey aktif maddelerden Tween® 20, enzim aktivitesini yaklaşık %50 oranında azaltırken; Triton™ X-100, tüm enzimlerin aktivitesinde %30–40 arasında artışa neden olmuştur. Dikkat çekici biçimde, SDS (sodyum dodesil sülfat) varlığında enzim aktivitelerinin yaklaşık iki katına çıktığı gözlemlenmiştir.

Deterjan konsantrasyonu %5'e çıkarıldığında, Tween® 20'nin varlığında enzim aktivitesinde %60 civarında azalma meydana gelmiştir. Triton™ X-100'ün %5'lik konsantrasyonu ise enzim aktivitelerini %80'in altına düşürmüştür. Öte yandan, SDS varlığında enzimlerin aktivitesinde %20 oranında artış gözlenmeye devam etmiştir.

GDSL lipazlarının, anyonik yüzey aktif maddeler dâhil olmak üzere deterjan formülasyonlarındaki çeşitli bileşenlerle uyumlu olduğu bulunmuştur. Bu uyumluluk, bunların bu yüzey aktif maddelerle birlikte etkili bir şekilde işlev görmesini sağlayarak genel temizleme performansını artırır (Gülmez ve Atakisi, 2022). Anyonik deterjanların varlığı, enzim ve substratlar arasında daha iyi etkileşimi kolaylaştırabilir ve yağların hidrolizinin iyileştirilmesine yol açabilir (Kwon vd., 2009).

Bazı GDSL lipazları, lipitleri çözmeye ve substrat erişebilirliğini artırmaya yardımcı olan SDS gibi anyonik deterjanlar dâhil olmak üzere yüzey aktif maddelerin varlığında, dikkate değer stabilite ve aktivite göstermektedir. (Cherif vd., 2011; Zhao vd., 2021). Anyonik yüzey aktif maddeler içeren belirli formülasyonların lipaz aktivitesini önemli ölçüde artırdığı, Mehrnoush Amid vd. (2015)'in yapmış olduğu bir çalışmada ifade edilmektedir (lipazın aktivitesinin başlangıç aktivitesinin %120'sini aştığı gösterilmiştir) (Amid vd., 2015).

Sonuç olarak literatürde yer alan çalışmalarda, GDSL lipazlarının işlevleri ve özellikleri vurgulanmasına rağmen, hiçbir literatürün SDS'nin GDSL lipazlarının aktivitesini artırdığına dair açıkça bir ifadede bulunmadığı gözlenmektedir. Bunun yerine, belirli GDSL lipazlarının SDS'yi tolere edebileceğini veya aktivitelerinin genetik veya çevresel manipülasyonlarla artırılabilirliği öne sürülmektedirler. Dolayısıyla SDS'nin GDSL lipaz aktivitesini potansiyel olarak artırabileceği koşulları keşfetmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

İnhibitörlerin varlığında, enzimlerin aktiviteleri üzerinde belirgin bir etki gözlemlenmemiştir. 1 mM PMSF varlığında enzimlerin aktivitesi %95'in altına düşerken, 5 mM PMSF varlığında %80'in altına düştüğü gözlenmiştir. PMSF, serin proteaz inhibitörü olarak bilinir ve GDSL lipazlarının aktif bölgelerinde yer alan serin rezidüsüne kovalent bağ

oluşturarak bu enzimlerin aktivitesini azaltabilmektedir (Santana vd., 2017). Bu durum GstLipC ve mutant enzimlerin PMSF'nin olumsuz yönde etkilenmesini açıklamaktadır.

GDSL lipazlarının PMSF ile inhibisyonuna dair bir çalışmada, yaklaşık 2 mM PMSF varlığında %88'e kadar inhibisyon; 8 mM konsantrasyonunda ise yaklaşık %50 oranında inhibisyon gözlenmiştir (Gururaj vd., 2016). Bu inhibisyonun derecesi, pH, sıcaklık ve metal iyonları veya organik çözücüler gibi diğer bileşiklerin varlığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Ek olarak, farklı GDSL lipaz kaynakları PMSF'ye karşı değişen hassasiyetler gösterir; örneğin, *Ipomoea batatas*'tan elde edilen lipazlar güçlü inhibisyon gösterirken, *Streptomyces rimosus*'tan elde edilenler minimal inhibisyonlar gösterir (Adediran vd., 2018).

Yapısal analizler, PMSF'nin enzimin aktif bölgesine doğrudan bağlanmak yerine, yüzeyde yer alan hidrofobik bir boşluğa bağlandığını göstermektedir. Bu bağlanma, PMSF'nin serin rezidüsüne doğrudan etkileşiminden ziyade, yapının bütünsel konformasyonunu bozarak katalitik aktiviteyi dolaylı olarak engellediğini düşündürmektedir. Bu bulgu, aktif bölgede yer alan serin rezidüsünün GDSL lipazların katalitik mekanizmasındaki merkezi rolünü dolaylı yoldan da olsa doğrulamaktadır. Aynı zamanda, serin kalıntısının yapısal çevresiyle olan etkileşimlerinin inhibitör bağlanmasına duyarlılığı artırdığı ve enzim aktivitesinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı belirtilmektedir (Chen vd., 2023).

Benzer şekilde DTT'nin de enzimlerin aktivitesini negatif yönde etkilediği bilinmektedir. İndirgenme ajanı olarak bilinen DTT (Dithiothreitol), özellikle proteinlerdeki disülfid bağlarını kırarak serbest tiol (-SH) gruplarını yeniden oluşturur (SA Jadhav, 2023). 5 mM DTT varlığında, yaban tip ve mutant enzimler aktivitelerinin yaklaşık %80'ini korumayı başarmıştır. Yaban tip ve mutant enziminin 5 mM DTT varlığında aktivitesinin %20 azalması, DTT'nin muhtemelen enzimin yapısındaki kritik disülfür bağlarını indirgediğini ve böylece kısmi yapısal stabilite kaybına yol açtığını göstermektedir (Anderson vd., 2022).

Organik çözücülerin, yaban tip ve mutant enzimlerini negatif yönde etkilemediği gözlemlenmiştir. Yaban tip ve mutant enzimlerin aktiviteleri, %5 oranında etanol, ACN ve DMSO'ya maruz bırakıldığında, önemli oranda korunurken, aktivitelerinin metanol varlığında yaklaşık %150-200 oranında arttığı görülmüştür. Aynı çalışma, %10 metanol varlığında gerçekleştirildiğinde enzimlerin %100-110 oranında aktivitelerini koruduğu belirlenmiştir.

Diğer çözücülerin varlığında da enzimler aktivitelerinin yüksek oranda korunduğu gözlenmiştir.

GDSL lipazlarının, organik çözücülere karşı genel olarak dirençli olduğu ve bu koşullar altında katalitik aktivitelerini sürdürebildikleri bilinmektedir. Örneğin, *Lactacaseibacillus rhamnosus*'tan elde edilen bir lipazın, %10 oranına kadar olan aseton ve gliserol içeren çeşitli çözücü ortamlarda aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Kang vd., 2024).

Organik çözücüler, lipolitik işlevleriyle bilinen çeşitli bir enzim ailesi olan GDSL lipazlarının aktivitesini düzenlemede önemli bir rol oynayan kritik faktörlerden biridir (Sharma ve Kanwar, 2014). GDSL lipazlar, sulu olmayan ortamlarda dikkate değer bir kararlılık ve katalitik verimlilik sergiler ve bu da onları çeşitli endüstriyel uygulamalar için uygun hale getirir. Örneğin, *Lactacaseibacillus rhamnosus*'un bir GDSL lipazı üzerinde yapılan bir çalışma, enzimin aseton ve gliserol gibi organik çözücülerin %10 konsantrasyonlarında bile aktivitesini önemli derecede koruduğunu göstererek zorlu koşullardaki sağlamlığını vurgulamıştır (Kang vd., 2024).

Dahası, çözücünün polaritesi ve hidrofobikliği, enzimin yapısını ve işlevini etkileyebilir; polar olmayan çözücüler genellikle enzim kararlılığını artırırken, polar çözücüler substrat çözünürlüğünü ve katalitik performansı iyileştirebilir (Ingenbosch vd., 2022; Qin vd., 2024b). GDSL lipazlarının organik çözücülere bu şekilde uyum sağlaması, yalnızca biyotransformasyon süreçlerinde kullanımlarını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda biyodizel üretimi ve deterjan formülasyonu gibi uygulamalardaki potansiyellerini de artırır (Jo vd., 2021).

Yaban tip ve diğer mutant enzimlerin kinetik parametreleri incelendiğinde moleküler docking ile orantılı olarak seçilen dört mutasyon çeşidinin enzim aktivitesini etkilediği gözlenmiştir. Yaban tip ve diğer mutant enzimlerin K_m değerleri incelendiğinde mutant enzimlerin K_m değerlerinin doğal enzime göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

Bu tez kapsamında, enzimatik aktivite tayinleri Triton™ X-100 varlığında *p*-nitrofenil palmitat (pNPP) substratı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatürde GDSL ailesine ait lipazların Triton™ X-100 eşliğinde *p*NPP substratına karşı gösterdiği kinetik parametreler Tablo 22'de derlenmiş ve karşılaştırma amacıyla sunulmuştur:

Tablo 22. Triton™ X-100 varlığında GDSDL lipazlarının pNPP substratına karşı aktiviteleri

GDSL Lipaz Kaynağı	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)	Referans
<i>Bacillus subtilis</i>	1,2 ± 0,1	2,5	-	-	(Jaeger et al., 1994)
<i>Acinetobacter sp.</i>	0,51	16,98	95 ± 6	4,7 × 10 ³	(Le et al., 2020)
<i>Psychrotrophic Lipase</i>	0,104	3,58	60 ± 4	4,0 × 10 ⁴	(Kumar et al., 2020)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	0,51	16,98	-	-	(Qin et al., 2024b)
<i>Bacillus licheniformis</i> MTCC 6824	0,64	29	-	-	(Chakraborty & Raj, 2008)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7	0,33	18,8	-	-	(Kambourova et al., 2003)
<i>Pseudomonas gessardii</i>	0,66	1,473	-	-	(Ramani et al., 2010)

Tabloda sunulan verilerle karşılaştırıldığında, çalışmamızda elde edilen yaban tip ve mutant enzimlerin kinetik parametrelerinin literatür ile uyumlu olduğu gözlenmektedir. K_m değerlerinde ortam koşullarına bağlı olarak belirgin değişiklikler gözlemlenirken, V_{max} ve k_{cat} gibi diğer kinetik parametrelerde daha sınırlı farklılıklar kaydedilmiştir.

GDSL lipazlarının kinetik değerlerinin esnek aktif bölgeleri ve substrat etkileşimlerinin doğası nedeniyle hidrofobik ve hidrofilik ortamlarda önemli ölçüde değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (Chen vd., 2023). Hidrofobik ortamlarda, GDSDL lipazları genellikle hidrofobik substratlarla etkileşime girer ve bu da substrat bağlanmasını ve aktif bölge içinde konumlandırılmasını kolaylaştırarak aktivitelerini artırabilir (Akoh vd., 2004). Bazı GDSDL enzimlerindeki substrat bağlama bölgelerinin hidrofobik yapısı, bunların etkili bir şekilde orta zincirli yağ asitlerine katalizlerini sağlar.

Buna karşılık, hidrofilik ortamlar enzimin hidrofobik substratlara olan afinitesini azaltabilir veya potansiyel olarak artırabilir. Ancak bazı GDSDL lipazları sulu ortamlarda aktivite göstermektedir ve bu da GDSDL lipazlarının, farklı koşullara uyum sağlayabileceğini göstermektedir. Triton™ X-100 gibi yüzey aktif maddelerin varlığı, enzimin etrafında hidrofobik bir ortam yaratarak substrat çözünürlüğünü ve erişilebilirliğini artırabilir (Albayati vd., 2020). Bu misel, substratları stabilize ederek ve enzim-substrat etkileşimlerini kolaylaştırarak enzimlerin kinetik özelliklerini iyileştirir.

