

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4 REKOMBİNANT
FOSFOTRİESTERAZ HOMOLOG PROTEİNİNİN MUTASYONLA BAZI
ÖZELLİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Fulya ÖZ

MART 2016

TRABZON



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4 REKOMBİNANT
FOSFOTRIESTERAZ HOMOLOG PROTEİNİNİN
MUTASYONLA BAZI ÖZELLİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Fulya ÖZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"DOKTOR (KİMYA)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29 / 02 / 2016

Tezin Savunma Tarihi : 28 / 03 / 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Trabzon 2016

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında
Fulya ÖZ Tarafından Hazırlanan**

**TERMOFİLİK *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4 REKOMBİNANT
FOSFOTRIESTERAZ HOMOLOG PROTEİNİNİN
MUTASYONLA BAZI ÖZELLİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 08 /03/2016 gün ve 1643 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

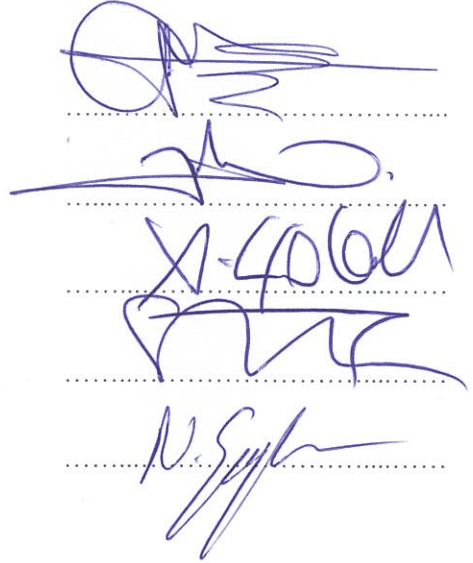
Başkan : Prof. Dr. İsmet YILMAZ

Üye : Prof. Dr. Ali KILINÇ

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 Rekombinant Fosfotriesteraz Homolog Proteininin Mutasyonla Bazı Özelliklerinin Geliştirilmesi” adlı bu çalışma, TÜBİTAK 109T985 nolu proje tarafından desteklenmiş olup, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Vermiş olduğu destek için TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca bilgisini, desteğini ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, bu projenin planlanıp hayata geçirilmesinde çok büyük katkıları olan, değerli eleştiri ve önerileri ile tez çalışmamı yönlendiren danışman hocam, sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’a minnet ve şükranlarımı sunarım. Önerilerini aldığım diğer tez izleme komitesi üyeleri hocalarım sayın Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve sayın Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya, laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sevgili hocam Doç. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN’a, ve sayın hocam Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans ve Doktora süresince Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarı’nda birlikte çalıştığım bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ve hayatımın her anında, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyerek bugünlere gelmemde büyük emek harcayan ve haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili aileme sonsuz minnet duygularımı sunuyorum.

Fulya ÖZ
Trabzon, 2016

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Termofilik *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 Rekombinant Fosfotriesteraz Homolog Proteininin Mutasyonla Bazı Özelliklerinin Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda 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. 28/03/2016

Fulya ÖZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	XIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Enzim Üretiminde Rekombinant DNA Teknolojisinin Avantajları	3
1.3. Termofilik Mikroorganizmalar.....	5
1.4. Isıl Kararlı Enzimler ve Biyoteknolojide Kullanımı	7
1.5. Esterazlar	8
1.5.1. Esterazların Biyoteknolojik ve Endüstriyel Kullanım Alanları.....	10
1.5.2. Isıl Kararlı Esterazların Mikrobiyal Üretimi	11
1.6. Fosfotriesterazlar (PTE'ler).....	12
1.7. Fosfotriesteraz Homolog Proteinler (PHP'ler).....	16
1.8. Protein Mühendisliği ile Mutant Enzimlerin Geliştirilmesi	18
1.9. PHP'nin Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Bölge Özgün Mutasyonlar ile Geliştirilmesi	21
1.10. <i>Geobacillus caldxyloslyticus</i> TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	22
1.11. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1. Kullanılan Materyaller.....	24
2.1.1. Cihazlar.....	24
2.1.2. Enzimler	25
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	25

2.1.4.	Primerler	25
2.1.5.	Kullanılan Suşlar	26
2.1.6.	Luria-Bertani Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması	26
2.1.7.	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	27
2.1.7.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	27
2.1.7.2.	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	27
2.1.7.3.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	28
2.1.7.4.	Tampon Çözeltiler	28
2.1.7.5.	Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler	29
2.1.7.6.	Diğer Çözeltiler	30
2.2.	Mutasyon Çalışmaları.....	31
2.2.1.	PCR için Kalıp DNA'nın Elde Edilmesi	31
2.2.2.	Plazmid DNA İzolasyonu.....	31
2.2.3.	PCR ile Mutant Genlerin Çoğaltılması.....	32
2.2.4.	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	33
2.2.5.	Kalıp DNA'nın Ortamdan Uzaklaştırılması.....	33
2.2.6.	Mutant Vektörlerin Konakçı Hücreye Aktarılması	34
2.2.6.1.	Kompotent Hücre Hazırlanması	34
2.2.6.2.	Transformasyon	34
2.2.7.	Mutant Plazmidlerin Seçimi, İzolasyonu ve Sıra Analizi	35
2.2.8.	DNA Sıralarının İncelenmesi	35
2.2.9.	Mutant Genlerin Ekspresyonu	35
2.2.10.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS'de Ekspres Edilen Mutant Proteinlerin Saflaştırılması	35
2.3.	Enzimin Karakterizasyonu Çalışmaları.....	36
2.3.1.	Protein Tayini	36
2.3.2.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	37
2.3.3.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	38
2.3.3.1.	Genel PTE Substratları ile Aktivite Tayini	38
2.3.3.2.	Genel Esteraz Substratları ile Aktivite Tayini.....	39
2.3.4.	Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi	39
2.3.5.	Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	40
2.3.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	40

2.3.7.	Bazı Kinetik Parametrelerin İncelenmesi	40
2.3.8.	Enzimlerin pH Kararlılıklarının İncelenmesi	40
2.3.9.	Enzimlerin Isıl Kararlılıklarının İncelenmesi	41
2.3.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	41
2.3.11.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi	41
3.	BULGULAR	42
3.1.	Mutant Primerlerin Tasarlanması	42
3.2.	PCR ile Mutant Genlerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Transformasyonu	43
3.3.	Mutant Genlerin Ekspresyonu ve Proteinlerin Saflaştırılması	45
3.4.	Mutant Enzimlerin Biyokimyasal Karakterizasyonu	46
3.4.1.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	46
3.4.2.	Enzim Aktivitesi Tayini	48
3.4.2.1.	Genel PTE Substratları ile Aktivite Tayini	48
3.4.2.2.	Genel Esteraz Substratları ile Aktivite Tayini.....	48
3.4.3.	Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi	49
3.4.4.	Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	50
3.4.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	50
3.4.6.	Bazı Kinetik Parametrelerin İncelenmesi	51
3.4.7.	Enzimlerin pH Kararlılıklarının İncelenmesi	53
3.4.8.	Enzimlerin Isıl Kararlılıklarının İncelenmesi	55
3.4.9.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	57
3.4.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi.....	60
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	63
5.	ÖNERİLER	69
6.	KAYNAKLAR	71

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

TERMOFİLİK *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4 REKOMBİNANT
FOSFOTRİESTERAZ HOMOLOG PROTEİNİNİN MUTASYONLA BAZI
ÖZELLİKLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Fulya ÖZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK
2016, 83 Sayfa

TÜBİTAK, 109T985 nolu proje kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada, pET-28a(+) vektörüne klonlanmış olan *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 fosfotriesteraz homolog protein geni (TK4PHP) üzerinde bölge spesifik mutasyonlar yapıldı. Elde edilen mutant genler *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3)pLysS konakçı hücresinde ekspres edilip, saflaştırıldı. Protein ekspresyonu ve saflaştırma işlemi, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak doğrulandı. Aktivite tayini çalışmalarında genel fosfotriesteraz (PTE) substratlarından paraokson, paratiyon ve malatyon varlığında herhangi bir aktivite elde edilemezken, denenen esteraz substratları içinde en yüksek aktivite *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA) varlığında gözlemlendi. TK4PHP rekombinant enzimi, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 mutata enzimleri için optimum pH 8,0 olarak bulunurken, TK4PHPM3 mutanta için bu değer 8,5 olarak belirlendi. Optimum sıcaklık değerlerinin TK4PHP, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 için 50 °C, TK4PHPM3 için ise 60 °C olduğu görüldü. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla TK4PHP için 1,27 mM ve 7,59 U/mg protein, TK4PHPM3 için 1,43 mM ve 14,53 U/mg protein, TK4PHPM3-M4 için 0,59 mM ve 3,34 U/mg protein, TK4PHPM3-M4-M5 için ise 0,46 mM ve 4,04 U/mg protein olarak hesaplandı. Rekombinant ve mutant PHP'lerin 4 °C'de, pH 3,0-9,0 aralığındaki tamponlarda ayrı ayrı 7 gün inkübe edilmesiyle, aktivitelerini büyük oranda koruduğu gözlemlendi. Mutant TK4PHPM3-M4-M5 enziminin, 90 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda aktivitesini %75 oranında koruduğu belirlendi. Bu sonuçlar, TK4PHP'sine yapılan mutasyonlarla birlikte, oldukça pH ve ısıl kararlı yeni mutant PHP'lerin endüstriyel uygulamalar için önemli potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4, Termofilik, Fosfotriesteraz Homolog Protein, Fosfotriesteraz, Mutasyon

PhD. Thesis

SUMMARY

DEVELOPMENT OF SOME PROPERTIES OF RECOMBINANT
PHOSPHOTRIESTERASE HOMOLOGY PROTEIN OBTAINED FROM
THERMOPHILIC *GEOBACILLUS CALDOXYLOSILYTICUS* TK4 BY MUTATION

Fulya ÖZ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Advisor: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK
2016, 83 Pages

In this study, supported by TUBITAK (Project number is 109T985), site specific mutations in the *G. caldoxylosilyticus* TK4 PHP gene cloned into pET-28a(+) vector was performed, mutant genes were expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS and the mutant proteins were purified. Protein expression and purification were confirmed by SDS-PAGE. Whereas the enzyme did not have any activity in the presence of PTE substartes; paraoxon, parathion and malathion, the highest activities were observed with *p*NPA as an esterase substrate. The optimum pH were determined to be 8,0 for TK4PHP, TK4PHPM3-M4, TK4PHPM3-M4-M5 and 8,5 for TK4PHPM3. The recombinant TK4PHP and the mutant TK4PHPM3-M4, TK4PHPM3-M4-M5 enzymes exhibited optimum activity at 50 °C and TK4PHPM3's activity was optimal at 60 °C. K_m and V_{max} values were calculated as 1.27 mM and 7.59 U/mg protein for TK4PHP, 1.43 mM and 14.53 U/mg protein for TK4PHPM3, 0.59 mM and 3.34 U/mg protein for TK4PHPM3-M4 and 0.46 mM and 4,04 U/mg protein for TK4PHPM3-M4-M5, respectively. When the enzymes were separately incubated at 4 °C in the buffer solutions (pH ranging from 3,0- 9,0) for 7 days, the activity was mainly retained. The TK4PHPM3-M4-M5 mutant enzyme retained about 75% of its original activity after 7 days of incubation at 90 °C. It is clear from the present results that the enzymes, which are mutated from TK4PHP showing an extremely pH- and thermo- stable esterase activity, might have a very important potential for industrial applications.

Key Words: *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4, Thermophilic, Phosphotriesterase Homology Protein, Phosphotriesterase, Mutation

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Rekombinant DNA'ların üretilmesi.....	4
Şekil 2. α/β -hidrolaz katlanması.....	9
Şekil 3. PTE'nin binükleer metal merkezi	13
Şekil 4. TIM silindir katlanması içeren bir PTE'nin kristal yapısı	14
Şekil 5. PTE'nin substrat bağlanma cepleri.....	14
Şekil 6. PTE katalizli paraoksonun hidrolizi.....	15
Şekil 7. ePHP ve PTE'nin yapılarının üst üste çakıştırılması	17
Şekil 8. Protein mühendisliği ile mutant enzimlerin geliştirilmesi	20
Şekil 9. <i>G. caldxylosilyticus</i> TK4PHP'sinin amino asit sırasının <i>P. diminuta</i> PTE'si, <i>M. tuberculosis</i> PHP'si ve <i>E. coli</i> PHP'sinin amino asit sıraları ile karşılaştırılması	43
Şekil 10. M3F ve M3R, M4F ve M4R ile M5F ve M5R primerleri kullanılarak yapılan PCR'lar sonucunda elde edilen ürünlerin %1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	44
Şekil 11. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 proteinlerinin aminoasit sıralarının karşılaştırılması.....	45
Şekil 12. TK4PHPM3 için %12'lik SDS-PAGE elektroforezi	46
Şekil 13. TK4PHPM3-M4 için %12'lik SDS-PAGE elektroforezi	47
Şekil 14. TK4PHPM3-M4-M5 için %12'lik SDS-PAGE elektroforezi	47
Şekil 15. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 'in esteraz aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi	49
Şekil 16. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi	50
Şekil 17. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktiviteleri üzerine protein konsantrasyonunun etkisi	51
Şekil 18. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 için Lineweaver-Burk grafikleri.....	52
Şekil 19. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 için pH kararlılıklarının incelenmesi.....	54
Şekil 20. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 için ısı kararlılıklarının incelenmesi.....	56

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Rekombinant DNA teknolojisi ile ticari olarak üretilen bazı proteinler ve enzimler	5
Tablo 2. Termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulamaları	8
Tablo 3. <i>G. caldxylosilyticus</i> TK4 suşunun bazı biyokimyasal özellikleri.....	22
Tablo 4. Kullanılan cihazlar.....	24
Tablo 5. Kullanılan enzimler	25
Tablo 6. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	25
Tablo 7. PCR’da kullanılan primerler.....	26
Tablo 8. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan <i>E. coli</i> suşları.....	26
Tablo 9. PCR bileşenleri	32
Tablo 10. <i>DpnI</i> enzimi ile kesim	33
Tablo 11. SDS-PAGE’nin bileşenleri	38
Tablo 12. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5’in çeşitli substratlar varlığında esteraz aktivitesi	48
Tablo 13. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5’e ait kinetik değerler	53
Tablo 14. TK4PHP’nin esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi.....	58
Tablo 15. TK4PHPM3’ün esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	58
Tablo 16. TK4PHPM3-M4’ün esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	59
Tablo 17. TK4PHPM3-M4-M5’in esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi	59
Tablo 18. TK4PHP’nin esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi	60
Tablo 19. TK4PHPM3’ün esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi.....	61
Tablo 20. TK4PHPM3-M4’ün esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi	61
Tablo 21. TK4PHPM3-M4-M5’in esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi	62

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

AChE	: Asetilkolinesteraz
Ala	: Alanin
APS	: Amonyum persülfat
Asp	: Aspartat
BSA	: Sığır serum albümini
DMSO	: Dimetilsülfoksit
dNTP	: Deoksinükleotriposfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FITC	: Floresin izotiyosiyanat
g	: Gram
Glu	: Glutamat
Gly	: Glisin
His	: Histidin
IPTG	: İzopropil- β -D-1-tiyogalaktopiranozid
kDa	: Kilo dalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Luria-Bertani
LB Agar	: Luria-Bertani agar
Lys	: Lisin
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
mL	: Mililite
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
OP	: Organofosfat
OPD	: Organofosfat parçalayan enzim
OPH	: Organofosfat hidrolaz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Phe	: Fenilalanin
PHP	: Fosfotriesteraz homolog protein
<i>p</i> NPA	: <i>p</i> -nitrofenil asetat
<i>p</i> NPB	: <i>p</i> -nitrofenil bütirat
<i>p</i> NPL	: <i>p</i> -nitrofenil laurat
<i>p</i> NPP	: <i>p</i> -nitrofenil palmitat
PTE	: Fosfotriesteraz
rDNA	: Rekombinant DNA
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS- PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
Ser	: Serin
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamin tetraasetik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Thr	: Treonin
TIM	: Triozfosfat izomeraz
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
Tyr	: Tirosin
U	: Enzim ünitesi
v/v	: Hacim/hacim
Val	: Valin
V_{max}	: Maksimum hız
w/v	: Ağırlık/hacim
μ g	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Önemli bir biyomolekül sınıfı olan enzimler, canlı hücrelerde gerçekleşen metabolik reaksiyonların çoğunun hızını arttıran veya düzenleyen, genellikle protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Biyolojik sistemlerde olduğu kadar endüstriyel uygulamalar içinde önemli özelliklere sahip olan enzimler, organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik bir biçimde kolaylıkla gerçekleşmesini sağlaması açısından, canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimatik işlemlerin, geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, ılımlı ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir (Gümüsel, 2002). Enzimler, yeterli koşullar sağlandığında, dış ortamlarda da etkilerini gösterebildiklerinden dolayı gıda, tekstil, kozmetik ve diğer birçok alan için vazgeçilmez olmuşlardır. Geçen birkaç nesil boyunca, bilim, enzimlerin sırrını çözmüş ve enzimleri farklı uygulama alanlarında daha faydalı bir şekilde kullanmak için geliştirmiştir (Sökmen, 2005).

Biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması, bu konuda yapılan araştırmaların daha da önem kazanmasına neden olmaktadır. Son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Gessesse, 1998). Rekombinant DNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay olarak gerçekleştirilmesi esasına dayanan ve arzu edilen herhangi bir gen ya da ürünün çoğaltılmasını mümkün kılan bir yöntemdir. Moleküler genetik araştırma tekniklerinin gelişmesi, araştırmacılara farklı kaynaklardan gelen DNA moleküllerinin *in vitro*'da birleştirilebilme olanağı sağlamıştır. Canlı hücrelerinde genetik materyalin değişikliğe uğraması ve istenilen karakterlerin kendiliğinden ortaya çıkması son derece yavaş bir biçimde gerçekleşmektedir. Bu teknoloji, gereksinim duyulan genetik değişikliğin olması gerektiği yerde ve hızlı bir şekilde meydana gelmesine olanak sağlamakta olup, istenilen değişikliğin yanı sıra istenmeyen veya zararlı kombinasyonların

ortaya çıkmasını engellemektedir (Ekinici vd., 2005).

Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemler pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğünü ve biyolojik olarak kullanılabilirlik kapasitesini artırması açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması, viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir (Niehaus ve ark., 1999). Bu noktada ısıya dayanıklı mikroorganizmalardan elde edilen enzimler büyük ilgi çekmektedir. Endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimlerin kaynağı olan mikroorganizmalar;

- (1) Hücre yüzey alanının hücre hacmine oranı yüksek olduğundan, besinleri hızla hücre içine alabilir, böylece hızlı üreyebilir ve kısa sürede bol miktarda ürün oluşturabilirler,
- (2) Biyokimyasal aktiviteleri bakımından müthiş bir çeşitlilik gösterir, dolayısı ile çok çeşitli ürünlerin elde edilmesinde kullanılabilirler,
- (3) Farklı çevresel ortamlara kolaylıkla uyum gösterebildiklerinden rahatlıkla laboratuvar ortamında ucuz besin maddeleri kullanılarak üretilerler,
- (4) Genellikle biyosentezle aktif formda bileşikler oluştururlar,
- (5) ve bu mikroorganizmaların hücreleri ya da genleri manipüle edilerek daha fazla ürün vermelerini sağlamak, ürün yapısı ve aktivitelerini değiştirmek, hatta yeni ürünler sentezlemelerini sağlamak mümkündür (Özcengiz, G., 2002).

Özellikle endüstriyel uygulamalarda, yüksek sıcaklıklarda aktif olarak çalışabilen enzimler, mezofilik ve psikrofilik enzimlere göre büyük avantajlara sahiptirler. Termofillerden elde edilen ısı kararlı enzimler, kendi doğalarında var olan ısı kararlılıkları ve bunun yanında pH değişikliklerine, denatüre edici kimyasallara, deterjanlara, organik çözücülere ve inhibitörlere karşı dayanıklı olmalarından dolayı oldukça fazla sayıda ticari uygulamada kullanılmaktadır (Liu vd., 2006). Ayrıca termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktif olup, yüksek substrat konsantrasyonlarında iyi bir şekilde çalışırlar (Rhee vd., 2005).

Son yıllarda, mutasyonlarla birlikte, enzimlere, organik çözücüler, ekstrem sıcaklıklar ve pH'lar gibi farklı şartlar altında kararlılık ve performans kazandırabilmek veya substrat özgünlüklerini değiştirebilmek amacıyla, yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesini sağlamak mümkün hale gelmiştir (Tao ve Cornish, 2002). Enzimlerin özelliklerinin değiştirilmesi amacıyla, bölge spesifik mutasyonlarla veya

yönlendirilmiş değişim teknikleriyle birçok çalışma yapılmaktadır. Yönlendirilmiş değişimde genler üzerinde rastgele mutasyonla ve/veya rekombinasyonla mutasyonlar yapılıp, bunu takiben istenilen özelliğin açığa çıkıp çıkmadığını incelemek için uygun seçim yöntemleri kullanılmaktadır (Nikolaos, 2005). Böylece, yaban tip proteinde bulunmayan özellikler proteine kazandırılabilenkte, özellikle aktif bölgede yapılan mutasyonlar yardımıyla, enzimlere, yeni substrat özgülüğü kazandırılabilenkte ve enzimin substrata olan ilgisi artırılabilenkte (Wang vd., 2002).

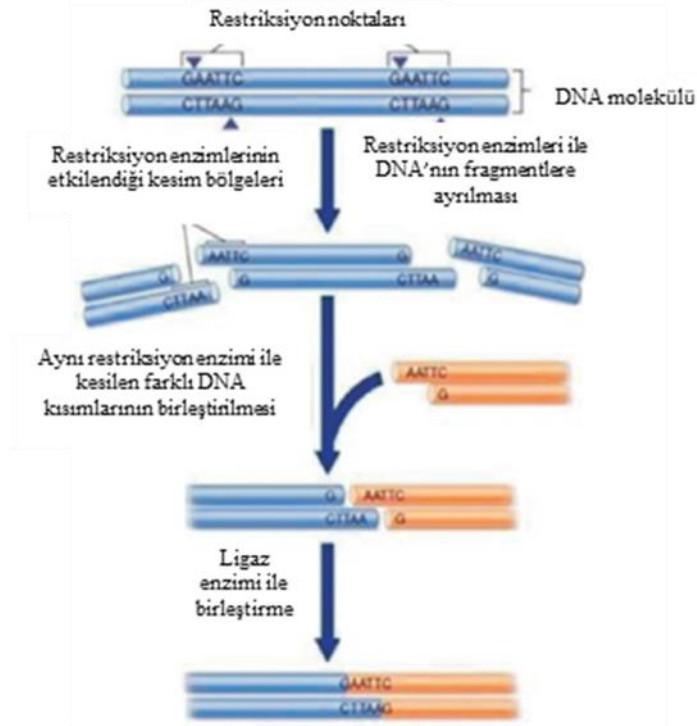
1.2. Enzim Üretiminde Rekombinant DNA Teknolojisinin Avantajları

Endüstride yaygın olarak kullanılan enzimler, uzun yıllardan beri bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Ancak bu organizmalardan çoğunun gelişme hızları yavaş ve üretimleri oldukça az olup, çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Bu nedenlerle enzimler üzerinde çalışan araştırmacılar, bunları üretmek için daha etkin yollar bulmak ve mevcut olanların özelliklerini geliştirmek amacıyla moleküler biyoloji, genetik, protein mühendisliği vb. alanlardaki gelişmeleri yakından izlemektedirler. Bu doğrultuda yapılan araştırmalar rekombinant DNA (rDNA) teknolojisinin genetik mühendisliği ve biyoteknolojinin diğer teknikleri ile birlikte, spesifik bir enzimi kodlayan genlerin özellikle bir bakteriye transfer edilerek mikrobiyal yolla üretilebilmesi için önemli potansiyele sahip olduğunu kanıtlamışlardır (Köksel vd., 1989).

Belirli bir amaç için doğrudan genetik materyal üzerinde yapılan bu teknolojiyle, *in vitro* şartlarda genetik materyalde planlı değişiklikler yapılabilenkte, istenilen genlerin istenilen canlıya sokularak, doğal biçimde bulunmadığı bu konakta çoğaltılması ve istenilen ürünü vermesi için nakledilen genin ifadesi sağlanabilmektedir. Bu teknolojiyle, prokaryotik ve ökaryotik gruplara ait türlerin kendi aralarında olduğu kadar, gruplar arasında da gen aktarımları yapmak ve çeşitlilikler meydana getirmek mümkün olmaktadır (Ekici vd., 2006).

Endüstriyel alanda enzim kullanımını sınırlayıcı faktörlerden biri de enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılmalarındaki güçlüklerdir. Bir enzimi kodlayan gen, kaynak organizmadan alınıp, enzimi daha etkin ve verimli bir şekilde üretebilecek başka bir organizmaya aktarılarak, enzimin ekonomik üretimi sağlanabilir. Bunun yanında, patojenik bir organizmada bulunan bir enzimin geni, patojenik olmayan başka bir organizmaya taşınabilir, belirli bir organizma endüstride uygulanan ekstrem koşullarda kullanılabilenkte

şekilde değiştirilebilir, doğal enzimlerden daha üstün özellikler gösteren enzimler üretilebilir ve spesifik modifikasyonlarla enzimin özellikleri DNA düzeyinde geliştirilebilir (Firidin, Ş., 2010).



Şekil 1. Rekombinant DNA'ların üretilmesi

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile birlikte, bir proteinin amino asit sırasında değişiklikler yapılabilmektedir. Önceden belirlenmiş spesifik amino asitleri kodlayan nükleotid sıralarının kontrollü olarak değiştirilmesini gerektiren bu işlem, bölge-spesifik mutasyon olarak tanımlanmış olup, son zamanlarda, enzim mühendisliği ile birlikte katalitik aktivite ve/veya ısı ve pH kararlılığı artırmak için oldukça fazla kullanılmaktadır (Walsh, 2002).

Genetik ve biyoteknoloji alanındaki çalışmalar, rekombinant DNA teknolojisinin keşfine kadar organizmaların genetik yapıları hakkında önemli bilgiler sağlamış, genetik ve biyoteknoloji alanında edinilen sonuçların yaygın kullanımında önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bununla birlikte günümüzde birçok protein ve enzim rekombinant olarak üretilmekte ve endüstriyel kullanıma sunulmaktadır (Arslan ve Akyüz, 2009). Bunların

bazıları kullanım alanları ile birlikte Tablo 1’de gösterilmiştir (Eren Kıran vd., 2006; Yıldırım, M., 2009).

Tablo 1. Rekombinant DNA teknolojisi ile ticari olarak üretilen bazı proteinler ve enzimler

Protein	Kullanım Alanı
Doku plazminojen aktivatör	Kalp krizi tedavisi
İnterferonlar	Kanser ve viral hastalıkların tedavisi
Rekombinant β interferon	MS hastalığının tedavisi
Kolesterol esteraz	Kan kolesterol seviyesinin belirlenmesi
Kimosin	Peynir üretimi
Fitaz	Hayvan yemlerinde fitik asidin parçalanması
α -Amilaz	Nişastanın hidrolizi
Proteaz	Proteinlerin enzimatik hidrolizi, deterjan endüstrisi
Lipaz	Lipidlerin enzimatik hidrolizi, süt ürünleri endüstrisi
Selülaz	Enzimatik sakkarifikasyon, alkol üretimi, deterjan sanayi
Ksilenaz	Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, ekmek ve hamur sanayi

1.3. Termofilik Mikroorganizmalar

Ekstrem şartlarda yaşayan mikroorganizmaların keşfi ve bunların biyoteknolojik açıdan önemli biyomateryalleri üzerinde yapılan çalışmalar, son zamanlarda büyük artış göstermektedir. Genel olarak, bilinen termofilik bakteriler mezofil ortamlara kolay bir şekilde adapte olabilmeleri açısından, dünya üzerinde yaşayan tüm bakterilerin atalarının termofilik bakteriler olduğu öne sürülmektedir (Madigan vd., 2000). Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofilik bakterilerin, ekstrem şartlarda dayanıklı enzimlere sahip olması, mezofilik türlere göre yüksek üreme hızları, son ürünün kolay kazanılması, yüksek işlem kararlılığı ve verimi, nişasta selüloz gibi doğal polimerleri doğrudan fermente edebilmeleri gibi birçok avantajları, onları biyoteknolojik açıdan önemli kılmaktadır (Gül-Güven, R., 2011).

Yaşam koşullarımızdan oldukça farklı şartlarda yaşayan ekstrem canlı gruplarından biri olan termofilik bakteriler son yıllarda yoğun ilgi duyulan araştırma odaklarından biri olmuştur. Pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkânsız olduğu sıcaklıklarda bile

enzimlerini kullanabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri, araştırmacıları bu konuda çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Dünyamızda solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin izolasyonları yapılmaktadır (Baker vd., 2000). Yapılan pek çok çalışmada sıcaklığın, mikroorganizmaların fizyolojik aktiviteleri ve gelişimleri üzerindeki en önemli faktörlerden biri olduğu, yüksek sıcaklığın farklı mikroorganizmalar tarafından farklı düzeyde tolere edildiği tespit edilmiş; pek çok ökaryotik canlı kısa bir süre bile 50 °C sıcaklığa dayanamazken, bazı mikroorganizmaların oldukça yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiği bildirilmiştir (Williams vd., 1995).

Termofiller genel olarak 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilen, hatta bazı türlerinin ise 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile yaşayabildiği bakteri grubudur. Optimum büyüme sıcaklıkları 50-105 °C arasında değişen pek çok termofilik bakteri tanımlanmıştır. Bu bakteriler yüksek sıcaklıklarda yaşayabildikleri için, bunlar hipertermofiller ve ekstremtermofiller olarak adlandırılmaktadırlar (Burhan vd., 2003). Termofiller ve hipertermofiller yüksek sıcaklıklarda yalnızca hayatta kalmazlar, ayrıca onların büyümeleri ve çoğalabilmeleri için bu yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyarlar. Termofillerin optimum büyüme sıcaklığı 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarken, hipertermofillerin optimum büyüme sıcaklığı 80 °C'nin üzerindedir. Termofilik ve hipertermofilik enzimler yüksek sıcaklıklarda aktif olduklarından dolayı genellikle 40 °C'nin altındaki sıcaklıklarda aktivite göstermezler (Vieille ve Zeikus, 2001).

Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için organizmalar metabolik ve diğer hücresel fonksiyonlarını bu ortamlara adapte etmek zorundadır. Termofillerin hücre membranı doymuş yağ asitlerinden meydana gelmiştir. Bu yağ asitleri hücreye hidrofobik bir ortam sağlar ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi yeterince sıkı ve sert tutar. Termofilik organizmaların hücresel elemanları (hücre membranı) ve bileşenleri (enzimler, proteinler, nükleik asitler vb.) yüksek sıcaklığa dayanıklıdır (65-85 °C). Ayrıca ekstrem derecede asidik ve alkali şartlar gibi denatürantlara ve de proteolize dayanıklıdırlar (Kristjansson ve Asgeirsson, 2002; Haki ve Rakshit, 2003).

Termofillerin DNA'sı, DNA'da pozitif süper sarmallar oluşturan geri dönüşümü sağlayan bir DNA giraz ihtiva eder. Bu da DNA'nın erime noktasını en azından organizmanın maksimum büyüme sıcaklığına kadar yükseltir. Termofiller ayrıca elektrostatik, disülfür köprüsü ve hidrofobik etkileşimler gibi etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara tolerans göstermektedirler (Haki ve Rakshit, 2003; Fujiwara, S., 2002).

Bu mikroorganizmalar diğer geleneksel mikroorganizmalar ile karşılaştırıldığında, doğaları nedeniyle hücresel komponentleri, enzimleri ve proteinleri de oldukça ısı kararlıdır. Enzimleri mezofilik homologlarına göre sadece ısı kararlı olmakla kalmaz, ayrıca kimyasal ajanlara da dayanıklıdır. Bu da endüstriyel uygulamalar için oldukça önemlidir (Haider ve Qayyum, 2007).

1.4. Isıl Kararlı Enzimler ve Biyoteknolojide Kullanımı

Yüksek ısı kararlılık birçok endüstriyel enzimde tercih edilen bir özelliktir, çünkü enzimlerin kullanıldığı işlemler genelde yüksek sıcaklıklarda (>50 °C) gerçekleştirilmektedir (Kristjansson ve Asgeirsson, 2002). Bu nedenle günümüzde, ekstremofilik organizmalardan yeni enzimlerin keşfinde büyük artış meydana gelmiş olup, özellikle termofillerden elde edilen enzimlerin sahip oldukları kararlılıktan dolayı oldukça fazla pratik ticari kullanım alanı bulmuştur (Gül-Güven, R., 2007). Pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkânsız olduğu sıcaklıklarda bile termofil bakterilerin enzimlerini kullanabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri, araştırmacıları bu konuda çalışmalar yapmaya yöneltmiştir (Chakraborti vd., 2003).

Yüksek sıcaklıklarda denatüre olmaları ve reaksiyonu katalizleyebilmeleri için çözücüye duydukları ihtiyaç, enzimlerin endüstriyel kullanımlarını sınırlayan özelliklerdendir (Hao ve Berry, 2004). Termal denatürasyon genellikle, düşük sıcaklıklarda proteinin katlanmış formu ile katlanmamış formu arasındaki dengenin katlanmamış form yönüne kayması ve yüksek sıcaklıklarda tersinir olmayan çökelmelerin ve kovalent modifikasyonların olması şeklinde meydana gelir. Termofilik organizmalar, proteinlerin aktif konformasyonlarını yüksek sıcaklıklarda sürdürerek bu problemin üstesinden gelmektedirler (Arnold, 2001).

Proteinlerin konformasyonel dayanıklılığı iki zıt faktör arasındaki dengenin sonucudur. Bunlar fleksibilite ve sertliktir. Termofilik enzimler, mezofilik enzimler ile karşılaştırıldığında, termofilik enzimlerin mezofilik olanlara nazaran oda sıcaklığında daha sert yapıda olduğu belirtilmiştir. Bu sertlik onları bozulmadan korumakta ve katalitik olarak aktif yapıyı korumalarını sağlamaktadır. Bundan dolayı denatüre edici şartlar altında optimal olarak daha aktiftirler (Bruins vd., 2001). Termofilik proteinlerin daha fazla halka delesyonuna maruz kaldığı görülür ve bu yüzden mezofilik proteinlerden daha kısadır. Halka delesyonu proteinin üç boyutlu yapılarının entropisini düşürerek, serbest enerjisini

arttırmakta, dolayısıyla proteinin kararlılığını artırmaktadır (Thompson ve Eisenberg, 1999). Aynı zamanda termofilik proteinler üç boyutlu yapısına katlanırken, daha küçük ve daha az sayıda oyuklar oluşturabilecek daha etkili bir paketlemeye sahiptirler (Russell vd.,1997, 1998). Isı şoku proteinlerinin bir türü olan şaperonlar, yüksek moleküler ağırlıklı kompleks proteinlerdir ve bunların görevi denatüre edilmiş proteinlere bağlanmak ve onların aktif formları içerisinde tekrar katlanmalarını sağlamaktır. Ayrıca, organik çözücüler de protein yüzey alanını azaltarak proteinin üç boyutlu yapısının korunmasını sağlar (Das ve Gerstein, 2000).

Isıl kararlı enzimlerin endüstriyel işlemlerde kullanılmaları ile yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyon riski azaltılmış olup, biyolojik olarak oldukça güç şekilde parçalanan ve çözünmeyen çevresel kirleticilerin oluşumu da engellenir. Bu proteinlerin mezofilik proteinlere nazaran yüksek α -sarmal ve β -kırmalı tabaka içeriğine sahip olmaları ve çok yavaş katlanma hızı göstermeleri, değişik denatüre edici şartlara karşı doğal yapıyı korumada daha etkin olduklarını göstermektedir (Fujiwara, S., 2002; Van Den Burg, B., 2003). Bazı termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel kullanım alanları Tablo 2’de verilmektedir (Gül Güven, R., 2011).

Tablo 2. Termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulamaları

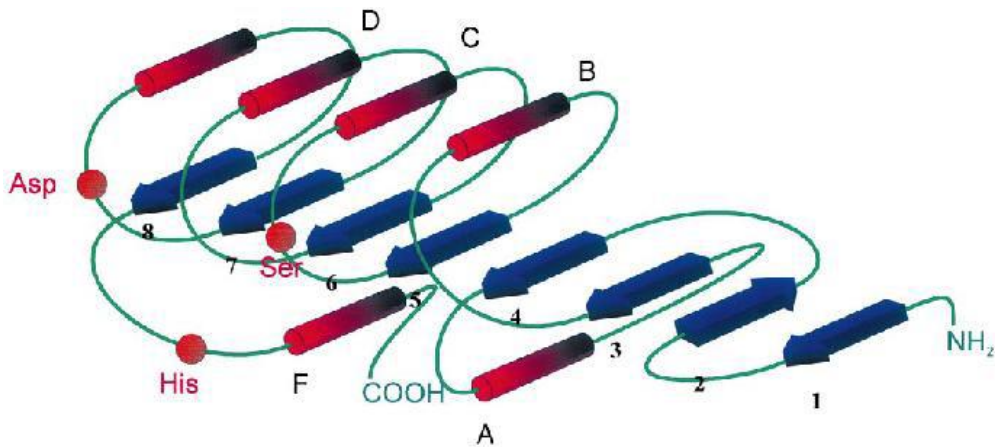
Mikroorganizma	Enzimler	Uygulama
Termofiller (45-65 °C)	Amilaz Ksilenz Lipaz/Esteraz	Tatlandırıcılar için glukoz, fruktoz hidrolizi Kağıt beyazlatma Tıp, tarım, deterjan, deri sanayisi
Ekstrem termofiller (65-85 °C)	β -galaktozidaz Proteaz	Süt ve süt ürünlerinde laktoz hidrolizi Ekmekçilik, deterjan sanayisi
Hipertermofiller (>85 °C)	DNA polimeraz	Genetik mühendisliği

1.5. Esterazlar

Esterazlar (EC 3.1.1.1), sulu ortamda ester bağlarının hidrolizini katalizleyip, organik çözücü ortamında da bu bağların oluşumunu sağlayan hidrolaz sınıfı enzimlerdir ve hidrolizledikleri ester bağlarına göre kendi aralarında bazı alt sınıflara ayrılırlar. Esterazların alt sınıfları sırasıyla: Karboksil esterhidrolazlar (EC 3.1.1.x), tiyoesterazlar

(EC 3.1.2.x), fosforik monoester hidrolazlar (EC 3.1.3.x), fosfodiester hidrolazlar (EC 3.1.6.x), difosforik monoesterazlar (EC 3.1.7.x), fosforik triester hidrolazlardır (EC 3.1.8.x) (Schmid vd., 1998).

Esterazlar çözünebilir substratlara karşı su/lipid ara yüzeyi varlığında etkindirler. Trigliseridlerin hidrolizinde katalizör olarak rol almaları nedeniyle memeliler, bitkiler ile bakteri ve maya gibi mikroorganizmalarda bol miktarda bulunurlar (Ünlü, 2004). Esterazlar kendilerini, yüksek saflıktaki kimyasal sentezinde optik saf bileşenlerin üretimi için ilginç biyokatalizler yapan yüksek bölge ve stereospesifite gösterirler. Kofaktörlere ihtiyaç duymamaları, genellikle stabil olmaları ve organik çözücülerde bile aktivite göstermeleri bu enzimlere olan ilgiyi arttırmakta ve esterazların farmakoloji, gıda mühendisliği ve kimya endüstrilerinde önemli bir biyokatalizör olmasını sağlamaktadır (Bornscheuer ve Kazlauskas, 1999).



Şekil 2. α/β -hidrolaz katlanması. (1-8) β -kırmalı tabakası mavi oklar, (A-F) α -sarmal kırmızı sütunlar; katalitik amino asit üçlüsünün konumu turuncu daireler ile gösterilmiştir

Esterazların üç boyutlu yapısı karakteristik α/β -hidrolaz katlanması ile meydana gelmektedir ve $\alpha/\beta/\alpha$ sandviçi oluşturacak şekilde beşten sekize kadar α -sarmallarla bağlanmış, β -kırmalı tabakadan oluşan yapılardır. Çoğu familyada β -kırmalı tabakalar paraleldir. Katalitik mekanizmaları Ser-His-Asp(Glu) amino asitlerinin oluşturduğu ve tüm enzimlerde korunmuş katalitik üçlü tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2) (Ollis vd., 2002).

Genel olarak, α/β -hidrolaz enzim ailesi esterazların tipik serin hidrolaz mekanizmasını kullanırlar. Ester hidrolizi ve oluşumu reaksiyonları esterazlar için benzerdir ve dört adımdan oluşur (Bornscheuer, 2002). İlk basamakta aktif bölgedeki serin

biriminin substratın karbonil karbonuna nükleofilik saldırısı sonucu tetrahedral bir ara ürün oluşur. Bu ara ürün histidin ve asparagin amino asitleri tarafından kararlı hale gelir. İkinci adımda alkol salınır ve açıl-enzim kompleksi oluşur. İkinci bir nükleofilin saldırısı ile açıl-enzim kompleksi hidrolizlenerek ikinci bir tetrahedral ara ürün oluşur. Son olarak bir asit ya da esterin ayrılması ile enzim yeniden elde edilir (Bornscheuer ve Kazlauskas, 1999). Her iki tetrahedral ara ürün bir oksianyona sahip olup bu oksianyon, oksianyon boşluğundaki protein atomlarının hidrojen bağı kapasitesi ile kararlı kılınır (Gandhi vd., 2000).

1.5.1. Esterazların Biyoteknolojik ve Endüstriyel Kullanım Alanları

Esterazlar, lipazlar gibi geniş bir endüstriyel kullanım alanına sahiptir. Esterazlar, doğal materyallerin, tahıl atıklarının, plastikler ve diğer toksik kimyasallar gibi endüstriyel kirleticilerin bozunmasında önemli rol oynamakla birlikte optikçe saf bileşiklerin, parfümler ve antioksidanların sentezinde de yaygın olarak kullanılırlar (Panda ve Gowrishankar, 2005). Ayrıca kirli suların temizlenmesinde, biyosüpfaktan olarak deterjan üretiminde, karbohidrat ve amino asit türevlerinin eldesinde ve hayati önem arz eden enantiyomerik olarak saf ilaçların hazırlanması gibi biyoteknolojik uygulamalarda da sıkça kullanılmaktadırlar (DeFlaun ve Fredrickson, 2007; Tirawongsoroj ve Sriprang, 2008).

Esterazların endüstride uygulama buldukları alanlardan biri tarımdır. Tarım kimyasallarına karşı dayanıklılığı sağlayan yolların başında karboksilesteraz seviyesinin yükseltilmesi gelmektedir. Karboksilesterazlar tarım kimyasallarının üç sınıfını oluşturan organofosfatlar, karbamatlar ve piretroidlerle etkileşerek tarım kimyası ve detoksifikasyonu üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (Harold ve Ottea, 2000).

Bazı çalışmalarda ise karboksilesterazların kolestrol biyosentezi (Benayoud, 2000) ve A vitamini hepatik kullanımı (Harrison, 2000) üzerinde rol oynayabilecekleri belirtilmiştir. Karboksilesterazlar, farmakolojik açıdan önem arz eden birçok bileşiğin sentezinde kullanılmakta olup, amid ve ester bağı içeren birçok ilacın farmokinetik davranışlarının belirlenmesinde temel olarak kullanılan belirleyiciler olarak tanımlanmışlardır (Oliver, 2000).

Yağ rafinerisi, sabun ve deri üretimi gibi birçok endüstriyel işlemler esnasında oluşan lipidce zengin atıklar; yağ, yağ asitleri ve sülfatlar gibi yüksek konsantrasyonda oksitlenebilen maddeleri içerirler. Atık miktarı ve bileşimi uygulanan endüstri türünde

kullanılan hammaddelere bağlıdır. Böylelikle esterazlar çevre temizliği konusunda da uygulama alanı bulmaktadır (Hasan vd., 2006). Bunun yanında, *Ophiostoma piceae* sterol esterazı, trigliseritleri ve sterol esterlerini etkili bir şekilde hidroliz ettiği için kâğıt endüstrisinde kullanılmaktadır. *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium viscosum* ve *Candida rugosa*'dan elde edilen esterazlar, kâğıt hamuru üretimi esnasında açığa çıkan ziftlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadırlar (Kontkanen vd., 2004).

Esterazlar bazı hastalıkların tedavisinde oldukça faydalı olan kiral ilaçların sentezinde büyük bir rol oynamaktadırlar (Bornscheuer, 2002). Örneğin, *Trichosporon brassicae*'den elde edilen bir esteraz eklem iltihabı, güneş yanıkları, adet sancıları ve ateşli iltihabı azaltmakve ağrıyı dindirmek için oldukça etkili olan optikçe aktif (S)- ve/veya (R)-ketoprofen [2-(3-benzoilfenil) propiyonik asit] üretiminde kullanılmaktadır (Shen vd., 2002). Bunun yanında Alzheimer ilaçlarında, bütirikolinesterazın inhibe edilmesinde karboksilesterazlar kullanılmaktadır (Yu vd., 2001). İnsan serum esterazı ise etoposidin hidrolizinde ve toksisitesinin azaltılmasında kullanılmaktadır. Etoposid türevleri oldukça etkili antikanser ilaçlarıdır (Wrasidlo vd., 2002).