GDSL lipazlarının kinetik değerleri, reaksiyon ortamında imidazolün varlığından önemli ölçüde etkilenmektedir. İmidazol, tamponlama kapasitesi ve proteinleri stabilize etme yeteneği nedeniyle biyokimyasal uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. Varlığı, enzimin yapısal stabilitesini artırarak GDSDL lipazlarının genel katalitik aktivitesini yükseltebilir; bu durum, enzimin doğru, kararlı ve fonksiyonel üç boyutlu

konformasyonunun oluşumunu destekleyebilir. Bu stabilizasyon, imidazolun substrat bağlanmasını kolaylaştırmakla birlikte K_m değerlerinin azalmasına neden olabilmektedir (Taghizadeh vd., 2021).

Ancak bazı durumlarda, imidazol enzime bağlanmak için substratla rekabet etmekte ve bu durum K_m değerlerinin artmasına neden olabilmektedir. Öte yandan, imidazol, enzimin aktif konformasyonunu stabilize ederek katalitik verimliliği artırmakta ve bu durum V_{max} değerinin artmasına yol açabilmektedir. Bununla birlikte, aktif konformasyonuna müdahale ederek enzimin inhibe olmasına da neden olabilmektedir. Bu etkileşimlerden turnover sayısı (k_{cat}) da etkilenmektedir; daha yüksek k_{cat} değerleri artırılmış katalitik verimliliği, daha düşük değerler ise inhibisyonu göstermektedir. Genel olarak, imidazolün GDSL lipazlarının kinetik parametreleri üzerindeki etkisi karmaşıktır ve konsantrasyona ve enzim ve substratla spesifik etkileşimlere bağlı olarak değişebilmektedir (Janssen vd., 2019).

Genel olarak, GDSL lipazlarının farklı ortamlara uyum sağlayabilmesi kinetik özellikleri açısından çok önemlidir. Çok çeşitli substratlara bağlanma yetenekleri, aktif bölgenin ve çevreleyen ortamın hidrofobisitesinden etkilenir. Ortamın hidrofobisitesindeki değişiklikler, substrat bağlanmasını ve enzim aktivitesini etkileyerek k_{cat}/K_m oranı üzerinden katalitik verimliliği değiştirebilmektedir.

gstLipC geninin mutant varyantları, pNW33N plazmitine klonlanmış ve *Geobacillus stearothermophilus* bakterisine transformasyon yoluyla aktarılmıştır. Devamında, rekombinant plazmitler aracılığı ile mutant enzimlerin bakteri genine entegrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak, entegrasyon çalışmalarından olumlu sonuç elde edilememiştir. Bu başarısızlığın, entegrasyon için kullanılan mutant gen dizileri ile bakterinin genomik *gstLipC* geni arasında yalnızca bir veya iki nükleotitik farklılık bulunmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu sınırlı farklılık, homolog rekombinasyon verimliliğini düşürerek entegrasyonun gerçekleşmesini engellemiş olabilir.

Entegrasyon başarısızlığı üzerine alternatif bir strateji olarak, pNW33N plazmidine klonlanan mutant gen dizilerinin *Geobacillus stearothermophilus* içerisinde doğrudan ekspresyonu sağlanmıştır. Termofilik koşullarda yüksek protein ekspresyon kapasitesi sunan pNW33N plazmiti, bu amaçla yaygın olarak kullanılmakta olup *lac* promotörü içeren indüklenebilir yapısıyla dikkat çeker (Blanchard vd., 2014). *lac* gibi indüklenebilir promotörler, araştırmacıların protein ekspresyonunun zamanlamasını ve seviyesini kontrol etmelerine olanak tanır. Bu durum, özellikle yüksek verimin gerekli olduğu endüstriyel koşullarda, aşırı protein üretiminin konak hücrede strese veya yavaş büyümeye neden

olmasını önlemek açısından önemlidir. İndüklenebilir bir sistemle, hedef proteinin ekspresyonu, bir baskılayıcı proteine bağlanan ve promotörün ekspresyonu yönlendirmesine izin veren IPTG veya başka bir kimyasal ajan gibi bir indükleyicinin eklenmesiyle tetiklenebilir.

Termofilik bakteri, doğal ortamının yüksek sıcaklıklarda rekombinant proteinlerin katlanmasını ve stabilitesini desteklemesi nedeniyle ısıya dayanıklı proteinlerin üretimi için özellikle avantajlıdır. Dolayısıyla, mutant GslipC enzimlerini kodlayan pNW33N plazmitleri bakteride ekspres edilerek lipazların başarılı şekilde ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve bu enzimlerin spor yapısına dâhil edilmesi sağlanmıştır. Daha sonra, *Geobacillus stearothermophilus* ve rekombinant plazmit bulunan (pNW33N_gslipC_mut) bakterilerden spor üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yaban tip ve mutant enzimleri içeren *Geobacillus stearothermophilus*'da sporulasyon çalışmaları sonucunda istenilen sporlar üretilmiştir. Üretilen sporlar, malaşit yeşili ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Elde edilen sporlar saflaştırılarak germinasyon analizlerine tabi tutulmuştur. Spor germinasyonu, uykuda olan sporların aktif büyüme evrelerine geçişini işaret eden kritik bir biyolojik süreçtir. Bu süreç genellikle sporların besin gibi elverişli çevre koşullarıyla karşılaşmasıyla başlar. Bu nedenle, sporların germinasyon çalışmaları için uygun besin ortamı oluşturuldu. Ayrıca, sporların germinasyon aşamasına geçmesini sağlayan L-alanin kullanılarak sporların aktifleşmesi sağlandı. Aktifleşen sporlar, su emer ve şişer, bu da koruyucu dış katmanlarının parçalanmasına yol açan bir süreçtir. Bu hidrasyon sürecinde, germinasyon için gerekli olan kalsiyum dipikolinat (Ca-DPA) salınımı da dâhil olmak üzere spor içindeki metabolik aktiviteler başlar (Moir, 2006). Sporlar bu aşamaya ulaştıklarında, germinasyon süreci başlar ve metabolik aktivite yeniden başlatılır. Sporların germinasyon süreci birçok yöntem ile takip edilebilir.

Sporların germinasyon sürecini takip etmek için, faz kontrast ve epifloresan mikroskopisi gibi mikroskopi yöntemleri, kırılma indislerine ve metabolik aktivitelerine dayanarak uykuda olan ve çimlenmiş sporları ayırt etmek için yaygın olarak kullanılır (Liu vd., 2015). Akış sitometrisi, büyük spor popülasyonlarını analiz etmek, boyutlarını, kırılma kapasitelerini ve fizyolojik durumlarını değerlendirmek için yüksek verimli bir yaklaşım sunar. Bu yöntemler toplu olarak, endospor çimlenme dinamikleri ve bu temel süreci etkileyen faktörler hakkındaki önemli katkılar sunar (Zhang vd., 2015). Endosporların çimlenme sürecini bir spektrofotometre kullanarak gözlemlemek için, sporlar uyku halinden aktif büyümeye geçerken optik yoğunluktaki (OD) değişiklikler ölçülmektedir (Atluri vd.,

2006). Bu süreç, besin maddeleri ve çimlenme maddeleriyle zenginleştirilmiş uygun bir çimlenme ortamında endospor süspansiyonu hazırlamakla başlar. Uykuda olan sporlar, susuz çekirdekleri ve kalın koruyucu katmanları nedeniyle yüksek kırılma özelliği gösterir ve bu da daha yüksek bir OD₆₀₀ değerine yol açar. Sporlar çimlendikçe kırılma özelliğini kaybeder ve bu da tipik olarak belirli dalga boylarında ölçülebilir bir azalmaya yol açar. OD'deki bu değişiklik, canlı sporların konsantrasyonuyla ilişkilidir ve çimlenme kinetiğine ilişkin içgörüler sağlamak için ölçülmektedir.

Geobacillus stearothermophilus ve rekombinant plazmitleri içeren bakterilerden elde edilen sporların germinasyon işlemi spektrofotometre yardımıyla izlenmiştir. Sporların germinasyon sürecini analiz etmek için spektrofotometrede OD₆₀₀ ve OD₄₀₅ nm dalga boyunda her 15 dakikada bir ölçüm alınmıştır. Germinasyon çalışmaları farklı spor konsantrasyonları üzerinde denenmiştir. Başlangıçta yaklaşık 10⁸ spor/mL konsantrasyonunda yapılan ölçümlerde OD₄₀₅ değerinde 30. dakikada artış gözlenmiştir; bu, muhtemelen spor germinasyon lipazının (GstLipC_mut) pNPP substratıyla reaksiyonundan kaynaklanmaktadır. Ancak OD₆₀₀ değerinde belirgin bir azalma izlenmemiştir.

Bunun üzerine, spor konsantrasyonu 10⁶ spor/mL'ye düşürülerek ölçümler tekrarlandığında, germinasyonun ilk 15 dakikasında OD₄₀₅ değerinde belirgin bir azalma saptanmış ve bu durum sporların çimlenmeye başladığını göstermiştir. Sporların miktarı artırılarak germinasyon süreci takip edildiğinde ise OD₄₀₅'de herhangi bir azalma görülmemiştir. Dolayısıyla sporların germinasyon süresinde spektrofotometrik ölçümlerde azalma eğrisini görebilmek için belirli konsantrasyona sahip olması gerektiği görülmüştür.

Sporların çimlenme zamanını bir spektrofotometre kullanarak takip ederken, spor miktarı optik yoğunluk (OD) ölçümlerini doğrudan etkilemektedir (McCormick, 1965). Yaklaşık olarak bir konsantrasyon aralığı 10⁶ ile 10⁷ spor/mL başına spor sayısı optimum sonuçlar için önerilir. Bu aralık, spektrofotometrenin sporlar çimlenirken ve vejetatif hücrelere dönüşürken OD'deki düşüşü doğru bir şekilde ölçebilmesini sağlar (Paredes-Sabja vd., 2008b). Spor konsantrasyonu çok düşükse, OD'deki değişiklikler cihazın tespit sınırının altına düşebilir ve bu da güvenilir olmayan verilere yol açabilmektedir (Atluri vd., 2006). Ters durumda ise aşırı yüksek konsantrasyonlar doğru ölçümleri engelleyen bulanıklığa neden olabilmektedir. Bu nedenle, uygun bir spor konsantrasyonunun sürdürülmesi, spektrofotometrik teknikler kullanılarak çimlenme sürecinin etkili bir şekilde izlenmesi ve analiz edilmesi için çok önemlidir.

Yaban tip ve rekombinant plazmidleri içeren *Geobacillus stearothermophilus*'tan elde edilen sporlar kullanılarak biyolojik indikatör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyolojik indikatör çalışmaları kapsamında, farklı spor konsantrasyonlarında ($\sim 10^5$ – 10^9 spor/mL) elde edilen sporlar test edilmiştir. En iyi aktivite ve en kısa sonuç verme süresi, yaklaşık 10^5 – 10^6 spor/mL aralığında elde edilmiştir. 10^6 – 10^7 spor bulunan indikatörler yaklaşık 6 saat sonra sonuç vermiştir. Bununla birlikte 10^7 – 10^8 ve 10^8 – 10^9 spor bulunan indikatörlerin 12 saatten önce sonuç vermediği görülmüştür. Bu çalışmaların sonucunda spor miktarının fazla olmasının biyolojik indikatörlerin sonuç verme süresini uzattığı ortaya koymuştur.

Yüksek spor konsantrasyonu sanılanın aksine daha uzun sürede sonuç vermiştir. Bunun nedenlerinden birinin ortamda bulunan besin miktarının sınırlı olmasından kaynaklı olabileceği değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, ortamda yoğun olarak bulunan sporlar, L-alanin, inozin veya amino asitler gibi çimlenme maddeleri için kendi içlerinde rekabet edebilir. Sporların germinasyonu tetiklemesi için ilk olarak spor zarındaki germinasyon reseptörlerinin ortamda bulunan L-alanin gibi moleküller ile spesifik olarak etkileşime girmesi gerekmektedir. Bu moleküllerin sınırlı bulunabilirliği germinasyon fazını uzatabilir veya eksik germinasyona neden olabilir (Nicholson vd., 2000). Besin rekabetine ek olarak, fiziksel sıkışıklık da çimlenmeyi engelleyebilmektedir.

Sporlar kalın, koruyucu bir kılıfa ve susuz bir çekirdeğe sahiptir ve başarılı çimlenme için verimli su alımı ve enzimatik aktivite gerektirir. Sıkıca paketlenmiş süspansiyonlarda, sterik etkiler sporların içine su difüzyonunu sınırlayabilir, çekirdeğin yeniden sulanmasını geciktirebilir ve çimlenme oranlarında değişkenliğe neden olabilir (Setlow vd., 2003). Dahası, spor sıkışıklığı, peptidoglikan korteksini parçalamak ve tam spor aktivasyonuna izin vermek için gerekli olan CwlJ ve SleB gibi korteks-litik enzimlerin etkisini bozabilmektedir (Atluri vd., 2006). Bu enzimlerin yoğun popülasyonlarda verimli bir şekilde işlev görememesi, yalnızca kısmen çimlenen veya uykuda kalan sporlarla sonuçlanabilmektedir.

Bir diğer önemli faktör metabolik yan ürünlerin birikmesidir. Germinasyon sırasında sporlar, vejetatif hücrelere geçişin bir parçası olarak dipikolinik asit (DPA), kalsiyum iyonları ve diğer küçük molekülleri serbest bırakır. Yüksek yoğunluklu kültürlerde, bu yan ürünler birikerek potansiyel olarak çevredeki ortamın pH'sını ve iyonik dengesini değiştirebilmektedir. Asitleşme veya aşırı iyonik konsantrasyonlar spor zarının işlevini olumsuz etkileyebilir ve daha fazla çimlenmeyi engelleyebilmektedir (Setlow, B., vd., 2009). Farklı spor konsantrasyonları üzerinde gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda, biyolojik indikatörlerde optimal kullanım için önerilen spor yoğunluğunun

yaklaşık 10^5 – 10^6 spor/ml düzeyinde olması gerektiği sonucuna varılmıştır. İlk prototip biyolojik indikatörlerde, sporlar herhangi bir taşıyıcı materyale sabitlenmeden direkt olarak sisteme eklenmiş ve bu yapılandırma indikatörlerin geç sonuç vermesine neden olmuştur. Bunun nedeni sporların biyolojik indikatör içinde serbest halde bulunmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Sporları taşıyıcı bir materyale yerleştirmek yerine ortamda serbest bırakılmasının biyolojik indikatörlerin sonuç vermesi için gereken süreyi potansiyel olarak geciktirdiği düşünülmektedir. Serbest sporlar eşit olmayan bir şekilde dağılabilmekte, bu da çimlenme ve büyümede değişkenliğe yol açabilecek çimlenme ve besin maddelerine maruz kalmalarını etkileyebilmektedir. Ek olarak, yapılandırılmış bir taşıyıcı olmadan sporlar daha az elverişli bir mikro çevre yaşayabilir ve bu da metabolik aktivasyonu potansiyel olarak geciktirebilmektedir (Setlow, B., 2014).

Biyolojik indikatör tasarımının ikinci aşamasında, sporlar yüzeylere sabitlenerek yapılandırılmış indikatörler oluşturulmuştur. Bu indikatörlerin, ticari biyolojik indikatörlerle eş zamanlı sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Ticari biyolojik indikatörler 3 saatin sonunda sonuç vermektedir. *Geobacillus stearothermophilus* ve rekombinant bakterilerden elde edilen sporlar kullanılarak oluşturulan biyolojik indikatörlerin de yaklaşık olarak aynı sürede sonuç verdiği belirlenmiştir.

Üç farklı marka üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H sporunun bulunduğu indikatörlerin diğer sporlara kıyasla birkaç dakika önce renk değiştirmeye (sararmaya) başlaması dikkat çekmektedir. Bu durumun söz konusu sporun yapısında bulunan mutant enzimin (rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H) esneklik yapısı incelendiğinde doğal ve diğer mutant enzimlere nazaran aktif bölge çevresinde bir esneklik oluşturduğu görülmüştür. GDLS lipazlarının aktivitelerini göstermeleri için ortam koşullarının önemi daha önceki paragraflarda vurgulanmıştır. Kinetik parametreler dikkate alındığında, Triton™ X-100 varlığında GstLipC_I184H'nin K_m değeri yaban tipe göre daha düşük, imidazol varlığında ise daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, GstLipC_I184H enziminin ortam koşullarından yaban tip ve diğer mutant enzimlere kıyasla daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Dolayısıyla, çimlenme sırasında oluşan çevresel koşulların, özellikle GstLipC_I184H enzimi için daha elverişli olduğu ileri sürülebilir.

Rekombinant *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H suşunu içeren biyolojik indikatörlerin daha erken sonuç vermesi, beklenen bir durumdur. Ancak, bu indikatörlerden yalnızca birkaç dakika sonra diğer rekombinant sporları içeren indikatörlerin

de pozitif sonuç vermesi, gruplar arasındaki toplam yanıt süresi farkının minimal düzeyde olduğunu ortaya koymaktadır. LİSTER marka floresan tabanlı biyolojik indikatörlerle yürütülen ölçümler sonucunda, GstLipC_I184H mutant sporlarını içeren indikatörlerin daha yüksek floresan sinyali verdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, söz konusu mutant enzimin aktivitesine bağlı olarak spor çimlenme sürecinin daha hızlı tetiklendiğini düşündürmektedir.

Elde edilen veriler, nihai hedefe henüz ulaşılmamış olsa da, ilerleyen çalışmalarda umut vadeden sonuçların ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Bu çalışma kapsamında, *Geobacillus stearothermophilus*/pNW33N_gstLipC_I184H suşuna ait rekombinant sporların kontrol grubuna kıyasla birkaç dakika daha erken sonuç vermesi ve aynı zamanda florometrik ölçümlerde daha yüksek sinyal değerleri göstermesi, bu sporların daha hızlı bir aktivasyon kapasitesine sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular doğrultusunda, biyolojik indikatörlerde kullanılan germinasyon solüsyonları üzerinde yapılacak optimizasyonlarla indikatörlerin daha kısa sürede sonuç verebileceği öngörülmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, öncelikle biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 suşuna ait GDSL lipaz enzimi (GstLipC), HotSpot 3.0 Wizard web sunucusu aracılığıyla analiz edilerek mutasyona açık bölgeler (hotspot bölgeleri) belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda, proteinin aktif bölgesine yakın konumda yer alan I184 ve R196 pozisyonlarındaki amino asit rezidüleri öncelikli olarak değerlendirilmiş; bu bölgelerde in silico mutasyonlar gerçekleştirilmiş ve bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Elde edilen bağlanma enerjileri sırasıyla: GstLipC için -5,48 kcal/mol, GstLipC_I184H için -7,74 kcal/mol, GstLipC_I184V için -8,61 kcal/mol, GstLipC_R196L için -6,52 kcal/mol ve GstLipC_R196F için -6,27 kcal/mol olarak bulunmuştur.

Biyoinformatik analizlere dayanarak seçilen dört mutant (I184H, I184V, R196L ve R196F) oluşturulmuş ve yaban tip ve bu mutasyonları içeren *gstLipC* genleri pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmitler, ekspresyon amacıyla *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star hücrelerine transforme edilmiştir. Ekspres edilen enzimler Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Enzimlerin sıcaklık profili incelendiğinde; GstLipC, GstLipC_I184V ve GstLipC_R196F en yüksek aktiviteyi 90 °C’de, GstLipC_I184H ise 100 °C’de göstermiştir. GstLipC_R196L mutantı ise hem 90 °C hem de 100 °C’de maksimum aktivite göstermiştir. Optimum pH değerleri incelendiğinde, tüm enzimlerin Tris-HCl tamponunda (pH 8) en yüksek aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır.

Termal stabilite analizlerinde, 60 ve 70 °C’de yaklaşık 360 dakika sonunda enzim aktiviteleri %50’nin altına düşerken; 80 °C’de bu süre 240 dakikaya gerilemiştir. 90 ve 100 °C’de ise GstLipC, GstLipC_I184V ve GstLipC_R196F ilk 30 dakikada aktivitelerinin %50’sinden fazlasını kaybetmiştir. Buna karşılık, GstLipC_I184H ve GstLipC_R196L, 90 °C’de ilk 30 dakikada aktivitelerinin %90’ından fazlasını korumuş; 100 °C’de ise aktivitelerinin %80’inden fazlasını sürdürebilmiştir.

Metal iyonlarının enzim aktiviteleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. 1 mM Fe²⁺ varlığında enzim aktiviteleri %60’ın altına, 5 mM Fe²⁺ varlığında ise %40’ın altına düşmüştür. 1 mM Hg²⁺ iyonu da benzer şekilde enzim aktivitesini %80’in altına indirmiştir. 1 mM Co²⁺, özellikle GstLipC_I184V ve GstLipC_R196L enzimlerinin aktivitesini %80’in

altına düşürürken, diğer enzimler üzerinde belirgin bir etkisi gözlenmemiştir. 5 mM Hg^{2+} , Co^{2+} ve Cu^{2+} iyonları hem doğal hem de mutant enzimlerin aktivitelerini %50–60 oranında inhibe etmiştir. Diğer metal iyonları ise anlamlı bir etki göstermemiştir.

Yüzey aktif maddelerin etkileri incelendiğinde; %1 ve %5 Tween® 20 varlığında enzim aktivitesinde %60–70 civarında azalma tespit edilmiştir. %1 Triton™ X-100, enzim aktivitesini yaklaşık %50 oranında artırırken, %5 Triton™ X-100 aktiviteyi %80'in altına düşürmüştür. %1 SDS varlığında enzim aktivitesi %70–80 oranında artmış, %5 SDS varlığında ise aktiviteler %20 oranında azalmıştır. 1 mM PMSF varlığında enzim aktivitesi %10 azalırken, 5 mM PMSF'de bu azalma %20–25 seviyelerine ulaşmıştır. DTT varlığında da benzer bir azalma gözlenmiş, diğer inhibitörlerin ise anlamlı bir etkisi saptanmamıştır.

Organik çözücülerin etkileri değerlendirildiğinde; %5 ve %10 etanol, asetonitril (ACN) ve dimetilsülfoksit (DMSO) varlığında enzim aktiviteleri anlamlı şekilde etkilenmemiştir. %5 metanol varlığında ise enzim aktiviteleri %200–250 oranında artarken, %10 metanol konsantrasyonunda GstLipC ve mutantlarının farklı tepkiler verdiği belirlenmiştir. Özellikle GstLipC ve GstLipC_R196L'nin aktivitesi %150–160'a yükselirken, diğer mutantların aktivitesi %200'ün üzerine çıkmıştır. GstLipC_R196F, %5 izopropanol varlığında %200 aktivite göstermiş; bu oran %10 izopropanolde %150'ye düşmüştür. GstLipC ve GstLipC_R196L enzimleri %5 izopropanolde yaklaşık %110 aktivite gösterirken, %10 izopropanolde bu değer %140–150 seviyelerine yükselmiştir. Genel olarak, organik çözücülerin doğal ve mutant enzimler üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Enzimlerin kinetik parametreleri; 0,1 mM Triton™ X-100 ve 1 mM imidazol varlığında ayrıntılı şekilde belirlenmiştir.