Esterazlara başvurulmuş bir diğer endüstri kolu da gıda sanayidir. Fermente gıda ürünleri göz önüne alındığında tat çok önemli bir parametredir. Tadın, reaksiyon ilerleyişi sırasında, lipid bileşiminde meydana gelen hidrolitik ve oksidatif değişikliklerle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu hidrolitik değişimler, gliserol-ester bağlı yağ asitlerinin salıverilmesi, bakteriyal lipaz ve esterazlardan kaynaklanır (Lopes vd., 1999). Bilim adamları yıllarca, süt ürünlerinin olgunlaştırılması işlemini kısaltmaya, maliyeti düşürmeye ve farklı peynirlerin tadını artırmaya yönelik çalışmışlardır ve bu amaç içinde yine lipaz ve esterazlardan faydalanılmıştır (Choi ve Lee, 2001). Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada, beyaz peynirin özellikleri üzerine *Mucor miehei*'den izole edilen lipolitik enzim ilavesinin olgunlaşma süresine etkileri incelenmiş, elde edilen sonuçlardan peynirlerin olgunlaşma katsayısı ve uçucu yağ asitleri içeriğinde önemli düzeyde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Karaca ve Güven, 2004).

1.5.2. Isıl Kararlı Esterazların Mikrobiyal Üretimi

Lipazların aksine esterazların yüksek miktarlarda izolasyonu kolay bir işlem değildir (Kademi vd.,2000). Bunun yanında endüstride yüksek bir potansiyele sahip olmalarına karşın, sert reaksiyon şartlarında (yüksek sıcaklık, organik çözücüler, kuvvetli bazik veya

asidik ortamlar gibi) kararsız olduklarından, endüstriyel işlemler için çok uygun değildir. Ancak, sulu ve susuz ortamlarda çalışma yeteneği, bu enzimleri streospesifik hidroliz, transestrifikasyon ve ester sentezi reaksiyonlarında eşsiz kılmıştır (Gao vd.,2003). Termofil mikroorganizmaların sahip olduğu termofilik enzimlerin daha ısı kararlı olduğu, proteoliz ve denatürasyona daha dayanıklı olduğu belirtilmiştir (Kumar vd, 2000). Bu açıdan yaklaşarak, DNA teknolojisi yardımıyla termofilik mikroorganizmalardan izole edilen ısı kararlı esterazlar, istenilen özellikler bakımından geliştirilerek, endüstriyel olarak birçok alanda yer bulmakta ve artan potansiyel uygulamalara ilaveten, bu organizmalardan elde edilen enzimler, olağanüstü termodinamik kararlılıklar için yapısal gereksinimleri incelemek amacıyla da büyük ilgi çekmektedirler.

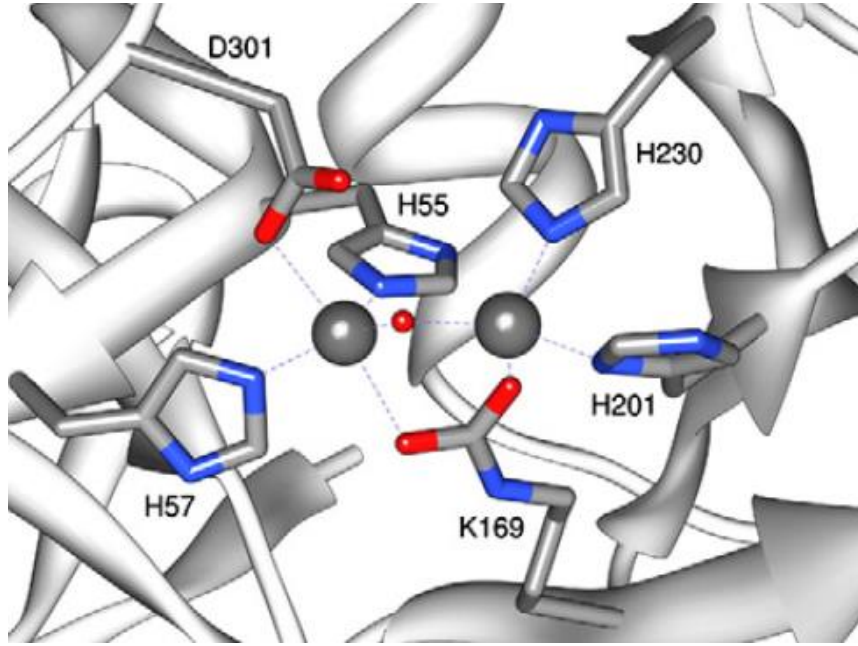
Bu artan ilgiyle birlikte çeşitli mikrobiyal kaynaktan klonlanan veya saflaştırılan birçok ısı kararlı esteraz karakterize edilmiştir. Termoasidofilik *Picrophilus torridus* ve *Sulfolobus solfataricus* P1, termoalkalifilik *Rhodococcus* sp. LKE-028, hipertermofilik arkeler *Archaeoglobus fulgidus*, ve *Pyrobaculum calidifontis*'in ısı kararlı esterazlar ürettikleri belirlenmiştir (Manco vd., 2000; Hotta vd., 2002; Hess vd., 2008; Kumar vd., 2012; Nam vd., 2013). Termofilik bakterilerden ise *Thermoanaerobacter tengcongensis*'den (Zhang vd., 2003), *Thermotoga maritima*'dan (Kakugawa vd., 2007), *Bacillus cereus* AGP-03'ten saflaştırılan (Ghati ve Paul, 2014) ve *Geobacillus thermoleovorans* YN'den (Soliman vd., 2007), *Geobacillus thermodenitrificans* T2'den (Yang vd., 2012), *Pelagibacterium halotolerans* B2^T'den (Wei vd., 2013), *Thermomyces lanuginosus*'tan (Li vd., 2014) ve *Bacillus gelatini* KACC 12197'den (Kim vd., 2015) klonlanıp karakterize edilen ısı kararlı esterazlar literatürde bildirilmiştir. Ayrıca *Bacillus subtilis* türü bir esteraza, enzimin ısı kararlı mutantlarını elde edebilmek yönünde yönlendirilmiş evrim türü mutasyonlar uygulanmıştır (Gong vd., 2014).

1.6. Fosfotriesterazlar (PTE'ler)

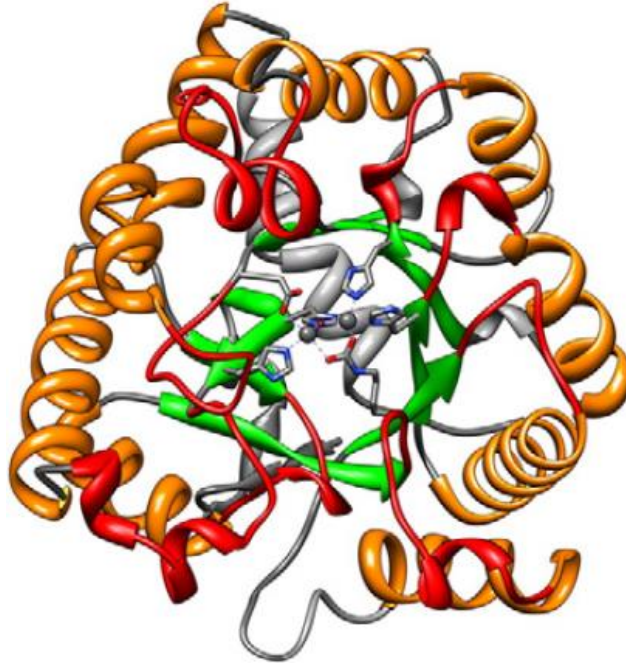
Organofosfatlardaki fosfoester bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimler, fosfotriesterazlar (PTE, EC 3.1.8.1), organofosfat hidrolazlar (OPH), organo-fosfat parçalayan enzimler (OPD), paratyon hidrolazlar veya paraoksonazlar (SsoPox) (Hou vd.,1996; Merone vd., 2005) olarak adlandırılırlar. PTE'ler, substratlarının ester gruplarıyla etkileşen üç farklı bağlanma cebine sahip hidrofobik bir aktif bölge içeren, metal bağımlı hidrolazlardır. PTE, doğal halinde, iki Zn²⁺ atomu içermektedir (Omburo

vd., 1992). Substratlarının fosfor merkezlerinin aktivasyonu, aktif bölgede bulunan divalent metal merkez ve fosforil oksijeninin doğrudan etkileşmesi sonucu gerçekleşir (Bigley ve Rausel, 2012). PTE'ler amidohidrolaz üst ailesinin bir üyesidir. Ailenin diğer üyelerinde olduğu gibi PTE'ler de aktif bölgenin β silindirinin C ucunda yerleşmiş olduğu bir TIM silindir (α/β)8 katlanması içerir (Şekil 4).

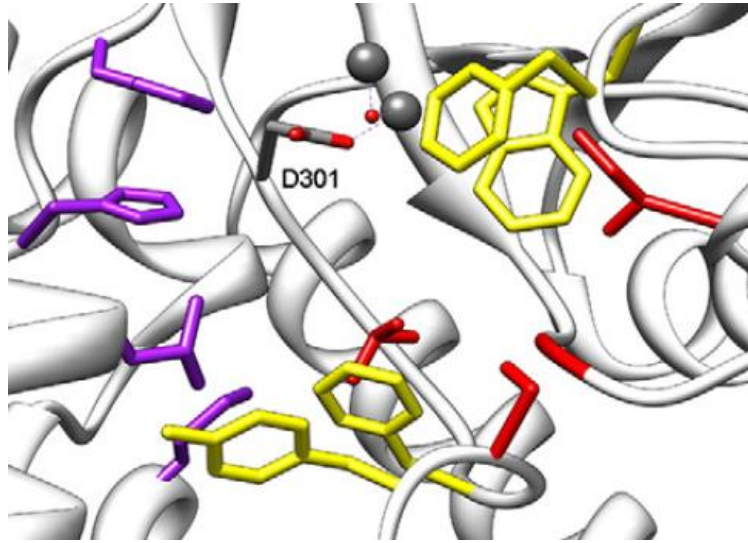
Metal iyonlarının biri veya ikisi için potansiyel katalitik fonksiyonlar, fosfor merkezindeki elektrofilik karakteri artırmak için substratın P=O veya P=S bağlarını polarizlemesi, hidrolitik su molekülünü aktifleştirmesi ve P-O bağının parçalanması esnasında ayrılan grup üzerinde meydana gelen negatif yükü nötralleştirmesi şeklinde açıklanmaktadır (Aubert vd., 2004).



Şekil 3. PTE'nin binükleer metal merkezi (Bigley ve Raushel, 2012).



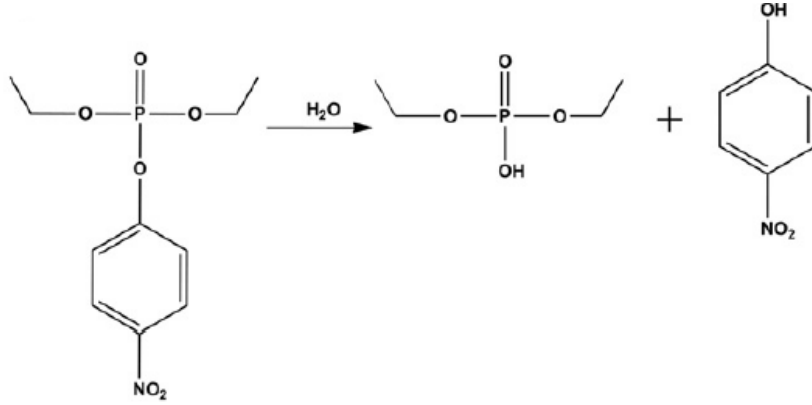
Şekil 4. TIM silindir katlanması içeren bir PTE'nin kristal yapısı (Bigley ve Raushel, 2012).



Şekil 5. PTE'nin substrat bağlanma cepleri (Bigley ve Raushel, 2012).

Paraokson, PTE için bilinen en iyi substrat olmasına rağmen, enzimin substrat özgünlüğü oldukça geniştir ve organofosfatların, tiyofosfatların ve fosfortiyolatların birçok çeşidini içermektedir (Hong ve Raushel, 1996). PTE'nin doğal substratı henüz bilinmemektedir. Ancak, enzim, paraokson yanında (Şekil 6), böcek öldürücüler olan paratiyon, metilparatiyon, fensulfotiyon gibi organofosfatları da hidrolizleyebilmektedir

(Schrader, 1950;Dumas vd., 1989). Ayrıca, sinir ajanları olan sarin, soman ve VX gibi maddeleri de hidrolizleyebilir. Fakat bu substratlar için katalitik aktivite, daha az toksik olan böcek öldürücüler için olandan daha düşüktür (Dumas vd., 1990; Kolakowski vd., 1997).



Şekil 6. PTE katalizli paraoksonun hidrolizi

Organofosfatlar (OP), merkezi sinir sisteminin esas enzimi asetilkolinesterazı (AChE) dönüşümsüz inhibe ederek, periferik ve santral kolinerjik reseptörlerin aşırı uyarılmasına neden olan, son derece ölümcül nörotoksinlerdir (Marrs, 2007). OP'ler II. Dünya Savaşı'ndan beri dünya genelinde sarin, soman ve VX gibi kimyasal savaş ajanlarının geliştirilmesinde ve tarımda böcek öldürücülerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bigley ve Raushel, 2012). Yapılan son araştırmalar; Hindistan gibi Üçüncü Dünya Ülkeleri'nde, malatyon, metil paratyon, klorpirifos ve diazinon gibi çevreyi kirleten OP böcek öldürücülerin kullanımının, meyve-sebze ve içme suyu kaynaklarının OP'larca endişe verici seviyelerde kirletildiğini ortaya koymuştur (Sinha vd., 2011; Danis vd., 2011). Ayrıca son dönemlerde sarinin Suriye'de kullanımı OP zehirlenmelerine karşı etkili tıbbi ajanların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (Eisenkraft vd., 2014).

Araştırmacılar, sinir ajanlarının sinaptik AChE'ı inhibe etmeden önce katalitik hidrolizini gerçekleştirmeye yönelik çalışmalar yürütmektedir. Alternatif bir yaklaşım ise katalitik biyotemizleyicilerin tanımlanması ve optimizasyonuna dayanmaktadır (Masson ve Rochu, 2009). Ancak yaban tip enzimlerin hidroliz yetenekleri bu tip sinir ajanlarının detoksifikasyonunda yetersiz kalmakta, bu da araştırmacıları enzimleri mutasyona

uğratarak, yüksek katalitik etkinlik gibi bazı özelliklerinin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapmaya yönlendirmektedir (Amita vd., 2006; Gupta vd.,2011).

Günümüzde, OP'lerin detoksifikasyonu, ağartıcı muamelesi, alkali hidrolizi ve yakıp kül etme gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Yavaş, pahalı ve çevreye zarar verebilen bu yöntemlerde şartlar serttir ve yan ürünler toksik olabilmektedir. Bu nedenle enzim katalizli detoksifikasyon üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Worek vd., 2014). Geniş substrat spesifitesi ve stereoseçiciliği nedeniyle PTE, OP sinir ajanlarının *in vivo* ve *in vitro* detoksifikasyonu için ümit vericidir (Ghanem ve Raushel, 2005). Organofosfatlarca kirlenmiş alanlarda organofosfat miktarını tayin edebilmek amacıyla çok yönlü organofosfat hidrolaz-tabanlı bir biyosensörün kullanıldığı bir metot geliştirilmiştir. Bu yöntem, enzimin çok yakınındaki bir çevrede pH'da meydana gelen substrat bağımlı değişimi esas almaktadır. Bu pH değişimi, enzime kovalent olarak immobilize edilmiş olan floresin izotiyosiyanat (FITC) kullanılarak tayin edilmektedir. Bu yöntemle, miktarı tayin edilebilen organofosfat böcek öldürücüler; etilparatyon, metilparatyon, fensulfotiyon ve diğer birçok maddeyi içermektedir (Rogers vd., 1999). Bunun yanında, potansiyometrik (Mulchandani vd., 1998), amperometrik (Wang vd., 2003; Chough vd., 2002) ve optik (Rogers vd., 1999) dönüştürücüler içeren birçok OPH enzim temelli biyosensörler de geliştirilmiştir.