0,1 mM Triton™ X-100 varlığında hesaplanan K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri şu şekildedir:

- GstLipC: 0,55 mM, 9,179278 U/mg, 9,179278 s^{-1} , 8,286199 $s^{-1}mM^{-1}$
- GstLipC_I184H: 0,38 mM, 6,897359 U/mg, 3,425913 s^{-1} , 8,787054 $s^{-1}mM^{-1}$
- GstLipC_I184V: 0,34 mM, 5,52317 U/mg, 2,743354 s^{-1} , 7,941082 $s^{-1}mM^{-1}$
- GstLipC_R196L: 0,36 mM, 6,193095 U/mg, 3,076105 s^{-1} , 8,492617 $s^{-1}mM^{-1}$
- GstLipC_R196F: 0,22 mM, 5,064989 U/mg, 2,515776 s^{-1} , 11,27307 $s^{-1}mM^{-1}$

1 mM imidazol varlığında ise bu değerler şu şekilde hesaplanmıştır:

- GstLipC: 1,07 mM, 8,416489 U/mg, 4,180463 s^{-1} , 3,880036 $s^{-1}mM^{-1}$
- GstLipC_I184H: 1,12 mM, 6,561385 U/mg, 3,259035 s^{-1} , 2,906208 $s^{-1}mM^{-1}$

- GstLipC_I184V: 0,96 mM, 5,351411 U/mg, 2,658041 s⁻¹, 2,753475 s⁻¹mM⁻¹
- GstLipC_R196L: 0,89 mM, 5,395757 U/mg, 2,680068 s⁻¹, 3,003065 s⁻¹mM⁻¹
- GstLipC_R196F: 0,84 mM, 6,025194 U/mg, 2,992709 s⁻¹, 3,557585 s⁻¹mM⁻¹

Karakterizasyon çalışmalarının ardından, mutant genler pNW33N plazmidine başarıyla klonlanmış ve bu rekombinant plazmitler *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 suşuna elektroporasyon ve doğal transformasyon yöntemleri kullanılarak aktarılmıştır. Uygun koşullar sağlanarak spor oluşumu gerçekleştirilmiş ve bu sporlarla germinasyon çalışmaları yürütülmüştür. Germinasyon süreci spektrofotometrik yöntemlerle izlenmiş ve özellikle GstLipC_I184H mutanıt taşıyan sporların diğerlerinden daha hızlı germinasyona girdiği belirlenmiştir. Biyolojik indikatörlerle yapılan analizler de bu bulguyu destekler nitelikte olmuştur.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen bulgular, GstLipC enziminin aktivitesinin ortam koşullardan önemli ölçüde etkilendiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, daha kapsamlı bir değerlendirme yapabilmek amacıyla, farklı ortam koşulları altında enzim kinetiği üzerine detaylı çalışmaların gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

GstLipC ve türevi mutant enzimler üzerinde yürütülen moleküler docking analizleri sayesinde, enzim yapısı ile substrat etkileşimleri hakkında temel bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca, farklı yazılımlar aracılığıyla enzimin yapısal esnekliği ve yapılan mutasyonların bu esneklik üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ancak, deneysel analizlerden elde edilen veriler, enzim yapısının ve fonksiyonel özelliklerinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha ileri düzeyde yapısal analizlerin gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu doğrultuda, moleküler dinamik simülasyonlarının gerçekleştirilmesi ve sonuçların bu perspektifte değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir.

Mutant enzimlerin *Geobacillus stearothermophilus* genomuna homolog rekombinasyon yöntemiyle entegrasyonu amaçlanmış, ancak bu girişim başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu durumun iki temel nedene dayandığı düşünülmektedir. Birincisi, yapılan nokta mutasyonlarının sadece bir veya iki baz değişikliği içermesi nedeniyle homolog rekombinasyon için gerekli olan homolog bölge uzunluğunun yetersiz kalmış olmasıdır. İkincisi ise, mutasyon taramasında kullanılan problemlerin spesifikliğinin düşük olmasıdır. Bu bağlamda, daha etkin bir genetik modifikasyon stratejisi olarak CRISPR tabanlı yöntemlerin uygulanması önerilmektedir.

Ayrıca, yapılan mutasyonların K_m değerlerinde anlamlı farklılıklar gözlemlenmesine karşın, biyolojik indikatör sistemleri benzer zaman dilimlerinde sonuç vermiştir. Ancak, GstLipC_I184H mutant enziminin diğerlerine kıyasla daha kısa sürede yanıt vermesi, bu mutantın ortam koşullarından daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Bu nedenle, biyolojik indikatörlerde kullanılan ortam koşullarının optimize edilmesiyle, özellikle GstLipC_I184H içeren sistemlerin daha hızlı ve hassas sonuç vermesi sağlanabilir. Bu doğrultuda, biyolojik indikatör içeriğinin yeniden yapılandırılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abecasis, A. B., Serrano, M., Alves, R., Quintais, L., Pereira-Leal, J. B., & Henriques, A. O. (2013). A genomic signature and the identification of new sporulation genes. *Journal of Bacteriology*, 195(9), 2101–2115. <https://doi.org/10.1128/JB.02110-12>
- Ablett, S., Darke, A. H., Lillford, P. J., & Martin, D. R. (1999). Glass formation and dormancy in bacterial spores. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(1), 59–69. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2621.1999.00240.X>
- Adediran, S. A., Sarkar, K. S., & Pratt, R. F. (2018). Kinetic Evidence for a Second Ligand Binding Site on *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 2x. *Biochemistry*, 57, 1758–1766. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01209>
- Aertsen, A., & Michiels, C. W. (2004). Stress and how bacteria cope with death and survival. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 30, pp. 263–273). <https://doi.org/10.1080/10408410490884757>
- Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H., & Shaw, J. F. (2004). GDSE family of serine esterases/lipases. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 43, pp. 534–552). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.002>
- Albayati, S. H., Masomian, M., Ishak, S. N. H., Ali, M. S. B. M., Thean, A. L., Shariff, F. B. M., Noor, N. D. B. M., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2020). Main structural targets for engineering lipase substrate specificity. *Catalysts*, 10. <https://doi.org/10.3390/catal10070747>
- Al-Hinai, M. A., Jones, S. W., & Papoutsakis, E. T. (2015). The *Clostridium* Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 19–37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-14>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amid, M., Manap, M. Y., Hussin, M., & Mustafa, S. (2015). A novel aqueous two phase system composed of surfactant and xylitol for the purification of lipase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds and recycling of phase components. *Molecules*, 20, 11184–11201. <https://doi.org/10.3390/molecules200611184>
- Anderson, A. C., Stangherlin, S., Pimentel, K. N., Weadge, J. T., & Clarke, A. J. (2022). The SGNH hydrolase family: a template for carbohydrate diversity. In *Glycobiology* (Vol. 32, pp. 826–848). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwac045>
- Anh-Hue T. Tu. (2016). Transformation of *Escherichia coli* Made Competent by Calcium Chloride Protocol. <http://www.dnai.org/text/mediashowcase/index2.html?id=1009>

- Aronson, A. I., & Fitz-James, P. (1976). Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriological Reviews*, 40, 360–402. <https://doi.org/10.1128/br.40.2.360-402.1976>
- Article, O., & Paritala, V. (2022). Comparative modeling for *Saccharomyces cerevisiae* rad56 using Swiss-Model, i-tasser, and phyre2. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2022v14i4.43972>
- Atluri, S., Ragkousi, K., Cortezzo, D. E., & Setlow, P. (2006). Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor. *Journal of Bacteriology*, 188, 28–36. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.28-36.2006>
- Bailey-Smith, K., Todd, S. J., Southworth, T. W., Proctor, J., & Moir, A. (2005). The ExsA Protein of *Bacillus cereus* Is Required for Assembly of Coat and Exosporium onto the Spore Surface. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3800. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3800-3806.2005>
- Beskrovnaya, P., Sexton, D. L., Golmohammadzadeh, M., Hashimi, A., & Tocheva, E. I. (2021). Structural, Metabolic and Evolutionary Comparison of Bacterial Endospore and Exospore Formation. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630573>
- Blanchard, K., Robic, S., & Matsumura, I. (2014). Transformable facultative thermophile *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621 as a host strain for metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5746-z>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., & Carlin, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 614–626. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUY021>
- Carrigan, P. E., Ballar, P., & Tuzmen, S. (2011). Site-directed mutagenesis. *Methods in Molecular Biology*, 700, 107–124. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-954-3_8
- Carvalho, C. M. L., Chew, E. H., Hashemy, S. I., Lu, J., & Holmgren, A. (2008). Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(18), 11913–11923. <https://doi.org/10.1074/JBC.M710133200>
- Chakraborty, K., & Raj, R. P. (2008). An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 109, 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.026>
- Chary, V. K., Meloni, M., Hilbert, D. W., & Piggot, P. J. (2005). Control of the expression and compartmentalization of (sigma)G activity during sporulation of *Bacillus subtilis*

- by regulators of (sigma)F and (sigma)E. *Journal of Bacteriology*, 187(19), 6832–6840. <https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6832-6840.2005>
- Checinska, A., Paszczynski, A., & Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: Variations in responses and mechanisms for survival. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6 (Volume 6, 2015), 351–369. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Food-030713-092332/Cite/Refworks>
- Chen, R., Gao, X., Nie, T., Wu, J., Wang, L., Osman, A., Feng, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2023). Crystal structure of the GDSE family esterase EstL5 in complex with PMSF reveals a branch channel of the active site pocket. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 55, 1833–1839. <https://doi.org/10.3724/abbs.2023108>
- Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., & Sayadi, S. (2011). A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids in Health and Disease*, 10, 221. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-221>
- Cho, W. Il, & Chung, M. S. (2020). *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Science and Biotechnology*, 29(11), 1447–1461. <https://doi.org/10.1007/S10068-020-00809-4/TABLES/4>
- Christie, G., Hao, B., Collins, K. M., Evans, N. J., Torpey, J. H., Harris, J. M., Haynes, B. A., Camp, A. H., & Isaacson, R. L. (2023). microorganisms Structural Analysis of *Bacillus subtilis* Sigma Factors. *Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041077>
- Collins, K. M., Evans, N. J., Torpey, J. H., Harris, J. M., Haynes, B. A., Camp, A. H., & Isaacson, R. L. (2023). Structural Analysis of *Bacillus subtilis* Sigma Factors. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 1077, 11(4), 1077. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11041077>
- Crawshaw, A. D., Serrano, M., Stanley, W. A., Henriques, A. O., & Salgado, P. S. (2014). A mother cell-to-forespore channel: current understanding and future challenges. *FEMS Microbiology Letters*, 358(2), 129–136. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12554>
- Devi, S. N., Vishnoi, M., Kiehler, B., Haggett, L., & Fujita, M. (2015). In vivo functional characterization of the transmembrane histidine kinase kinc in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(5), 1092–1104. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000054/CITE/REFWORKS>
- Doruk, T., & Gedik, S. T. (2013). An efficient gene deletion system for *Bacillus thuringiensis*. *Biologia (Poland)*, 68(3), 358–364. <https://doi.org/10.2478/S11756-013-0184-4/METRCS>
- Driks, A. (2004). The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology*, 94(11), 1249–1251. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1249>
- Driks, A., & Eichenberger, P. (2016). The Spore Coat. *Microbiology Spectrum*, 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0023-2016>