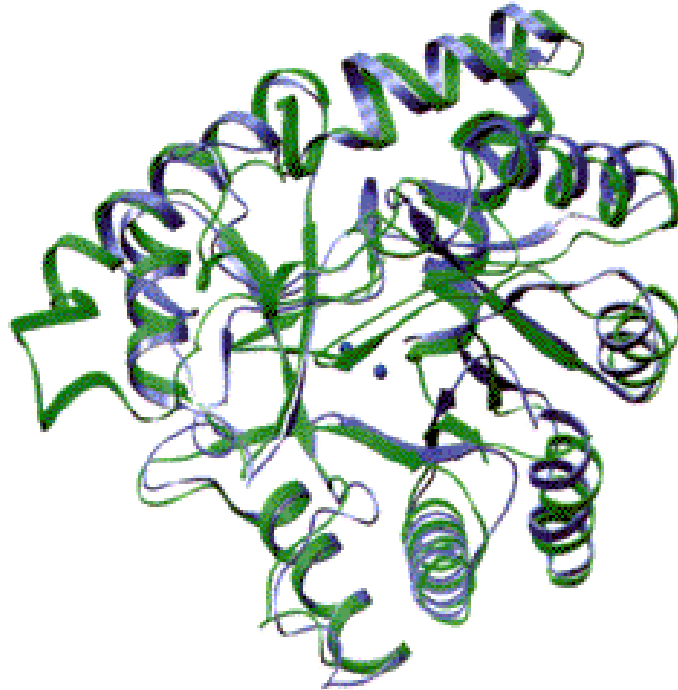
1.7. Fosfotriesteraz Homolog Proteinler (PHP'ler)

Evrimin, genellikle bir organizmanın özel bir ekolojik bölgeye seçimli adaptasyonu için milyonlarca yıl gerektirdiği tahmin edilmekte iken son bulgular, mikroorganizmaların evriminin çok uzun zaman değil de 10 yıllık veya 100 yıllık daha kısa sürelerde meydana gelebileceğini önermektedir. Bakterilerin laboratuvar ortamında yapay evrimi çalışmaları, proteinlerin seçici baskılara cevaben daha kısa bir zaman yelpazesinde değiştiğini belgelemektedir (Benner ve Ellington, 1988). Yeni aktivitelerin kazanılması, belirli bir katalitik fonksiyon için enzim özgünlüğünü değiştirmek üzere bir proteinin substrat bağlanma bölgesinin yeniden düzenlenmesini veya bir katalitik fonksiyona sahip olmayan fakat var olan bir bağlanma bölgesinde yeni kazanılmış bir katalitik aktivitenin oluşumunu gerektirebilir (Buchbinder vd.,1998).

Pseudomonas diminuta PTE'si, çevre koşullarının değişmesine karşılık yeni bir enzimatik aktivitenin doğal evrimine bir örnek olabilir. PTE'nin substratı olan OP'ların

tamamı sentetik bileşiklerdir ve enzim için doğal olarak bulunan herhangi bir substratla benzerlikleri bilinmemektedir. Paraoksonun sentezi, ilk olarak 1950’de (Schrader, 1950) bildirilmiştir. Bu durum, bakterilerdeki PTE aktivitesinin, bu geçen birkaç 10 yıllık süre zarfında benzer bir katalitik fonksiyona sahip başka bir enzimden, besin ihtiyaçlarını karşılayabilmek amacıyla sentetik bileşikleri hidrolizleyebilme kabiliyetine sahip olacak şekilde evrimleştiğini göstermektedir (Buchbinder vd., 1998).

PTE’ye en yakın sıra homolojisini, PHP’ler göstermektedir. Her ne kadar PHP’nin doğal substratı bilinmese de yapılan çalışmalarla paraoksonaz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Fonksiyonu bilinmeyen bir enzim olan PHP’nin PTE ile sıra özdeşliği %28, sıra benzerliği %66’dır. Her iki enzim de aynı binükleer (Zn^{2+}) metal merkezine sahiptir ve yüzeydeki 3 nolu lop hariç 3 boyutlu yapılar birbiri ile oldukça güzel örtüşmektedir (Buchbinder vd., 1998).



Şekil 7. ePHP ve PTE’nin yapılarının üst üste çakıştırılması. ePHP mor, PTE ise yeşil renk ile gösterilmektedir

PHP’lerin varlığına ilk olarak *E. coli*’de rastlanmıştır (Scanlan ve Reid, 1995). Bunun dışında homolog sıraları olan diğer 4 genin varlığı sırasıyla sıçan, fare, mikobakteri ve mikoplazmada belirlenmiştir (Hou vd., 1996; Himmelreich vd., 1996; Philipp vd., 1996) Sıra homolojisine dayanılarak PHP’nin yapısının PTE ile aynı olabileceği beklenebilir.

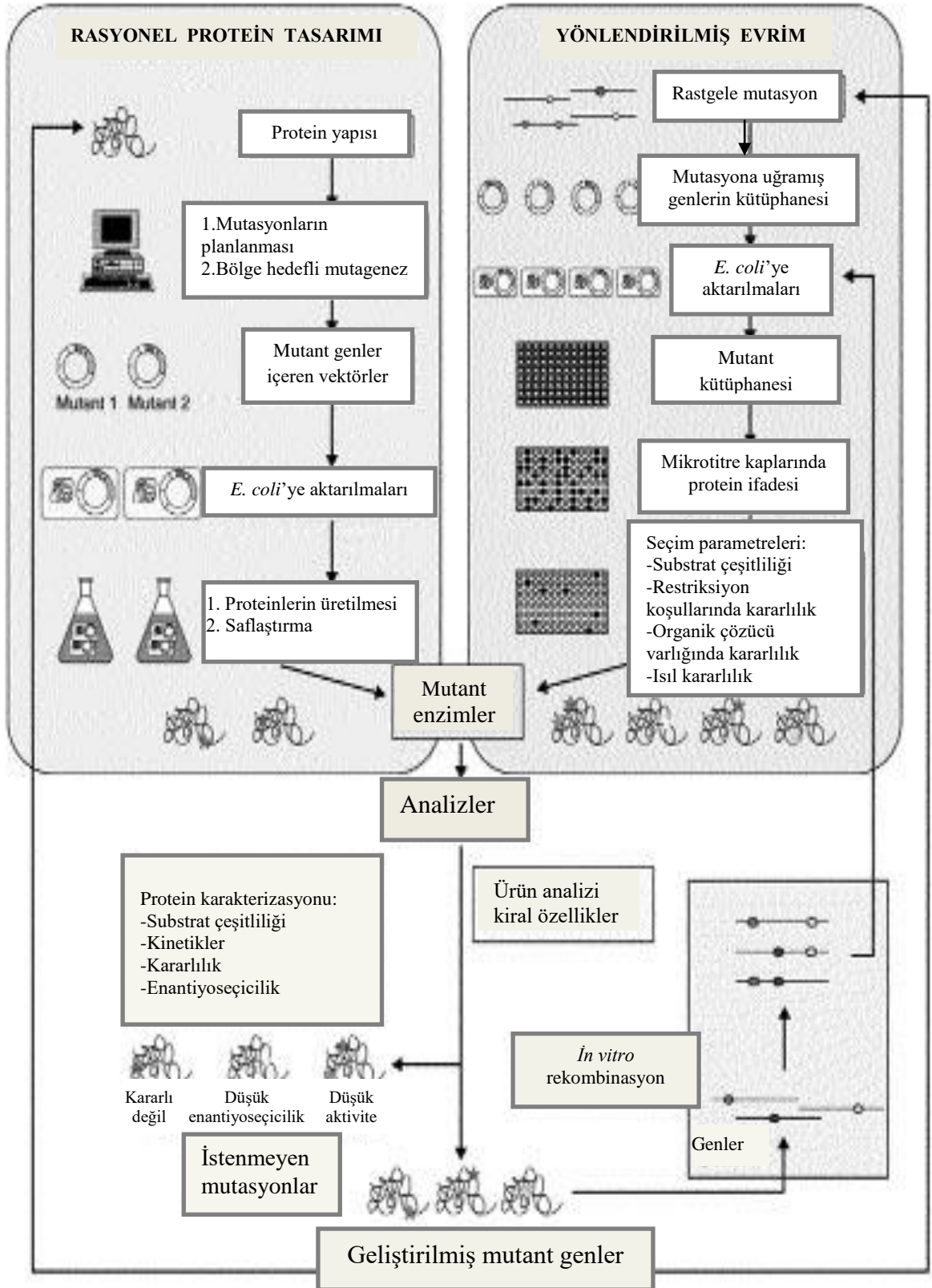
PHP ve PTE'nin primer sıralarının incelenmesi sonucunda, PTE'de bulunan çinkonun koordinasyonunda görev alan 4 histidin ve 1 aspartat biriminin PHP'de korunmuş olduğu görülmüştür (Scanlan ve Reid, 1995). Sadece, PTE'de 169. pozisyonda bulunan lisin tam olarak korunmamıştır. Bu birim, PHP'de bir glutamat ile yer değiştirmiştir ve *E. coli*, fare ve sıçan PHP'lerinin sıralarında bir pozisyon kaymış durumdadır. Mikobakteri ve mikoplazma PHP'lerinde ise PTE'deki lisin 169'un yerinde ise yine bir lisin birimi vardır (Buchbinder vd.,1998). Ancak, literatürde, bu yapısal farklılığın PTE aktivitesi üzerine etkisinden bahsedilmemiştir.

1.8. Protein Mühendisliği ile Mutant Enzimlerin Geliştirilmesi

Yeni aktiviteler ve/veya daha üstün özelliklere sahip biyokatalizörlere daima gereksinim vardır. Doğadan elde edilen çok sayıda mikroorganizma izolatının yeni enzim aktiviteleri için taranması da her zaman amaca uygun enzimler elde edilmesini sağlamaz. İşte protein mühendisliği ile bu sınırlamanın önüne geçebilmekte, (i) bilgisayar aracılığı ile moleküler modelleme ve bölge hedefli mutasyonlar ya da (ii) yönlendirilmiş moleküler evrim teknikleriyle doğal enzimlerden yeni biyokatalizörler oluşturulabilmektedir. Protein mühendisliğinin bu iki farklı yaklaşımı Şekil 8'de şematik olarak karşılaştırılmaktadır.

Bölge hedefli mutasyonları temel alan yaklaşım "rasyonel protein tasarımı" adını alır ve adeta terzi yapımı enzimler elde edilmesini sağlar. Ancak, bu yaklaşımın kullanılabilmesi için enzimin yapısının, yapısını oluşturan amino asitlerin diziliminin ve yapı-fonksiyon ilişkilerinin çok iyi biliniyor olması gerekir. Protein yapısının NMR spektroskopisi ile çözülmesindeki hızlı gelişme artık çok sayıda sekansın herkesin ulaşabildiği veri tabanlarına girmesini sağlamış olup pekçok protein için yeni tasarımları kolaylaştırmaktadır. Mevcut bilgiler ışığında, moleküler modelleme ile enzimin substrat seçiciliğinin, aktivitesinin ve stabilitesinin hangi tür amino asit değişiklikleri ile gerçekleştirilebileceği kestirilir, daha sonra bu değişiklikleri sağlayacak DNA manipulasyonlarına karar verilir. Bir sonraki aşamada bölge hedefli mutasyon teknikleriyle DNA üzerinde gerekli mutasyonlar yapılır. Değiştirilen moleküller konakçı hücrelere aktarılır, orada ifade edilerek ürüne dönüştürülür, daha sonra konakçıdan izole edilerek saflaştırılır ve substrat özgünlüğü, kinetik özellikleri, stabilitesi vb. açıdan analiz edilerek istenilen özellikleri taşıyıp taşımadıkları belirlenir.

Yönlendirilmiş evrim yaklaşımında ise enzim genini içeren DNA fragmentleri önce rastgele mutasyona uğratılır (polimeraz zincir reaksiyonu veya parçalanmış DNA fragmentlerinin rekombinasyonu ile). Daha sonra mutasyona uğramış fragmentler klonlanarak bir mutant gen kütüphanesi oluşturulur. Bu kütüphane taranarak belirli seçim parametrelerine göre istenilen değişikliklere sahip klonlar seçilir. Bundan sonraki aşamalar, diğer yaklaşımda olduğu gibi enzimin ve ürününün karakterizasyonunu ve geliştirilmiş mutant enzimlerin seçilmesini içerir. Daha ileri bir iyileştirme için, DNA karması (shuffling) adı verilen yöntem uygulanıp yönlendirilmiş evrim protokolu baştan tekrarlanabilir. DNA karması yöntemi rastgele mutajenez sırasında olagelen faydalı mutasyonları biraraya toplamaya yarar. Her iki yaklaşım da, istenilen özellikleri taşıyan biyokatalizörler elde edilinceye kadar tekrarlanır. İstenilen özelliğin ya da fonksiyonun mekanistik temelini ne ölçüde anlaşıldığı ve seçim için etkin prosedürlerinin mevcut olup olmadığı iki yaklaşımdan hangisinin daha etkin biçimde kullanılacağını belirleyen faktörler arasındadır. Her ne kadar her iki yöntem de gayet etkin olsa da, her ikisinin bir arada kullanılması en başarılı yol olmaktadır (Özcengiz, G., 2002).



Şekil 8. Protein mühendisliği ile mutant enzimlerin geliştirilmesi

1.9. PHP'nin Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Bölge Özgün Mutasyonlar ile Geliştirilmesi

Son yıllarda, PTE tarafından zayıf olarak hidroliz edilen substratlara karşı aktiviteyi artırmak amacıyla birkaç bakteriyel PTE'nin mutant formları geliştirilmiştir. Soman ve sarin kimyasal savaş ajanları ve bazı böcek öldürücülerin hidrolizi için *Pseudomonas diminuta* PTE'sinin mutantları yapılmıştır (Chen-Goodspeed vd., 2001a,b; Li vd., 2001; Raushel, 2002). Bunun yanında, diğer bakteriyel türlerden elde edilen PTE'ler VX hidrolizini artırmak için mutasyona uğratılmıştır (Gopal vd., 2000). Ayrıca, tarım ürünlerini korumak amacıyla çok kullanılan bir böcek öldürücü olan klorpirifoz'un hidrolizi yönlendirilmiş değişim ile 700 kat artırılmıştır (Cho vd., 2004).