- Dym, O., Eisenberg, D., & Yeates, T. O. (2006). VERIFY3D. *Urn:Isbn:978-0-7923-6857-1, F*, 520–530. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000709>
- Edwards, A. N., & McBride, S. M. (2014). Initiation of sporulation in *Clostridium difficile*: a twist on the classic model. *FEMS Microbiology Letters*, 358(2), 110–118. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12499>
- Escobar, C. A., & Cross, T. A. (2018). False positives in using the zymogram assay for identification of peptidoglycan hydrolases. *Analytical Biochemistry*, 543, 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.016>
- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83–89. <https://doi.org/10.1007/S40484-019-0172-Y/METRICS>
- Feklistov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A., & Gross, C. A. (2014). Bacterial sigma factors: A historical, structural, and genomic perspective. *Annual Review of Microbiology*, 68(Volume 68, 2014), 357–376. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-092412-155737/CITE/REFWORKS>
- Fimlaid, K. A., Bond, J. P., Schutz, K. C., Putnam, E. E., Leung, J. M., Lawley, T. D., & Shen, A. (2013). Global Analysis of the Sporulation Pathway of *Clostridium difficile*. *PLOS Genetics*, 9(8), e1003660. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003660>
- Fimlaid, K. A., Jensen, O., Donnelly, M. L., Siegrist, M. S., & Shen, A. (2015). Regulation of *Clostridium difficile* Spore Formation by the SpoIIQ and SpoIIIA Proteins. *PLoS genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005562>
- Fimlaid, K. A., & Shen, A. (2015). Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the Firmicutes. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 88–95. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2015.01.006>
- Fingerhut, M. A., Henrich, L., Lauber, C., Broel, N., Ghezellou, P., Karrer, D., Spengler, B., Langfelder, K., Stressler, T., Zorn, H., & Gand, M. (2024). Characterization of a GDS(L)-like hydrolase from *Pleurotus sapidus* with an unusual SGNH motif. *AMB Express*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13568-024-01752-X/TABLES/2>
- Galperin, M. Y., Mekhedov, S. L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y. I., & Rigden, D. J. (2012). Genomic determinants of sporulation in *Bacillus* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology*, 14(11), 2870–2890. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2012.02841.X>
- Galperin, M. Y., Yutin, N., Wolf, Y. I., Alvarez, R. V., & Koonin, E. V. (2022). Conservation and Evolution of the Sporulation Gene Set in Diverse Members of the Firmicutes. *Journal of Bacteriology*, 204. <https://doi.org/10.1128/jb.00079-22>
- Georget, E., Kapoor, S., Winter, R., Reineke, K., Song, Y., Callanan, M., Ananta, E., Heinz, V., & Mathys, A. (2014). In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure. *Food Microbiology*, 41, 8–18. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.01.007>

- Georget, E., Kushman, A., Callanan, M., Ananta, E., Heinz, V., & Mathys, A. (2015). *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spore chemical germination mechanisms in model systems. *Food Control*, 50, 141–149. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2014.08.044>
- Glogauer, A., Martini, V. P., Faoro, H., Couto, G. H., Müller-Santos, M., Monteiro, R. A., Mitchell, D. A., De Souza, E. M., Pedrosa, F. O., & Krieger, N. (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-54>
- Gülmez, C., & Atakisi, O. (2022). Investigation of compatibility of lipase with commercial detergents, surfactants and oxidizing agent as a detergent additive. *International Journal of Chemistry and Technology*, 6(1), 33–38. <https://doi.org/10.32571/IJCT.1085417>
- Gururaj, P., Ramalingam, S., Nandhini Devi, G., & Gautam, P. (2016). Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 647–657. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.04.002>
- Haldenwang, W. G. (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 59(1), 1. <https://doi.org/10.1128/MR.59.1.1-30.1995>
- Henriques, A. O., & Moran, C. P. (2007). Structure, assembly, and function of the spore surface layers. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 61, pp. 555–588). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>
- Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 131–148. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00310.X>
- Ho, J. G. S., Middelberg, A. P. J., Ramage, P., & Kocher, H. P. (2003). The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. *Protein Science*, 12, 708–716. <https://doi.org/10.1110/ps.0233703>
- Husain, N., & Mahmood, R. (2019). Copper(II) generates ROS and RNS, impairs antioxidant system and damages membrane and DNA in human blood cells. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(20), 20654–20668. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-05345-1>
- Ilene Mizrahi. (2007). GenBank: The Nucleotide Sequence Database. In *The NCBI handbook* [Internet]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21105/pdf/Bookshelf_NBK21105.pdf
- Ingenbosch, K. N., Vieyto-Nuñez, J. C., Ruiz-Blanco, Y. B., Mayer, C., Hoffmann-Jacobsen, K., & Sanchez-Garcia, E. (2022). Effect of Organic Solvents on the Structure and Activity of a Minimal Lipase. *Journal of Organic Chemistry*, 87, 1669–1678. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c01136>

- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 29–63. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)90025-6)
- Janssen, A. P. A., Van Hengst, J. M. A., Béquignon, O. J. M., Deng, H., Van Westen, G. J. P., & Van Der Stelt, M. (2019). Structure Kinetics Relationships and Molecular Dynamics Show Crucial Role for Heterocycle Leaving Group in Irreversible Diacylglycerol Lipase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 7910–7922. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00686>
- Jo, E., Kim, J., Lee, A., Moon, K., & Cha, J. (2021a). Identification and Characterization of a Novel Thermostable GDsl-Type Lipase from *Geobacillus thermocatenulatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 483. <https://doi.org/10.4014/JMB.2012.12036>
- Jo, E., Kim, J., Lee, A., Moon, K., & Cha, J. (2021b). Identification and characterization of a novel thermostable gdsl-type lipase from *Geobacillus thermocatenulatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 483–491. <https://doi.org/10.4014/JMB.2012.12036>
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., & Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*, 12, 1652–1662. <https://doi.org/10.1110/ps.0303703>
- Jyoti B. Salgar, Sanjay K. Bais, & Reshma Ankush Mule. (2023). Review on Biological Indicator. *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology*, 3(3), 22–43. <https://doi.org/10.48175/IJAR SCT-14302>
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., & Derekova, A. (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00045-6)
- Kang, M. D., Choi, G. E., Jang, J. H., Hong, S. C., Park, H. S., Kim, D. H., Kim, W. C., Murphy, N. P., & Jung, Y. H. (2024a). A lipase from *Lactocaseibacillus rhamnosus* IDCC 3201 with thermostability and pH resistance for use as a detergent additive. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 365. <https://doi.org/10.1007/S00253-024-13185-4>
- Kang, M. D., Choi, G. E., Jang, J. H., Hong, S. C., Park, H. S., Kim, D. H., Kim, W. C., Murphy, N. P., & Jung, Y. H. (2024b). A lipase from *Lactocaseibacillus rhamnosus* IDCC 3201 with thermostability and pH resistance for use as a detergent additive. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13185-4>
- Karadağ Adil. (2005). Otoklav ile Sterilizasyon. *Otoklav Ile Sterilizasyon. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*, 20-24. <https://www.das.org.tr/kitaplar/kitap2005/9-05.pdf>

- Kaushik, S., He, H., & Dalbey, R. E. (2022). Bacterial Signal Peptides- Navigating the Journey of Proteins. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.933153>
- Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2005). Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 527. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.527-543.2005>
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Sugie, J., Pogliano, K., & Villa, E. (2021). Asymmetric localization of the cell division machinery during *Bacillus subtilis* sporulation. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.62204>
- Kim, M. H., Kim, H. K., Lee, J. K., Park, S. Y., & Oh, T. K. (2000). Thermostable Lipase of *Bacillus stearothermophilus*: High-level Production, Purification, and Calcium-dependent Thermostability. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 280–286. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.280>
- Koopman, N., Remijas, L., Seppen, J., Setlow, P., & Brul, S. (2022). Mechanisms and Applications of Bacterial Sporulation and Germination in the Intestine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3405. <https://doi.org/10.3390/IJMS23063405>
- Koyama, K., Mikawa, Y., Nakagawa, S., Kurashiki, R., Ohshiro, T., & Suzuki, H. (2022). New Platform for Screening Genetic Libraries at Elevated Temperatures: Biological and Genomic Information and Genetic Tools of *Geobacillus thermodenitrificans* K1041. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(18). https://doi.org/10.1128/AEM.01051-22/SUPPL_FILE/AEM.01051-22-S0001.PDF
- Kozuka, S., & Tochikubo, K. (1991). Permeability of dormant spores of *Bacillus subtilis* to malachite green and crystal violet. *Journal of General Microbiology*, 137(3), 607–613. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-3-607/CITE/REFWORKS>
- Kroos, L., Zhang, B., Ichikawa, H., & Yu, Y. T. N. (1999). Control of σ factor activity during *Bacillus subtilis* sporulation. *Molecular Microbiology*, 31(5), 1285–1294. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1999.01214.X>
- Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S., & Kumar, R. (2020). A Broad Temperature Active Lipase Purified From a Psychrotrophic Bacterium of Sikkim Himalaya With Potential Application in Detergent Formulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 642. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00642>
- Kwofie, S. K., Dankwa, B., Odame, E. A., Agamah, F. E., Doe, L. P. A., Teye, J., Agyapong, O., Miller, W. A., Mosi, L., & Wilson, M. D. (2018). In silico screening of isocitrate lyase for novel anti-buruli ulcer natural products originating from Africa. *Molecules*, 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23071550>
- Kwon, S. J., Jin, H. C., Lee, S., Nam, M. H., Chung, J. H., Kwon, S. Il, Ryu, C. M., & Park, O. K. (2009). GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 58, 235–245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03772.x>

- Le, L. T. H. L., Yoo, W., Jeon, S., Lee, C., Kim, K. K., Lee, J. H., & Kim, T. D. (2020). Biodiesel and flavor compound production using a novel promiscuous cold-adapted SGNH-type lipase (HaSGNH1) from the psychrophilic bacterium *Halocynthiibacter arcticus*. *Biotechnology for Biofuels*, 13. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01696-x>
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658–666. https://doi.org/10.1021/JA01318A036/ASSET/JA01318A036.FP.PNG_V03
- Liu, S. L., Wu, W. J., & Yung, P. T. (2015). Effect of sonic stimulation on *Bacillus* endospore germination. *FEMS Microbiology Letters*, 363. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv217>
- López, D., Fischbach, M. A., Chu, F., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1), 280–285. https://doi.org/10.1073/PNAS.0810940106/SUPPL_FILE/0810940106SI.PDF
- López-Leal, G., Cevallos, M. A., & Castillo-Ramírez, S. (2016). Evolution of a sigma factor: An All-In-One of Gene Duplication, Horizontal Gene Transfer, Purifying Selection, and Promoter Differentiation. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 178705. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00581/BIBTEX>
- Lulko, A. T., Veening, J. W., Buist, G., Smits, W. K., Blom, E. J., Beekman, A. C., Bron, S., & Kuipers, O. P. (2007). Production and secretion stress caused by overexpression of heterologous α -amylase leads to inhibition of sporulation and a prolonged motile phase in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5354–5362. <https://doi.org/10.1128/AEM.00472-07>
- Lv, X. Y., Guo, L. Z., Song, L., Fu, Q., Zhao, K., Li, A. X., Luo, X. L., & Lu, W. D. (2011). Purification and characterization of a novel extracellular carboxylesterase from the moderately halophilic bacterium *Thalassobacillus* sp. strain DF-E4. *Annals of Microbiology*, 61(2), 281–290. <https://doi.org/10.1007/S13213-010-0135-Z>
- Macwilliams, M. P., & Liao, M.-K. (2016). *Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol*. www.asmscience.org
- Masayama, A., Kato, S., Terashima, T., Mølgaard, A., Hemmi, H., Yoshimura, T., & Moriyama, R. (2010). *Bacillus subtilis* spore coat protein LipC is a phospholipase B. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74, 24–30. <https://doi.org/10.1271/bbb.90391>
- Masayama, A., Kuwana, R., Takamatsu, H., Hemmi, H., Yoshimura, T., Watabe, K., & Moriyama, R. (2007). A novel lipolytic enzyme, YcsK (LipC), located in the spore coat of *Bacillus subtilis*, is involved in spore germination. *Journal of Bacteriology*, 189, 2369–2375. <https://doi.org/10.1128/JB.01527-06>
- Mathys, A., Heinz, V., Schwartz, F. H., & Knorr, D. (2007). Impact of agglomeration on the quantitative assessment of *Bacillus stearothermophilus* heat inactivation. *Journal of*

- Food Engineering*, 81(2), 380–387.
<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2006.11.012>
- Mccormick, N. G. (1965). Kinetics Of Spore Germination. *Journal of Bacteriology*, 89, 1180–1185. <https://doi.org/10.1128/jb.89.5.1180-1185.1965>
- Mckenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2012). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 2012 11:1, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P., & Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W597–W600. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT376>
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2012). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, 7, 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Miguel, S., Legrand, G., Duriot, L., Delporte, M., Menin, B., Michel, C., Olry, A., Chataigné, G., Salwinski, A., Bygdell, J., Vercaigne, D., Wingsle, G., Hilbert, J. L., Bourgaud, F., Hehn, A., & Gagneul, D. (2020). A GDSL lipase-like from *Ipomoea batatas* catalyzes efficient production of 3,5-diCQA when expressed in *Pichia pastoris*. *Communications Biology* 2020 3:1, 3(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01387-1>
- Moir, A. (2006). How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology*, 101, 526–530. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02885.x>
- Moir, A., Corfe, B. M., & Behravan, J. (2002). Spore germination. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(3), 403–409. <https://doi.org/10.1007/S00018-002-8432-8/METRICS>
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30, 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000/ASSET/023AD988-078E-4249-82B8-6A9B6AB588D3/ASSETS/GRAPHIC/MR0300022012.JPEG>
- Nychas, G.-J. E., & Drosinos, E. H. (2014). *Geobacillus stearothermophilus* (Formerly *Bacillus stearothermophilus*) . In C. A. Batt & M.-L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., Vol. 1). Elsevier Ltd. https://books.google.com/books/about/Encyclopedia_of_Food_Microbiology.html?id=1b1CAgAAQBAJ

- Paget, M. S., Wigneshweraraj, S., & Hinton, D. M. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* 2015, Vol. 5, Pages 1245-1265, 5(3), 1245–1265. <https://doi.org/10.3390/BIOM5031245>
- Paredes-Sabja, D., Torres, J. A., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2008a). *Clostridium perfringens* spore germination: Characterization of germinants and their receptors. *Journal of Bacteriology*, 190, 1190–1201. <https://doi.org/10.1128/JB.01748-07>
- Paredes-Sabja, D., Torres, J. A., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2008b). *Clostridium perfringens* spore germination: Characterization of germinants and their receptors. *Journal of Bacteriology*, 190, 1190–1201. <https://doi.org/10.1128/JB.01748-07>
- Pirmanesh, S., Kermanshahi, R. K., Gharavi, S., & Qamsari, E. M. (2021). Cloning, Expression, and Purification of a GDSL-like Lipase/Acylhydrolase from a Native Lipase-Producing Bacterium, *Lactobacillus fermentum*. *Iranian Biomedical Journal*, 26(2), 153. <https://doi.org/10.52547/IBJ.26.2.153>
- Politi, N., Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., Cusella De Angelis, M. G., & Magni, P. (2014). Half-life measurements of chemical inducers for recombinant gene expression. *Journal of Biological Engineering*, 8, 5. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-5>
- Popham, D. L. (2002). Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: The inner wall of the lockbox. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(3), 426–433. <https://doi.org/10.1007/S00018-002-8435-5>/METRICS
- Pouyan, S., Lagzian, M., & Sangtarash, M. H. (2022). Enhancing thermostabilization of a newly discovered α -amylase from *Bacillus cereus* GL96 by combining computer-aided directed evolution and site-directed mutagenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 197, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.057>
- Qin, L., Lin, M., Zhan, Y., Jiang, S., Zhou, Z., & Wang, J. (2024a). Identification and Characterization of a Novel Thermostable GDSL Lipase LipGt6 from *Geobacillus thermoleovorans* H9. *Applied Sciences (Switzerland)*, 14. <https://doi.org/10.3390/app14083279>
- Qin, L., Lin, M., Zhan, Y., Jiang, S., Zhou, Z., & Wang, J. (2024b). Identification and Characterization of a Novel Thermostable GDSL Lipase LipGt6 from *Geobacillus thermoleovorans* H9. *Applied Sciences (Switzerland)*, 14. <https://doi.org/10.3390/app14083279>
- Ramani, K., Chockalingam, E., & Sekaran, G. (2010). Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 531–535. <https://doi.org/10.1007/S10295-010-0700-2>
- Reynolds, J., Moyes, R., & Breakwell, D. P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Endospore Stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1), A.3J.1-A.3J.5. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.MCA03JS15>

- Richard R. Matner William E. Foltz Lewis P. Woodson. (1993). *Rapid read-out biological indicator* (Patent 5,252,484).
- Riley, E. P., Schwarz, C., Derman, A. I., & Lopez-Garrido, J. (2020). Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microbial Cell*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.15698/MIC2021.01.739>
- Rodriguez Ayala, F., Bartolini, M., & Grau, R. (2020). The Stress-Responsive Alternative Sigma Factor SigB of *Bacillus subtilis* and Its Relatives: An Old Friend With New Functions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 555527. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01761/BIBTEX>
- Roy, S., & Kumar, V. (2014). A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research*. www.ijsr.net
- Sabate, R., De Groot, N. S., & Ventura, S. (2010). Protein folding and aggregation in bacteria. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 67, pp. 2695–2715). <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0344-4>
- Santana, C. C., Barbosa, L. A., Júnior, I. D. B., Nascimento, T. G. do, Dornelas, C. B., & Grillo, L. A. M. (2017). Lipase Activity in the Larval Midgut of *Rhynchophorus palmarum*: Biochemical Characterization and the Effects of Reducing Agents. *Insects*, 8. <https://doi.org/10.3390/insects8030100>
- Saujet, L., Pereira, F. C., Henriques, A. O., & Martin-Verstraete, I. (2014). The regulatory network controlling spore formation in *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, 358(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12540>
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). Swiss-Model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG520>
- Setlow, B., Cowan, A. E., & Setlow, P. (2003). Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 637–648. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2003.02015.X>
- Setlow, B., Melly, E., & Setlow, P. (2001). Properties of Spores of *Bacillus subtilis* Blocked at an Intermediate Stage in Spore Germination. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 183(16), 4894–4899. <https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4894-4899.2001>
- Setlow, B., Peng, L., Loshon, C. A., Li, Y. Q., Christie, G., & Setlow, P. (2009). Characterization of the germination of *Bacillus megaterium* spores lacking enzymes that degrade the spore cortex. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 318–328. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2009.04210.X>
- Setlow, B., Wahome, P. G., & Setlow, P. (2008). Release of small molecules during germination of spores of *Bacillus species*. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4759–4763. <https://doi.org/10.1128/JB.00399-08/ASSET/A6FC782E-B281-4D80-8D27-FBC9DE3E3468/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0130879270003.JPEG>

- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 514–525. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2005.02736.X>
- Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, 15(4), 172–180. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2007.02.004/ASSET/397E649F-5606-474A-8AB1-B844B2042806/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Setlow, P. (2014a). Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 196, pp. 1297–1305). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-13>
- Setlow, P. (2014b). Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.TBS-0003-2012/ASSET/32FEA2D9-8DCD-471F-84F3-5D855955D6E5/ASSETS/GRAPHIC/TBS-0003-2012-FIG3.GIF>
- Shank, E. A., & Kolter, R. (2011). Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 14(6), 741–747. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2011.09.016>
- Sharma, S., & Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/625258>
- Sinha, S., Tam, B., & Wang, S. M. (2022). Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. In *Membranes* (Vol. 12, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/membranes12090844>
- Sljoka, A. (2021). Structural and Functional Analysis of Proteins Using Rigidity Theory. In *Sublinear Computation Paradigm: Algorithmic Revolution in the Big Data Era* (pp. 337–367). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4095-7_14
- Smajović, L. N., Oflaz, F. E., & Arslan, A. (2021). A Study of the CaCl₂ Induced *E. coli* DH5-Alpha Transformation by Heat Shock Accompanied by Vibration. *IFMBE Proceedings*, 84, 557–564. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73909-6_65
- Sorg, J. A., & Sonenshein, A. L. (2008). Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2505–2512. <https://doi.org/10.1128/JB.01765-07/ASSET/287C370B-73B5-4934-8A00-B19D9B7C2900/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0070876920005.JPEG>
- SOYLU Tülay. (2005). Sterilizasyon Kontrolü. In *Proceedings of the 4th National Sterilization and Disinfection Congress* (Pp. 87–98). <https://das.org.tr/kitaplar/kitap2005/10-05.pdf>
- Srivastava, S., & Gupta, P. S. (2002). SDS and Native page protein profile for identification and characterization of elite sugarcane genotypes. *Sugar Tech* 1999 4:3, 4(3), 143–147. <https://doi.org/10.1007/BF02942696>

- Stratton, A., Ericksen, M., Harris, T. V., Symmonds, N., & Silverstein, T. P. (2017). Mercury (II) binds to both of chymotrypsin's histidines, causing inhibition followed by irreversible denaturation/aggregation. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 26(2), 292. <https://doi.org/10.1002/PRO.3082>
- Sumbalova, L., Stourac, J., Martinek, T., Bednar, D., & Damborsky, J. (2018). HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W356–W362. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY417>
- Sun, G., Yang, M., Jiang, L., & Huang, M. (2021). Regulation of pro- σ K activation: a key checkpoint in *Bacillus subtilis* sporulation. *Environmental Microbiology*, 23(5), 2366–2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15415>
- Sun, J., Wang, W., Ying, Y., & Hao, J. (2020). A Novel Glucose-Tolerant GH1 β -Glucosidase and Improvement of Its Glucose Tolerance Using Site-Directed Mutation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(3), 999–1015. <https://doi.org/10.1007/S12010-020-03373-Z>
- Taghizadeh, T., Ameri, A., Talebian-Kiakalaieh, A., Mojtavavi, S., Ameri, A., Forootanfar, H., Tarighi, S., & Faramarzi, M. A. (2021). Lipase zeolitic imidazolate framework ZIF-90: A highly stable and recyclable biocatalyst for the synthesis of fruity banana flavour. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 1301–1311. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.011>
- Tan, X., Yan, S., Tan, R., Zhang, Z., Wang, Z., & Chen, J. (2014). Characterization and expression of a GDSL-like lipase gene from *Brassica napus* in nicotiana benthamiana. *Protein Journal*, 33(1), 18–23. <https://doi.org/10.1007/S10930-013-9532-Z/METRICS>
- Tavares, M. B., Souza, R. D., Luiz, W. B., Cavalcante, R. C. M., Casaroli, C., Martins, E. G., Ferreira, R. C. C., & Ferreira, L. C. S. (2013). *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: Optimization of growth conditions and purification method. *Current Microbiology*, 66(3), 279–285. <https://doi.org/10.1007/S00284-012-0269-2/METRICS>
- Tiwari, M. K., Häggglund, P. M., Møller, I. M., Davies, M. J., & Bjerrum, M. J. (2019). Copper ion / H₂O₂ oxidation of Cu/Zn-Superoxide dismutase: Implications for enzymatic activity and antioxidant action. *Redox Biology*, 26, 101262. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2019.101262>
- Touray, A. O., Ogan, A., & Turan, K. (2020). Conserved Protein YpmR of Moderately Halophilic *Bacillus licheniformis* has Hydrolytic Activity on p-Nitrophenyl Laurate. *European Journal of Biology*, 79(1), 43–50. <https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2020.0018>
- Tracy, B. P., Gaida, S. M., & Papoutsakis, E. T. (2008). Development and application of flow-cytometric techniques for analyzing and sorting endospore-forming clostridia. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7497–7506.

https://doi.org/10.1128/AEM.01626-08/SUPPL_FILE/AEM_SUPPLEMENTAL_FIG_CAPTIONS.DOC