E. coli PHP'si (ePHP) ve PTE'nin 3 boyutlu yapıları üst üste çakıştırıldığında, PTE'nin ePHP'den hacim olarak daha büyük olduğu ve N ucunda yaklaşık 40 ilave amino aside daha sahip olduğu görülmektedir. PHP amino asit sırası ve bimetallik katalitik bölge açısından PTE'ye oldukça benzemesine rağmen, üç aktif bölge lopunda (lop 1, 7 ve 8) kısmen büyük farklılıklar görülmektedir (Afriat vd., 2006). Amidohidrolaz üst ailesinde, lop 7 ve lop 8, aktif bölgedeki ligandlarla etkileşime giren ve substrat spesifitesini belirleyen bölgelerdir (Seibert ve Raushel, 2005). ePHP'de, Thr210Ala ve Thr245Ala mutasyonları ile yaban tipte bulunmayan fakat düşük de olsa bir paraoksonaz aktivitesi elde edilmiştir. Thr210Ala mutasyonu aktif bölgeyi oluşturan lop 7'de meydana gelirken, Thr245Ala mutasyonu ise lop 8 üzerinde bulunmaktadır (Roodveldt ve Tawfik, 2005). *Deinococcus radiodurans* bakterisinden elde edilen organofosfat-parçalayan bir fosfotriesteraz homologunda yapılan çalışmada ise reaksiyon mekanizmasında etkili olduğu ortaya konulan Gly207 amino asidinin Gly207Asp'ye mutasyonu ile metilparaokson varlığında aktivitenin 166 kat arttığı belirlenmiştir. Ayrıca metal bağlanma bölgesinde görev alan Tyr97'nin Tyr97Trp şeklinde mutasyonu ile aktivitede 118 kat artış tespit edilmiştir (Hawwa vd., 2009). Elde edilen bu veriler değerlendirildiğinde bir veya daha fazla mutasyonla çalışılan PHP'ye, yaban tipte bulunmayan, yeni bir PTE aktivitesinin kazandırılabilirdiği görülmüştür.

1.10. *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

G. caldoxylosilyticus TK4 suşu Çanakkale Kestanbol Kaplıcası'ndan elde edilen su örneklerinden izole edilmiştir ve 14283 kodlu numarayla National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria'da stoklanmıştır. Bakteri izolasyonu, zenginleştirme kültürleri yapılarak ve membran filtresinden geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Çanakkale Kestanbol Kaplıcası, Çanakkale ilinin Ezine ilçesinin sınırları içerisinde bulunup, bu ilçeye uzaklığı 10 km, Çanakkale'ye olan uzaklığı ise 50 km'dir. Kestanbol Kaplıcası'nın yerden çıkış sıcaklığı 71 °C'dir. İzolatın tür tayininin yapılabilmesi için çeşitli morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, genetiksel ve kemotaksonomik testler yapılmıştır. *G. caldoxylosilyticus* TK4 suşu için elde edilen sonuçlar Tablo 3'te verilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda termofilik izolatın basil morfolojisine sahip olduğu, spor oluşturabildiği ve katalaz enzimi üretebildiği gözlenmiştir (Dülger, 2003).

Tablo 3. *G. caldoxylosilyticus* TK4 suşunun bazı biyokimyasal özellikleri

Özellik	Sonuç	Özellik	Sonuç
Gram Boyama	+/-	Anaerobik Büyüme	-
Spor Boyama	+	Glukoz fermantasyonu	+
Katalaz Üretimi	+	Mannitol fermantasyonu	+
Jelatin Hidrolizi	+	Arabinoz fermantasyonu	+
Nişasta Hidrolizi	+	Ksiloz fermantasyonu	+
VP Testi	-	%2-5 NaCl'de büyüme	+
Sitrat Kullanımı	-	%7-10 NaCl'de büyüme	-
Propiyonat Kullanımı	+	30-37 °C'de Büyüme	-
İndol Testi	-	40-70 °C'de Büyüme	+

1.11. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Gelişen teknoloji ile birlikte birçok alanda enzimlere duyulan ilgi de artmaktadır. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile çok çeşitli endüstriyel kullanımları mümkündür. Klasik kimyasal yöntemler, spesifik olmaması, verimin düşük olması, yan ürünlerin fazla olması ve çevreye daha çok zararlı atık verilmesinden dolayı

çok fazla tercih edilmemektedir. Endüstriyel enzimler, kolay eldeleri ve reaksiyon ortamındaki kararlılıklarından dolayı, genellikle mikrobiyal kaynaklıdır.

Termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu ekstrem şartlarda daha kararlı olan proteinlerin varlığı ortaya konulmuştur. Mezofilik organizmalardan elde edilen proteinler yüksek sıcaklık, basınç, pH ve organik çözücüler mevcudiyetinde düşük kararlılığa sahiptir. Termofilik proteinler ise yüksek sıcaklıklarda kararlılık gösterebilmekte ve yüksek basınçlarda termal kararlılıkları devam etmektedir. Bu yüzden endüstriyel açıdan termofilik enzimler daha caziptirler.

PHP'nin varlığı çok az sayıda mikroorganizmada bildirilmiştir. Ayrıca, farklı organizmalardan PHP kodlayan genlerin klonlanması ve ekspres edilip ayrıntılı biyokimyasal karakterizasyonunun yapıldığı çalışmaların sayısı da yok denecek kadar azdır. *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin klonlanması, ekspresyon ürününün esteraz aktivitesine sahip, oldukça ısı ve pH kararlı bir enzim olduğu, laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar sonucu ortaya konulmuştur (Yıldırım vd., 2009). PHP'ler, hem zararlı böceklerle karşı etkili kimyasal ajanlar hem de savaş sinir ajanları olarak kullanılan OP'leri hidroliz edebilen PTE'lerle, aktif bölgelerinin yapısı ve üç boyutlu yapıları açısından benzerlik göstermektedir. Bu benzerlikten dolayı, TÜBİTAK (109T985) tarafından desteklenen bu çalışma ile, rekombinant *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin bölge spesifik mutasyonlar yapılarak, endüstriyel ve klinik açıdan oldukça önem taşıyan PTE aktivitesi kazanması, böylece elde edilen yeni mutant PHP'nin bilimin ve insanlığın hizmetine sunulması amaçlanmıştır. Biyokimyasal ve kinetik özellikleri incelenen yeni mutant enzimlerin amino asit sıraları protein veri bankalarında yayınlanacak ve diğer araştırmacıların da kullanımına sunulacaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Derin Dondurucu	Regal	RDD1280
DNA Elektroforezi	Owl Separation Systems	Easy Cast B1A
Güç Kaynağı	Thermo	EC 1000XL
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
Isıtıcı/Magnetik Karıştırıcı	HS31	Chiltren
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Mikrodalga Fırın	Regal	RMD-17
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
Otoklav	Tomy	SX-700E
PCR	Bio-Rad	MJ Mini Personal
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Protein Elektroforezi	Biorad	Mini PROTEAN-Tetra Sistem
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Sonikatör	Bandelin	Sonopuls HD3100
Steril Kabin	JSR	JSCB-1200SB
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert	WNB 7-45
Terazi	Ohaus	Pioneer
Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific	U410
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer

2.1.2. Enzimler

Çalışmada kullanılan enzimler Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Konsantrasyon
<i>DpnI</i>	Thermo Scientific	10 U/ μ l
Fast PCR Enzime Mix	Thermo Scientific	5 U/ μ l

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Kimyasal maddeler ve çözücüler	Fluka, Sigma-Aldrich, Merck
Plazmid DNA İzolasyon Kiti (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems)	Promega
PCR Ürünlerini Temizleme Kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System)	Promega
Protein Saflaştırma Kiti (MagneHis Protein Purification System)	Promega
DNA Standardı (10 kbç DNA Ladder)	Thermo Scientific
SDS-PAGE Standardı (Broad Range Protein Molecular Weight Markers)	Thermo Scientific

2.1.4. Primerler

Mutasyon çalışmalarında, polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) için kullanılan primerler Tablo7’de verilmiştir.

Tablo 7. PCR’da kullanılan primerler

Primer Adı	Baz Sırası	Sentezleyen Firma
M3F	5’-gtggcttagcagctatgtgaccaacattcaatcacatttactttctcgcgcg-3’	IDT
M3R	5’-gaatgttggtcacatagctgctaaagccacgcgttacatcgctagaaagcaag-3’	IDT
M4F	5’-gcctggaagataacgcgagcgcgagcgcgctgctggcattcgcagtgacatgagccgaatgaatcggtgc-3’	IDT
M4R	5’ctgcgaatgccagcagcgcgctcgcgctcgcgttatctccagcgcgataattctcttttctatcgtatctagcgcgatgtatacgcc-3’	IDT
M5F	5’-atcgcaaagcgcgctgctggatctttagtagaagattaaaag-3’	IDT
M5R	5’-gcagcgccttgcgatttttagacacgtatcggtattttttaac-3’	IDT

2.1.5. Kullanılan Suşlar

Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *Escherichia coli* (*E. coli*) suşları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan *E. coli* suşları

Tür	Suş	Kullanım Amacı
<i>E. coli</i>	DH5 α	Klonlama hücresi
<i>E. coli</i>	BL21(DE3)pLysS	Ekspresyon hücresi

2.1.6. Luria-Bertani Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması

- Luria-Bertani Besiyerinin (LB) Hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstreği ve 5,0 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH’sı 1 N NaOH ile titre edilerek 7,5’e ayarlandı. Çözeltinin hacmi 1000 mL’ye tamamlanarak 121 °C’de, 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi.

- Luria-Bertani Agar Besiyerinin (LB Agar) Hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstreği, 5,0 g NaCl ve 15 g agar yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH’sı 1 N NaOH ile 7,5’e ayarlandı. Hacmi 1000 mL’ye tamamlanan çözelti 121 °C’de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi.

2.1.7. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

2.1.7.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na_2CO_3): 0,4 g NaOH ve 2,0 g Na_2CO_3 saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry B Çözeltisi (%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi): 1,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
- Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- 0,1 N NaOH içinde %0,1 (w/v) SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

2.1.7.2. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

- EDTA Çözeltisi (0,5 M, pH 8,0): 18,61 g $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0'a ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Tris-Asetik Asit-EDTA Çözeltisi (50X TAE): 24,2 g Tris, 5,7 mL glasiyal asetik asit ve 10 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) çözeltisinin saf su ile iyice karıştırılıp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Jel Hazırlama ve Yürütme Tamponu (1X TAE): 20 mL 50X TAE çözeltisinin hacminin saf su ile 1000 mL'ye tamamlanması ile elde edildi.
- Etidiyum Bromür Çözeltisi (5 mg/mL): 50 mg etidiyum bromür saf suda çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

2.1.7.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris, 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 8,8'e ayarlanarak hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yiğma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris, 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 6,8'e ayarlanarak, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1,0 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- TEMED: Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrlamid/Bisakrlamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrlamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10,0 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptöetanol'ün karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1,0 g Coomassie Brilliant Blue R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

2.1.7.4. Tampon Çözeltiler

- A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 5,253 g sitrik asit monohidratın saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat): 8,9 g Na₂HPO₄·2H₂O'nun saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 3,0): 80,3 mL A çözeltisi ile 19,7 mL B çözeltisi karışımından 20,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 4,0): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karışımından 18,1 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karışımından 16,6 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 6,0): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karışımından 15,3 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,0): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karışımından 13,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,5): 8,3 mL A çözeltisi ile 91,7 mL B çözeltisi karışımından 13 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 7,5): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 7,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,5): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (100 mM, pH 7,4): 1,2 g Tris yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 7,4'e ayarlandı ve hacmi 100mL'ye tamamlandı.

2.1.7.5. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler

- Paraokson Çözeltisi (100 mM stok): 21,5 µL paraoksonun hacminin saf su ile 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Paratiyon Çözeltisi (20 mM stok): 5,8 mg paratiyon metanolde çözüldü ve hacmi 1 mL'ye tamamlandı.
- Malatiyon Çözeltisi (100 mM stok): 33,0 mg malatiyon aseton ile çözüldü ve hacmi 1 mL'ye tamamlandı.

- Ellman's Reaktifi: 4 mg 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)'in 1 mM EDTA içeren fosfat tamponunda (100 mM, pH 8,0) çözeltisiyle hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Butirat Çözeltisi (10 mM stok): 1,78 µL *p*-nitrofenil butiratin hacmi asetonitril ile 1 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Asetat Çözeltisi (10 mM stok): 1,8 µg *p*-nitrofenil asetatın asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Laurat Çözeltisi (10 mM stok): 3,2 µg *p*-nitrofenil lauratin asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Palmitat Çözeltisi (10 mM stok): 3,7 µg *p*-nitrofenil palmitatın asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi (%10): 10 g TCA'nın saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Sodyum Karbonat Çözeltisi (%10): 10 g Na₂CO₃'ün saf suda çözülüp hacminin 100mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

2.1.7.6. Diğer Çözeltiler

- Kanamisin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg kanamisin saf suda çözülüp, hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
- IPTG Çözeltisi (0,2 mg/mL): 2,0 g IPTG'nin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtre ile steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.
- Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,1 M): 1,47 g CaCl₂.2H₂O saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edilip 4 °C'de saklandı.
- Lisozim Çözeltisi (10 mg/mL): 10 mg lisozimin saf suyla çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

2.2. Mutasyon Çalışmaları

Geobacillus caldoxylosilyticus TK4 fosfotriesteraz homolog protein geninde (TK4PHP) hangi mutasyonların yapılabileceğine karar vermek amacıyla TK4PHP'sinin amino asit sırası, *Pseudomonas diminuta* fosfotriesterazı (PDPTE, bilinen en aktif organofosfat hidrolizleyen PTE'dir), *Mycobacterium tuberculosis* PHP'si (MTPHP) ve *Escherichia coli* PHP'sinin (ePHP) amino asit sıraları ile karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırma sonucunda belirlenen farklılıkları gidermeye yönelik mutasyonlar planlanmış ve uygulanmıştır.

2.2.1. PCR İçin Kalıp DNA'nın Elde Edilmesi

pET-28a(+) vektörüne klonlanmış olan yaban tip *G. caldoxylosilyticus* TK4PHP genini (Yildirim vd., 2009) içeren *E. coli* BL21(DE3)pLysS gliserol stok kültüründen, 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerine yayma ekim yapıldı. 37 °C'de büyütülen kolonilerden öze yardımıyla LB besiyerine ekim yapıldı ve çalkalayıcılı hava banyosunda 37 °C'de inkübe edilerek gece kültürü hazırlandı.

2.2.2. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu, plazmid DNA izolasyon kiti (Promega) kullanılarak gerçekleştirildi.

- 1-5 mL hazırlanan gece kültürü, 10.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Eppendorf tüp ters çevrilip, kâğıt bir havlu üzerine bastırılarak ortamda kalan fazla besiyerinin tamamen uzaklaşması sağlandı.

- Bakteri peltesinin üzerine 250 µL Hücre Süspansiyon Çözeltisi (Cell Resuspension Solution) ilave edildi ve pipetlenerek hücrelerin tamamen çözünmesi sağlandı.

- 250 µL Hücre Lizis Çözeltisi (Cell Lysis Solution) ilave edildikten sonra 4 kere altüst edildi. Hücre süspansiyonu 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

- 10 µL Alkali Proteaz Çözeltisi (Alkaline Protease Solution) ilave edildikten sonra 4 defa altüst edilip oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

- 350 μL Nötralizasyon Çözeltisi (Neutralization Solution) ilavesinden sonra hemen 4 kere altüst edildi.
- Elde edilen bakteriyal lizat 14.000 x g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant, toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan minikolon içine aktarılarak 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Minikolona 750 μL Kolon Yıkama Çözeltisi (Column Wash Solution) ilave edildi ve 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Minikolona 250 μL Kolon Yıkama Çözeltisi ilave edilerek 14.000 x g'de oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj edildi.
- Minikolon, temiz bir eppendorf tüpüne yerleştirildi ve minikolon içine 50 μL Nükleaz İçermeyen Su (Nuclease-Free Water) ilave edildi. 14.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilerek elde edilen plazmid DNA çözeltisi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

2.2.3. PCR ile Mutant Genlerin Çoğaltılması

TK4PHP plazmidleri ve ilgili mutasyon primerleri kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. PCR bileşenleri

Bileşen	Kullanılan Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	5 μL
İleri primer	2 μL
Geri primer	2 μL
Long PCR enzim karışımı	1 μL
10X Long PCR tamponu MgCl_2 ile birlikte	5 μL
Plazmid DNA	2 μL
Nükleaz içermeyen su	33 μL

2.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması için PCR ürünü temizleme kiti (Promega) kullanıldı.