- Tracy, B. P., Jones, S. W., & Papoutsakis, E. T. (2011). Inactivation of σ^E and σ^{Gin} in *Clostridium acetobutylicum* illuminates their roles in clostridial-cell-form biogenesis, granulose synthesis, solventogenesis, and spore morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, 193(6), 1414–1426. https://doi.org/10.1128/JB.01380-10/SUPPL_FILE/JB01380_10_REVISION_SUPPLEMENTAL_MATERIALS.PDF
- Turenne, C. Y., Snyder, J. W., & Alexander, D. C. (2015). *Bacillus* and Other Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology* (pp. 441–461). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch26>
- Vepachedu, V. R., & Setlow, P. (2007). Role of SpoVA proteins in release of dipicolinic acid during germination of *Bacillus subtilis* spores triggered by bodecylamine or lysozyme. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1565–1572. <https://doi.org/10.1128/JB.01613-06/ASSET/321E8A8A-C80F-4510-97B6-F23F43F4E381/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0050765350008.JPEG>
- Vranken, W. (2007). A global analysis of NMR distance constraints from the PDB. *Journal of Biomolecular NMR*, 39(4), 303–314. <https://doi.org/10.1007/S10858-007-9199-X/FIGURES/5>
- Wang, S. T., Setlow, B., Conlon, E. M., Lyon, J. L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., & Eichenberger, P. (2006). The Forespore Line of Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 358(1), 16–37. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.01.059>
- Wang, Y., Liu, J., Peters, M. M., Ishii, R., Wang, D., Chowdhury, S., Parker, K. K., & Shakhnovich, E. I. (2024). *Entropy Changes in Water Networks Promote Protein Denaturation*. <https://doi.org/10.1101/2024.06.12.598657>
- Wang, Y., Van Oosterwijk, N., Ali, A. M., Adawy, A., Anindya, A. L., Dömling, A. S. S., & Groves, M. R. (2017). A Systematic Protein Refolding Screen Method using the DGR Approach Reveals that Time and Secondary TSA are Essential Variables. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09687-z>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM290>
- Wiencek, K. M., Klapes, N. A., & Foegeding, P. M. (1990). Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2600–2605. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.9.2600-2605.1990>
- Worth, C. L., Preissner, R., & Blundell, T. L. (2011). SDM—a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2), W215–W222. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR363>

- Wu, Q., Peng, Z., Zhang, Y., & Yang, J. (2018). COACH-D: improved protein–ligand binding sites prediction with refined ligand-binding poses through molecular docking. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W438–W442. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY439>
- Zapun, A., Vernet, T., & Pinho, M. G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 345–360. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2007.00098.X>
- Zarschler, K., Janesch, B., Zayni, S., Schaffer, C., & Messner, P. (2009). Construction of a gene knockout system for application in *Paenibacillus alvei* CCM 2051T, exemplified by the S-layer glycan biosynthesis initiation enzyme WsfP. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3077–3085. <https://doi.org/10.1128/AEM.00087-09>
- Zhang, J., Cheng, W., Lu, B., Deng, X., Han, N., & Xing, F. (2015). Rapid quantification of viable spore by a simple spectrophotometric method.
- Zhao, J., Krishna, V., Moudgil, B., & Koopman, B. (2008). Evaluation of endospore purification methods applied to *Bacillus cereus*. *Separation and Purification Technology*, 61(3), 341–347. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2007.11.002>
- Zhao, J., Ma, M., Zeng, Z., Yu, P., Gong, D., & Deng, S. (2021). Production, purification and biochemical characterisation of a novel lipase from a newly identified lipolytic bacterium *Staphylococcus caprae* NCU S6. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36, 248–256. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1861607>

8. EKLER

EK 1

Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953 suşuna ait olan GDSL ailesi lipazının gen dizisi aşağıda yer almaktadır. C-terminalde 6X histidin etiketi bulundurmaktadır.

```
ATGAGACGGTGGGGATGGTTGTTGTGCTGCTGGCTGCTCGCCGGATGCGTAGCGCT
TTCGGCGGGCGGAAAGCCGGAGCGCCCGCATGAAGCCGCCGTCAAGCAGACGGAAGCAAAG
CCGTTGCCGAAAGACATTCACCTCGTCGCGTTAGGCGATTTCATTGACCGAAGGAGTCGGAG
ACGGTGAAAGGAAAGGCGGCTATGTCGGCCGCCTTGTCCCGCTTTTGGCGGCGGAGGATGG
GGTGCGGACGGTGACCGTCACGAATGCCGAAAGCGCGGCCGGCGCATCACCGAACTTGAA
CCGGTTATTTCGCGCCCATCAGGCGGAGCTTGAGCGGGCTCATATCGTCATGATCACGATCG
GCGGCAATGACGTGATGAATGTCGTCCGCGCTCATTTTTTTGACTTATCATACGAGCGGTT
TGCGAACGAGAGCCAACGATTTGCCGAGCGGCTCGATCATTTGTTGATGTTGTTGCGCACG
ATCAACCCGGATGCGGTCGTTGTCTGATCGGCTTGTACAATCCGTTTTCCGCCACGTTGC
CGAACATCCCGGAAATCGATGATGTCATCGCCGAATGGAACCGCACAAAGCCAAGCAGTGGT
TTCCCGCTATCCGCGCACGATCTTTGTGGATATTCAAGACATGTTTGCCAACCGCGATGAT
TTGCTTCACCGCGATGAATTTACCCGAACGCCGAGGGATATGCGCAAATGGCAGTGCGGG
TGTATGAGTCGCTCGATGCGCGAAAAGAGTGGTGGGCGAACCTCGAGCACCACCACCACCA
CCTG
```

EK-2

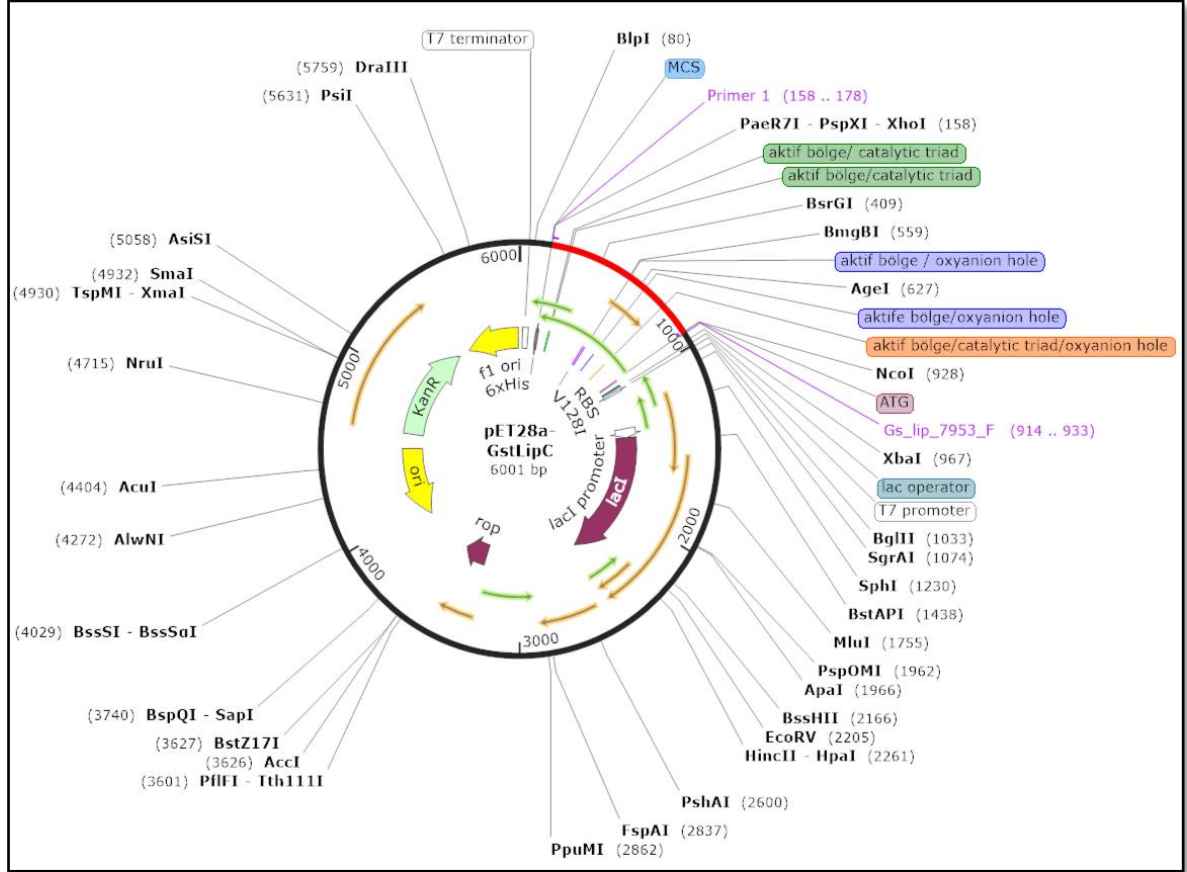
Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953 suşuna ait olan GDSL ailesi lipazının amino asit dizisi verilmiştir. C-terminalde 6X histidin etiketi bulundurmaktadır.

MGRWGWLLCCWLLAGCVALSAGGKPERPHEAAVKQTEAKPLPKDIHLVALGDSL
T
EGVGDGERKGGYVGRLVPLLAEDGVRTVTVTNAGKRGRRITELEPVIRAHQAELERAHI
VMITIGGNDVMNVVRAHFFDLSYERFANESQRFERLDHLLMLLRTINPDVAVVVLIGLYN
PFSATLPNIPEIDDVIAEWNRTSQAVVSRYPRITFVDIQDMFANRDDLLHRDEFHPNAEG
YAQMAVRVYESLDARKEWWANLEHHHHHH



EK-3

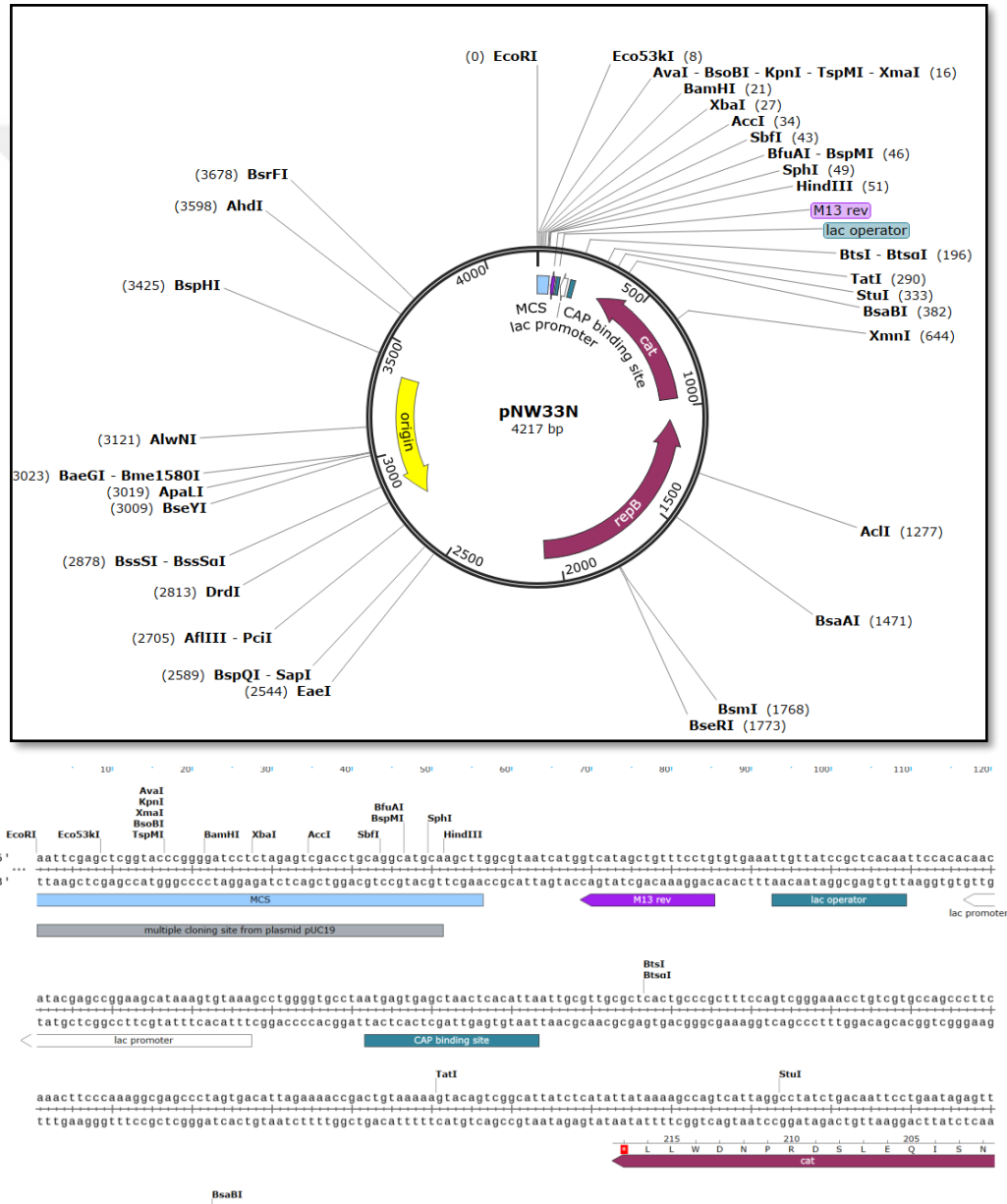
pET28a (+) ekspresyon vektörüne *gstLipC* geninin klonlanması sonucunun gösterimi;