- PCR ürününü içeren reaksiyon karışımına, aynı hacimde Membran Bağlanma Çözeltisi (Membrane Binding Solution) ilave edilip karıştırıldı ve elde edilen karışım toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan minikolon içine aktarıldı.

- Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi ve minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolona 700 µL Membran Yıkama Çözeltisi (Membrane Wash Solution) ilave edildi ve 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Yıkama işlemi, 500 µL yıkama çözeltisi kullanılarak tekrarlandı. 16.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.

- Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı ve yıkama çözeltisinden gelen etanolün tamamen uzaklaşması için 1 dakika daha santrifüj edildi.

- Minikolon, temiz bir eppendorf tüpüne alınıp minikolon içine 50 µL nükleaz içermeyen su ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Saf PCR ürünü 4 °C'de saklandı.

2.2.5. Kalıp DNA'nın Ortamdan Uzaklaştırılması

Yapılan PCR işleminde kullanılan kalıp DNA ilgili organizma tarafından metillenmiş durumda olup, sentezlenen yeni zincirler metillenmemiş durumdadır. Bu nedenle, kalıp olarak kullanılan yaban tip geni içeren vektörü ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, saflaştırılmış PCR ürünü *DpnI* enzimi kullanılarak kesildi (Tablo 10).

Tablo 10. *DpnI* enzimi ile kesim

Bileşen	Kullanılan Miktar
Saf PCR ürünü	10 µL
Tango buffer	2 µL
<i>DpnI</i>	2 µL
Nükleaz içermeyen su	6 µL

2.2.6. Mutant Vektörlerin Konakçı Hücreye Aktarılması

2.2.6.1. Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücreler kalsiyum klorür metoduna uygun olarak hazırlandı (Maniatis vd., 1982). Klonlama işlemleri için *E. coli* DH5 α suşundan, ekspresyon yapmak amacıyla ise *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşundan kompetent hücreler hazırlandı.

- 3 mL LB besiyerine, önceden LB agar besiyerinde büyütülmüş olan *E. coli* suşundan ekim yapıldı ve çalkalayıcı su banyosunda 37 °C’de inkübe edilerek gece kültürü hazırlandı.

- Hazırlanan gece kültüründen 30 mL LB besiyerine aşılama yapıldı ve 600 nm’deki optik yoğunluk değeri 0,4-0,6 arasına ulaşınca kadar yaklaşık 2 saat 37 °C’de büyütüldü.

- Bu değere ulaşan hücre kültürü, steril bir tüpe konularak 4 °C’de 4.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- Tüp içine 10 mL 0,1 M CaCl₂ ilave edildi ve hücre peltesi, yavaşça pipetlenerek süspansiyon haline getirildi.

- 30 dakika buz içinde bekletildikten sonra 4 °C’de 4.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- Pellet, 2 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltisinde süspansiyon edilerek 200 μ L’lik kısımlar halinde steril eppendorf tüplerine bölündü.

- Kompetent hücreler, 2 saat buzda bekletilerek transformasyona hazır hale getirildi.

2.2.6.2. Transformasyon

- Eppendorf tüp içinde bulunan kompetent hücrelere 3-5 μ L, saflaştırılmış PCR ürünlerinin *DpnI* enzimi ile uygun şartlar altında kesilmesiyle elde edilen mutant vektörler ilave edildi ve 30 dakika buz içinde bekletildi.

- 2 dakika 42 °C’de bekletmek suretiyle plazmidin hücre içine girmesi sağlandı.

- Buz içine alınan hücrelere 200 μ L LB besiyeri eklenerek 37 °C’de 1 saat bekletildi.

- Bu sürenin sonunda tüp içindeki süspansiyeye karışım, 50 µg/mL kanamisinli LB agar içeren, 45 µL IPTG sürülüp iyice kurutulmuş petrilere yayma ekim yapılarak ekildi ve 37 °C’de 1 gece bekletilerek plazmidi içeren hücrelerin büyümesi sağlandı.

2.2.7. Mutant Plazmidlerin Seçimi, İzolasyonu ve Sıra Analizi

Mutant plazmidleri içeren kolonilerden kanamisinli LB besiyerine ekim yapılarak 37 °C’de büyütüldü ve gece kültürleri hazırlandı. Hazırlanan gece kültürlerinden her bir mutasyon için plazmit izolasyonu yapıldı ve izole edilen plazmidler, ilgili mutasyonların gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla sıra analizi yapılmak üzere MacroGen Inc. (Güney Kore)’ye gönderildi.

2.2.8. DNA Sıralarının İncelenmesi

MacroGen Inc.’den gelen DNA sıraları öncelikle protein sırasına dönüştürüldü (URL-1) ve daha sonra BLAST programı (URL-2) yardımıyla incelendi.

2.2.9. Mutant Genlerin Ekspresyonu

Mutant genlerin *E. coli* BL21(DE3)pLysS konakçı hücresine transformasyonu sağlandı. Oluşan rekombinant plazmidleri içeren koloniler kanamisin içeren LB besiyerine ekilerek 37 °C’de büyütüldü. Hazırlanan gece kültürü %1 (v/v) olacak şekilde 50 µg/mL kanamisin içeren LB’ye aktarılarak OD₆₀₀=0,6–0,8 olana kadar büyütme işlemine devam edildi. İstenilen optik yoğunluk sağlandığında nihai konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilerek indüklendi ve 37 °C’de 3 saat inkübe edildi.

2.2.10. *E. coli* BL21(DE3)pLysS’de Ekspres Edilen Mutant Proteinlerin Saflaştırılması

İndükleme işleminin ardından hücreler, 4 °C’de 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı. Toplanan hücreler, 1 mL 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) tamponunda süspansiyeye edildi ve süspansiyona 0,5 mg/mL olacak şekilde lizozim ilave edildi. Hücreler

37 °C’de 30 dakika bekletildikten sonra, %80 şiddetinde, 1 devirde 5 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakılarak patlatıldı. Daha sonra 4 °C’de 10.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant, ham enzim özütü olarak kullanıldı. Ön saflaştırma amacıyla ham enzim özütü 70 °C’de 5 dakika bekletildi ve 4 °C’de 10.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek denatüre proteinler ortamdan uzaklaştırıldı.

Ekspres edilen protein, N ucunda 6 tane histidin birimi içerdiğinden dolayı, paramagnetik nikel parçacıkları içeren “MagneHis Protein Purification System (Promega)” kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre saflaştırıldı.

- 1 mL ham enzim özütüne, nikel bağlanmayı kolaylaştırmak amacıyla nihai konsantrasyonu 500 mM olacak şekilde NaCl ilave edildi ve karıştırıldı.

- Daha sonra 120 µL vortekslenmiş Ni ilave edilip, oda sıcaklığında 2 dakika alt üst edilerek karıştırıldı.

- Ni parçalarını tüpün kenarına toplamak için tüp manyetik tutucuya yerleştirildi ve 30 saniye bekletildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

- Manyetik tutucudan alınan eppendorf tüp içine 1000 µL Bağlanma/Yıkama tamponu (Binding/Wash Buffer) ilave edildi. 2 dakika boyunca alt üst edilerek Ni parçalarının yıkanması sağlandı ve tüp 30 saniye manyetik tutucuda tutulduktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

- Yıkama işlemi 750 µL Bağlanma/Yıkama tamponu kullanılarak iki defa daha tekrarlandı.

- Ni parçaları üzerine 250 µL elüsyon tamponu (Elution Buffer) ilave edildi ve tüp oda sıcaklığında 2 dakika alt üst edildikten sonra manyetik tutucuya yerleştirildi ve 30 saniye bekletildikten sonra saf enzim dikkatlice pipetlenerek alındı ve 4 °C’de saklandı.

2.3. Enzimin Karakterizasyonu Çalışmaları

2.3.1. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Tayini gerçekleştirmek için aşağıdaki basamaklar takip edildi.

- Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL ilave edildi.
- Diğer bir deney tüpüne saflaştırılmış enzim çözeltisinden 5 µL ilave edildi.
- Standartlara ve örneğe son hacimler 500 µL olacak şekilde 0,1 N NaOH içerisinde hazırlanan %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.
- Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi ilave edilip vortekslendi. Sonrasında oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
- Standartlara ve örneğe saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifinden 100 µL ilave edildi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- 650 nm'de absorbanslar okundu ve kalibrasyon grafiği çizilerek saf enzimdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

2.3.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, %12'lik ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli kullanılarak Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre gerçekleştirildi.

Tablo 11'de belirtildiği şekilde hazırlanan jeller, cam plakalar arasına döküldü. Standart proteinler ve örnekler, içerisinde 30 µg protein olacak şekilde SDS-PAGE yürütme boyasıyla ve diğer bileşenlerle karıştırıldı ve 95 °C'de 5 dakika bekletilip, Hamilton şırıngası yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Jelde oluşan boya, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 15 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Elektrofrez işlemi sona erdikten sonra, jel sistemden dikkatlice alınarak, yaklaşık 1 saat boyunca boyama çözeltisi içerisinde bekletildi. Protein bantlarının görünür hale getirilebilmesi için jel, boyama uzaklaştırma çözeltisiyle 2-3 saat çalkalandı.

Tablo 11. SDS-PAGE'nin bileşenleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (%5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (%12, pH 8,8)
Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,5 mL	--
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	--	2,5 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL	4,0 mL
dd H ₂ O	2,74 mL	3,3 mL
%10 APS	0,04 mL	0,1 mL
%10 SDS	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

2.3.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi genel fosfotriesteraz (PTE) ve genel esteraz substratları varlığında aşağıda ifade edildiği şekilde incelenmiştir.

2.3.3.1. Genel PTE Substratları ile Aktivite Tayini

PTE aktivitesi, 1 mM paraoksonun enzim tarafından dietilfosfat ve *p*-nitrofenole hidrolizlenmesi sonucu 400 nm'de meydana gelen absorbanstaki artış takip edilerek belirlenmektedir (Dumas vd., 1989). Bir küvet içinde 970 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH8,0), 10 µL paraokson (100 mM stok) ve 20 µL saf enzim karıştırılarak 400 nm'de 5 dakika süreyle absorbanstaki artış takip edildi. 1 ünite (U) enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µM *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

Paratiyon substratı varlığında PTE aktivitesi bazı değişikliklerle birlikte Chu ve arkadaşları (2006) tarafından kullanılan yöntemle belirlenmiştir. 100 µL paratiyon (20 mM stok), 870 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,0), 10 µL metanol ve 20 µL saf enzim 50 °C'de 10 dakika bekletildi. Reaksiyon 1 mL %10'luk TCA ilave edilerek durduruldu. Renk oluşumunu görebilmek için 1 mL %10'luk Na₂CO₃ ilave edildi ve 410 nm'de absorbans okundu. 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µM *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

Malatyon ile PTE aktivitesi, hidroliz sırasında açığa çıkan tiyol gruplarının miktarının Ellman's reaktifi kullanılarak kantitatif olarak ölçülmesi ile belirlendi (Irene vd., 2002). 10 µL malatyon (100 mM stok), 470 µL Tris-HCl tamponu (100 mM, pH 7,4) ve 20 µL safenzim 50 °C'de 20 dakika bekletildi. 2250 µL 1 mM EDTA içeren fosfat tamponu (100 mM, pH8,0) ve 50 µL Ellman's reaktifi ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi ve 412 nm'de absorbans okundu. 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µM *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

2.3.3.2. Genel Esteraz Substratları ile Aktivite Tayini

p-Nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NNP) substratları kullanılarak esteraz aktivitesi tayinleri gerçekleştirildi (Lee vd., 1999). Bunun için 10 mM'lık stok substrat çözeltileri kullanılarak 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) karışımları hazırlandı. Daha sonra 2490 µL karışım, 10 µL saf enzim ile 50 °C'de 15 dakika bekletildi. Tüpler buz içine alınarak reaksiyon durduruldu ve 405 nm'de absorbans okundu. 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µM *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

2.3.4. Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

Esteraz aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla 10 mM'lık stok *p*NPA çözeltileri kullanılarak farklı pH'larda tampon çözeltilerle 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon karışımları hazırlandı. Bunun için 50 mM konsantrasyonda hazırlanan McIlvaine (pH 3,0-7,5) ve Tris-HCl (7,5-9,0) tamponları kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan karışımların 2495 µL'si, ayrı ayrı 5 µL saf enzim ile 50 °C'de 15 dakika bekletildi. Tüpler buz içine alınarak reaksiyon durduruldu ve 405 nm'de absorbans okundu (Yildirim vd., 2009).

2.3.5. Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Esteraz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 10 mM'lık stok *p*NPA çözeltisi ve 50 mM Tris-HCl tamponu (optimum pH değerlerinde) kullanılarak 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon karışımı hazırlandı. Bu karışımdan alınan 2495 µL'lik kısımlar ayrı ayrı 5 µL saf enzim ile 10 °C'lik artışlarla birlikte 10-90 °C arasındaki sıcaklıklarda 15 dakika bekletildi. Daha sonra yukarıda belirtildiği şekilde aktivite tayin edildi ve optimum sıcaklıklar belirlendi (Ertunga vd., 2009).

2.3.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla 10 mM'lık stok *p*NPA çözeltisi ve 50 mM Tris-HCl tamponu (optimum pH değerlerinde) kullanılarak 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon karışımı hazırlandı. Bu karışımdan alınan 2495 µL'lik kısımlar, reaksiyon karışımında ayrı ayrı 1-100 µg/mL arasındaki değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde seyreltilmiş olan 5 µL'lik enzim çözeltileriyle optimum sıcaklıklarda 15 dakika bekletildi ve aktivite tayin edildi. Elde edilen sonuçlar incelenerek optimum enzim konsantrasyonları belirlendi (Faiz vd., 2007).

2.3.7. Bazı Kinetik Parametrelerin İncelenmesi

Her bir mutant enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla optimum pH değerlerinde, 5-800 µM son konsantrasyonda *p*NPA substratı içeren etanol:tampon karışımları hazırlandı. Bu karışımlar kullanılarak sabit protein konsantrasyonunda ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Çolak vd., 2009).

2.3.8. Enzimlerin pH Kararlılıklarının İncelenmesi

TK4PHP ve mutant enzimlerinin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 50 mM Mcilvaine (pH 3,0-7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0 ve 9,0) tamponları ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C'de 1, 2 ve 7 gün boyunca inkübe edildikten

sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bakılarak bu değerler %100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Yildirim vd., 2009).

2.3.9. Enzimlerin Isıl Kararlılıklarının İncelenmesi

TK4PHP ve mutant enzimlerin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'lerdeki su banyolarında ayrı ayrı 3, 5 ve 7 gün boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda enzim çözeltisi buz içine alınarak 5 dakika bekletildi ve buzdan çıkartılıp oda sıcaklığına kadar ısınması beklendi. Daha sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı (Yildirim vd., 2009).

2.3.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Her bir enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Cu^{2+} , iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Reaksiyon karışımlarına nihai konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde her bir metal iyonundan ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Ayna vd., 2013).

2.3.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi

Esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisini incelemek amacı ile, reaksiyon karışımlarına nihai konsantrasyonları %10 ve %30 olacak şekilde metanol, etanol, izopropanol, asetonitril, aseton ve DMSO ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Çözücü içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip %kalan aktiviteler hesaplandı (Yildirim vd., 2009).