EK-4

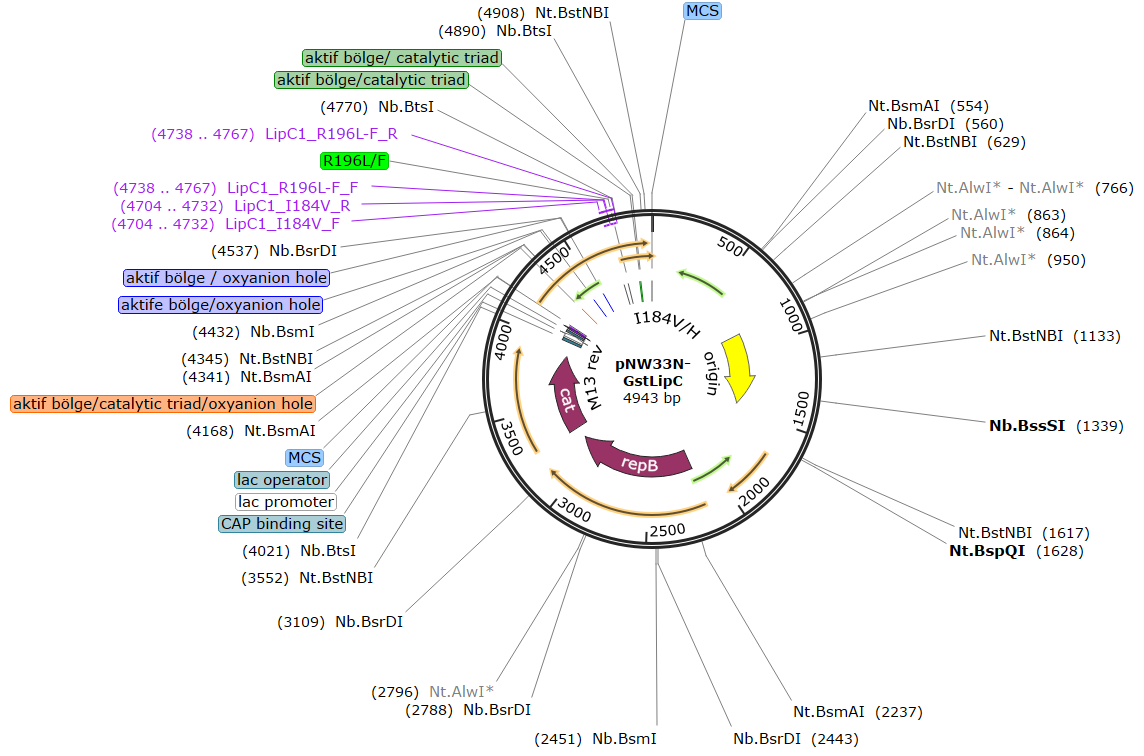
pNW33N plazmiti;

Bacillus subtilis ve *Geobacillus stearothermophilus* gibi termofilik türler de dâhil olmak üzere Gram pozitif bakterilerin genetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan çok yönlü bir mekik (shuttle) vektörüdür. Bu plazmit, çift replikasyon kökeni sayesinde hem *Escherichia coli* hem de Gram pozitif konaklarda çoğalabilir ve farklı türler arasında genetik manipülasyonu kolaylaştırır.



EK-5

pNW33N vektörüne *gstLipC* geninin klonlanması sonucunun gösterimi;



ÖZGEÇMİŞ

Arife KAÇIRAN, 2013-2014 eğitim-öğretim yılında Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans öğrenimi süresince, TÜBİTAK tarafından desteklenen “Gümüşhane ve Yakın Çevresindeki Bazı Endemik Bitki Türlerinin Çiçek Kısımlarının Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı projede araştırmacı öğrenci olarak görev aldı. 2017 yılında lisans eğitimini başarıyla tamamladı.

Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2017-2020 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda, Prof. Dr. Ali Osman Beldüz danışmanlığında yürütülen TÜBİTAK (118Z494) destekli projesi kapsamında “Cloning, Expression and Characterization of β -glucosidase from *Jiangella ureilytica* KC603” başlıklı tez çalışması ile yüksek lisans eğitimini tamamladı. Bu süreçte çeşitli eğitim ve sertifika programlarına da katılım sağladı.

2020 yılında aynı Fen Bilimleri Enstitüsünde Moleküler Biyoteknoloji Doktora Programı'na kabul edildi. Doktora eğitimi süresince çeşitli ulusal projelerde araştırmacı olarak görev aldı ve çok sayıda kongreye katıldı. Doktora çalışmasını TÜBİTAK 2244 – Sanayi Doktora Programı Projesi kapsamında gerçekleştirdi.

Kalite mühendisliği, ISO standartlarına yönelik iç ve dış denetçilik, baş denetçilik, proje yazımı, hibe ve fon kaynaklarına erişim, iş sağlığı ve güvenliği, kurumsal girişimcilik, B1 düzeyinde İngilizce ve Python tabanlı robotik kodlama alanlarında çeşitli eğitim programlarına katıldı. Bu kapsamda; ISO 9001:2015 İç Denetçi Sertifikası, baş denetçilik sertifikaları (ISO 27001:2022 – Bilgi Güvenliği Yönetim Sistemi, ISO 45001:2018 – İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi, ISO 50001:2018 – Enerji Yönetim Sistemi, ISO 22000:2018 – Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi, ISO 14001:2015 – Çevre Yönetim Sistemi), İş Sağlığı ve Güvenliği Sertifikası, KOSGEB Girişimcilik Sertifikası, KTÜ Yabancı Diller Yüksekokulu B1 İngilizce Sertifikası ve Python Robotik Kodlama Eğitim Sertifikası gibi yetkinlik belgelerine sahiptir. Ayrıca orta düzeyde İngilizce bilmektedir.

Yayınları;

Kaçıran, A., Şahinkaya, M., Çolak, D. N., Zada, N. S., Kaçağan, M., Güler, H. İ., ... & Beldüz, A. O. (2025). Biochemical Characterization of a Novel, Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Jiangella ureilytica* KC603, and Determination of Resveratrol Production Capacity from Polydatin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-27.

Hekim, S., Kaçıran, A., Akmehmet, A. N., Belduz, A. O., Bektaş, K. İ., Mamatjan, Y., & Canakci, S. (2025). Point mutations enhance catalytic efficiency of *Geobacillus stearothermophilus* α -glucosidase: A biochemical characterization study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144379.

Zada N. S., Belduz A. O., Guler H. I., Khan A., Sahinkaya M., **Kacıran A.**, Ay H., Badshah M., Shah A. A., ve Khan S. (2021). Cloning, expression, biochemical characterization, and molecular docking studies of a novel glucose tolerant β 127 glucosidase from *Saccharomonospora* sp. NB11. *Enzyme and Microbial Technology* 148 (2021) 109799. (SCI) doi:10.1016/j.enzmietec.2021.109799

Bildiriler;

1. Şahinkaya, M., Ay, F., **Kaçıran, A.**, & Beldüz, A. O. (2024, July 5–6). Investigation of the potential of encapsulins as immobiliser in the production of industrial enzymes. International Conference on Microbiology and Biology (ICMAB - 2024), Italy. Poster
2. **Kaçıran, A.**, Akmehmet, A. N., & Mammadov, B. (2023, October 20–22). Hepatit B qPCR tanı kiti geliştirilmesi. 22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, 20-22 Ekim 2023, Türkiye. Poster
3. **Kaçıran, A.**, Hekim, S., Akmehmet, A. N., Çanakçı, S., Eren Keleş, E., & Beldüz, A. O. (2023). Yabanıl tip ve mutant reverse transkriptaz enzimlerinin rekombinant sentezi ve qPCR tabanlı SARS-CoV-2 tanı kitinde kullanımı. 22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, 20–22 Ocak, Türkiye. Poster
4. Akmehmet, A. N., **Kaçıran, A.**, & Mammadov, B. Hepatit C qPCR Tanı Kiti Geliştirilmesi. 22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, 20-22 Ekim 2023, Türkiye. Poster
5. Hekim, S., **Kaçıran, A.**, Akmehmet, A. N., Çanakçı, S., Eren Keleş, E., & Beldüz, A. O. (2023). Taq DNA polimeraz enziminin rekombinant üretimi, stabilite testleri ve qPCR tabanlı patojen tanı kitlerinde kullanımı. 22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, 20-22 Ocak, Türkiye. Poster
6. **Kaçıran, A.**, Hekim, S., Akmehmet, A. N., Çanakçı, S., & Beldüz, A. O. (2022). Cloning, expression, production and activity test of Taq polymerase. The 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 23–25 November, Türkiye. Poster

7. Abdulhekim, S., **Kaçıran, A.**, Akmeahmet, A. N., Mammadov, B., Çanakçı, S., & Beldüz, A. O. Cloning, Expression, and Production of Wild Type and Mutant Versions of HIV Reverse Transcriptase. The 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 23–25 November, Türkiye. Poster
8. **Kaçıran, A.**, Eren Keleş, E., Kiremit, M., Tekinay, A. B., & Beldüz, A. O. (2021). Comparison of the methods used for translocation detection in acute lymphoblastic leukemia. 6th International Congress on Applied Biological Science, p. 61, 8–9 December, Türkiye.
9. Akmeahmet, A. N., Hekim, S., **Kaçıran, A.**, Kiremit, M., Tekinay, A. B., İnanc Bektaş, K., Çanakçı, S., & Beldüz, A. O. (2021). Determination of germination with measurement of DPA amount. 6th International Congress on Applied Biological Sciences, p. 62, 8–9 December, Türkiye.

Görev Aldığı Projeleri;

1. TÜBİTAK 119C076, Sterilizasyon Sistemleri İçin Yeni ve Hızlı Biyolojik İndikatörlerin Geliştirilmesi ve Bu Alana Yönelik Nitelikli Araştırmacıların Yetiştirilmesi, Burslu (Doktora), Yürürlükte, BİDEB - Eğitim Burs ve Etkinlik Destekleri Grubu, BİDEB-2244/Üniversite-Sanayi İşbirliği Modeli, BİDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 16.11.2020 - (), Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.07.2020 - 15.07.2027.
2. KTÜ BAP 11013, Araştırma Üniversiteleri Destek Programı Projesi (BAP13), Araştırmacı, *Thermomyces lanuginosus* Lipazının Enkapsülün İle Çevre Dostu İmmobilizasyonu ve Deterjan Endüstrisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yürürlükte, Fen ve Mühendislik, Projenin Başlama Tarihi:12.01.2024.
3. Eryiğit Endüstriyel Mak. ve Tıbbi Cih. İml. İth. İhr. İnş. Tic. A.Ş., Araştırmacı, Sentetik Biyoloji Yöntemleri Kullanılarak Enzim Sentezi Geliştirilmesi, Sanayi, 01 Ocak 2022, 01 Haziran 2023.

TÜBİTAK 118Z494, Doğal Ürünleri Modifiye Ederek Kanseri Önleyici Potansiyellerini Arttıracak Özgün β -Glukosidaz Tasarımı, Burslu (Yüksek Lisans), Sonuçlandı, KBAG- Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Uluslararası / Pakistan, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 31.10.2019 - 28.09.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.10.2019 - 15.10.2021.