3. BULGULAR

3.1. Mutant Primerlerin Tasarlanması

Geobacillus caldxylosilyticus TK4 PHP (TK4PHP) geninde hangi mutasyonların yapılabileceğine karar vermek amacıyla TK4PHP'sinin amino asit sırası, *Pseudomonas diminuta* fosfotriesterazı (PDPTE), *Mycobacterium tuberculosis* PHP'si (MTPHP) ve *Escherichia coli* PHP'sinin (ePHP) amino asit sıraları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 9). Yapılan karşılaştırma sonucunda, metal ligasyonunda görev alan birimlerin korunduğu, ancak birinci, yedinci ve sekizinci β/α birimlerini örten 3 aktif bölge lobunun (lop 1, lop 7, lop 8) ePHP'de olduğu gibi TK4PHP'de de PDPTE'den daha kısa olduğu görülmüştür (Buchbinder vd., 1998; Afriat vd., 2006). Bu bilgiler ışığında, önceki birçok çalışmada olduğu gibi TK4PHP'ye PTE aktivitesi kazandırmak için bu loplardaki eksikliklerin giderilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (Buning vd., 2000; Fillion vd., 2004; Hawwa vd., 2009).

PTE ile PHP'ler arasındaki en büyük farklılıklardan birisinin, substrat bağlanma birimleri olan Phe306 ve Tyr 309'u içeren lop 8'de olduğu görülmektedir. Bu nedenle, ilk olarak lop 8'de, PTE'lerden 9 amino asit kısa olan bu farklılığı giderecek bir mutasyon yapılması planlanmıştır. M3F (5'-gtggcttagcagctatgtgaccaacattcaatcacatttactttctcgcggcg-3') ve M3R (5'-gaatggtggtcacatagctgctaaagccacgcgttacatcctagaaagcaag-3') primerleri bu amaçla tasarlanmıştır ve ticari bir firmaya sentezletirilmiştir.

İlk mutasyondan sonra lop 7'de PTE'lerden 14 amino asit kısa olan farklılığı giderecek bir mutasyon yapılması planlanmıştır ve bu amaçla M2F (5'-gcctggaagataacgcgagcgcgctgctggcattcgcagtgacatgagccgaatgaaatcgttgc-3') ve M2R (5'-ctctgcgaatgccagcagcgcgctcgcgctcgcgttatcttccagcgataattctctttctatcgtatctagcgcgatgat acg cc-3') primerleri tasarlanmıştır ve ticari bir firmaya sentezletirilmiştir.

Son olarak TK4PHP geninin lop 1'deki 4 amino asitlik eksikliği tamamlayan bir mutasyon planlanmıştır ve bu amaçla M5F (5'-atcgcaaagcgcgctgctggatctttagtagaagatttaaaag-3') ve M5R (5'-gcagcgccttgcgatttttagacacgtatcggatttttttaac-3') primerleri tasarlanıp sentezletirilmiştir. İlgili primerler kullanılarak yapılan PCR çalışmaları sonrasında istenilen mutasyonların gerçekleştiği gözlenmiştir.

PDPTE	MQTRRVVLKSAAAAGTLLGGLAGCASVAGSIGTGDRINTVRGPITISEAGFTLT	HEHIC	59
MTPHP	-----MPELNTARGPIDTADLGVTL	HEHVF	26
TK4PHP	-----MYIQTVLGRIQPEELGVCAC	HEHLY	25
ePHP	-----MSFDPTGYTLA	HEHLH	16
		* *	
	Lop 1		
PDPTE	GSSAGFLRAWPEFFGSRKALAEKAVRGLRRARAAGVRTIVDVSTFDI	GRDVSLLAEVSRA	119
MTPHP	IMTTEIAQNYPEAWGDEDKRVAGAIARLGEKARGVDTIIVDLTVIGL	GRYIPRIARVAAA	86
TK4PHP	IDLSRVKKNNTDTCLQN----LDLVVEDLKVFLQYGGKAIIVEMTNDGM	GRNVKKLVEISKL	81
ePHP	IDLSGFKNVDCRLDQ----YAFICQEMNDLMTGRVNRNVIEMTNRYM	GRNAQFMLDVMRE	72
PDPTE	ADVHIVAATGLWFDPPPLSMRLR-----SVEELTQFFLREIQY	GIEDTGIRAGI	169
MTPHP	TELNIIVVATGLYTYNDVPFYFHYLGPGAQLDGPEIMTDMFVRD	IEHGIADTGKAGILK	145
TK4PHP	LDLHI IASTGCYKDPFIPQEKIN-----WDRDEFKWMIDE	ENGIDGTNIKPGVIGE	134
ePHP	TGINVVACTGYQDAFFPEHVAT-----RSVQELAQEMVDE	TEQIDGTELKAGIIAE	125
PDPTE	VATTG-KATPFQELVLKAAARASLATGVVPT	THTAASQRDGEQ	228
MTPHP	CATDEPGLTPGVERVLRVAQAHKRTGAPIS	THTHAGLRRGLDQ	205
TK4PHP	IGSSFNEFKPVELELFYGAIEAAKT	TKLPLSTHTTLG-TLAL	193
ePHP	IGTSEGKITPLEEKVFIAAALAHNQ	TGRPISHTSFS-TMGLE	184
		*	
	Lop 7		
PDPTE	GHSDDTDDLSYLTALAARCYLIGLD	HIPHSALIGLEDNASASALLGIR	288
MTPHP	GHCGDSTDVGYLEELIAAGSYLGM	DRFGVDVIS-----PFQDRNIVARMC	251
TK4PHP	GHQDLNEDDEVVLEVLSSVYIALD	TIGKENYR-----SDMSRMKSLLYFL	239
ePHP	GHCDLKDNLNIDKMLDLCAYVQFD	TIGKNSYY-----PDEKRIAMLHALR	230
		*	
	Lop 8		
PDPTE	DQGYMKQILVSNDWLFGFSSYVTNIMDVM	DRVNPDMGMAFIPLRV	348
MTPHP	ERGHADKMVLSHDA	CCYFDALPEELVPVAMPN--WHYLHIHNDV	309
TK4PHP	ERGEDQILLSSDVTR-----QSHLLSRGGQ	YSVVLKRFIPALREMGVLETTIEK	290
ePHP	DRGLLNVRMLSM	ITR-----RSHLKANGGYGYDYLLTTF	281
		*	
PDPTE	ITVTN	PARFLSPTLRAS	365
MTPHP	MLVDN	PERRIFERQGGYQ	326
TK4PHP	LLVKNE	QKAFSIRKEG-	306
ePHP	MLREN	PSQFFQ-----	292

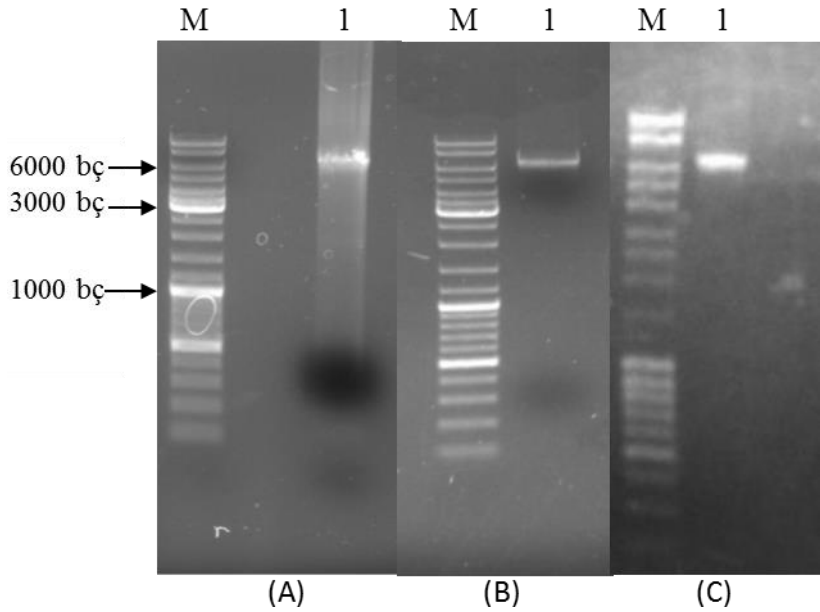
Şekil 9. *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinin amino asit sırasının, *P. diminuta* PTE'si, *M. tuberculosis* PHP'si ve *E. coli* PHP'sinin amino asit sıraları ile karşılaştırılması. Yeşil renk ile boyalı amino asitler tüm sıralardaki korunmuş birimleri, sarı renk ile boyalı aminoasitler PTE'de 169.pozisyonda bulunan Lys biriminin PHP'lerde bir kaymış pozisyonda olarak Glu ile yer değiştirmiş biçimde bulunduğu amino asitleri, yıldız (*) ile gösterilen birimler ise binükleer metal merkezi oluşturan amino asitleri göstermektedir. PHP ve PTE'lerde farklı uzunlukta olan birinci, yedinci ve sekizinci loplara ise mavi renk ile gösterilmiştir

3.2. PCR ile Mutant Genlerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Transformasyonu

pET-28a(+) vektörüne klonlanmış olan yaban tip TK4PHP genini içeren *E. coli* BL21(DE3)pLysS gliserol stok kültüründen, 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar

besiyerine ekim yapıldı ve hücreler 37 °C’de büyütülerek elde edilen gece kültüründen kit yardımıyla DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu şekilde elde edilen plazmidler, PCR işlemi için kalıp DNA olarak kullanıldı.

Birinci mutasyon sonucu elde edilen TK4PHPM3 geni ikinci mutasyon için, ikinci mutasyon sonucu elde edilen TK4PHPM3-M4 geni ise üçüncü mutasyon için kalıp DNA olarak kullanıldı. Tasarlanan primerler ve belirlenen şartlar altında gerçekleştirilen PCR sonucunda beklenen ve istenilen büyüklükte bantların varlığı gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. (A) M3F ve M3R, (B) M4F ve M4R İLE (C) M5F ve M5R primerleri kullanılarak yapılan PCR’lar sonucunda elde edilen ürünlerin %1’lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. 1: PCR ile çoğaltılan mutant gen, M: 10 kbç DNA standardı

PCR sonucu elde edilen ürünler, PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldı. Kalıp olarak kullanılan vektörü ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, saflaştırılmış PCR ürünü, *DpnI* enzimi ile uygun şartlar altında kesildi. Mutant vektör, $CaCl_2$ transformasyon metodu ile *E. coli* DH5 α konakçı hücresine aktarıldı. Kanamisin ihtiva eden LB agar besiyerine ekilerek, büyütülen kolonilerden plazmid izolasyonu yapıldı ve izole edilen plazmidler, ilgili mutasyonların olup olmadığını araştırmak için sıra analizi yapılmak üzere MacroGen Inc.(Güney Kore)’ye gönderildi. DNA ve ekspres edilen proteinlerin amino asit sıralarının incelenmesi ile sırasıyla yapılan 3 mutasyon sonucunda TK4PHP’de PTE’lerin aktif

bölgeyi örten lopları olan birinci, yedinci ve sekizinci loplardaki, 3, 14 ve 9 amino asitlik farklılıklar giderilmiş oldu (Şekil 11).

TK4PHPM3-M4-M5	MYIQTVLGRIQPEELGVCACHEHLYIDLSRVKKNDDTCLQN	RKAL	LDLVVEDLKVFLQYG	60
TK4PHPM3-M4	MYIQTVLGRIQPEELGVCACHEHLYIDLSRVKKNDDTCLQN----		LDLVVEDLKVFLQYG	56
TK4PHP	MYIQTVLGRIQPEELGVCACHEHLYIDLSRVKKNDDTCLQN----		LDLVVEDLKVFLQYG	56
TK4PHPM3	MYIQTVLGRIQPEELGVCACHEHLYIDLSRVKKNDDTCLQN----		LDLVVEDLKVFLQYG	56
	*****		*****	
TK4PHPM3-M4-M5	GKAIVEMTNDGMGRNVKLLVEISKLLDLHIIASTGCKYKDFPIPQEKINWDRDEFKWMID			120
TK4PHPM3-M4	GKAIVEMTNDGMGRNVKLLVEISKLLDLHIIASTGCKYKDFPIPQEKINWDRDEFKWMID			116
TK4PHP	GKAIVEMTNDGMGRNVKLLVEISKLLDLHIIASTGCKYKDFPIPQEKINWDRDEFKWMID			116
TK4PHPM3	GKAIVEMTNDGMGRNVKLLVEISKLLDLHIIASTGCKYKDFPIPQEKINWDRDEFKWMID			116

TK4PHPM3-M4-M5	EIENGIDGTNIKPGVIGEIGSSFNEFKPVELELFYGAIEAAKTTKPLSTHTTLGLTLE			180
TK4PHPM3-M4	EIENGIDGTNIKPGVIGEIGSSFNEFKPVELELFYGAIEAAKTTKPLSTHTTLGLTLE			176
TK4PHP	EIENGIDGTNIKPGVIGEIGSSFNEFKPVELELFYGAIEAAKTTKPLSTHTTLGLTLE			176
TK4PHPM3	EIENGIDGTNIKPGVIGEIGSSFNEFKPVELELFYGAIEAAKTTKPLSTHTTLGLTLE			176

TK4PHPM3-M4-M5	QVELFIRENPLPHQVVIGHQDLNEDDEVVLEVLSSGVYIALDTIGKENY	RLEDNASASAL		240
TK4PHPM3-M4	QVELFIRENPLPHQVVIGHQDLNEDDEVVLEVLSSGVYIALDTIGKENY	RLEDNASASAL		236
TK4PHP	QVELFIRENPLPHQVVIGHQDLNEDDEVVLEVLSSGVYIALDTIGKENY-----			225
TK4PHPM3	QVELFIRENPLPHQVVIGHQDLNEDDEVVLEVLSSGVYIALDTIGKENY-----			225

TK4PHPM3-M4-M5	LGRSDMSRMKSLLYFLERGYEDQILLSSDVTR	GFSSYVTNI	QSHLLSRGGQGYSVVLRK	300
TK4PHPM3-M4	LGRSDMSRMKSLLYFLERGYEDQILLSSDVTR	GFSSYVTNI	QSHLLSRGGQGYSVVLRK	296
TK4PHP	---RSDMSRMKSLLYFLERGYEDQILLSSDVTR-----		QSHLLSRGGQGYSVVLRK	273
TK4PHPM3	---RSDMSRMKSLLYFLERGYEDQILLSSDVTR	GFSSYVTNI	QSHLLSRGGQGYSVVLRK	282
	*****		*****	
TK4PHPM3-M4-M5	FIPALREMGVLETTIEKLLVKNPQRAFSIRKEG-			333
TK4PHPM3-M4	FIPALREMGVLETTIEKLLVKNPQRAFSIRKEG-			329
TK4PHP	FIPALREMGVLETTIEKLLVKNPQRAFSIRKEG-			306
TK4PHPM3	FIPALREMGVLETTIEKLLVKNPQRAFSIRKEG-			315

Şekil 11. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 proteinlerinin amino asit sıralarının karşılaştırılması. Mutasyonla TK4PHP'nin Lop 8'ine ilave edilen 9 amino asit yeşil renkle, TK4PHPM3'ün Lop 7'sine ilave edilen 14 amino asit sarı renkle, TK4PHPM3-M4'ün Lop 1'ine ilave edilen 4 amino asit ise mavi ile gösterilmiştir

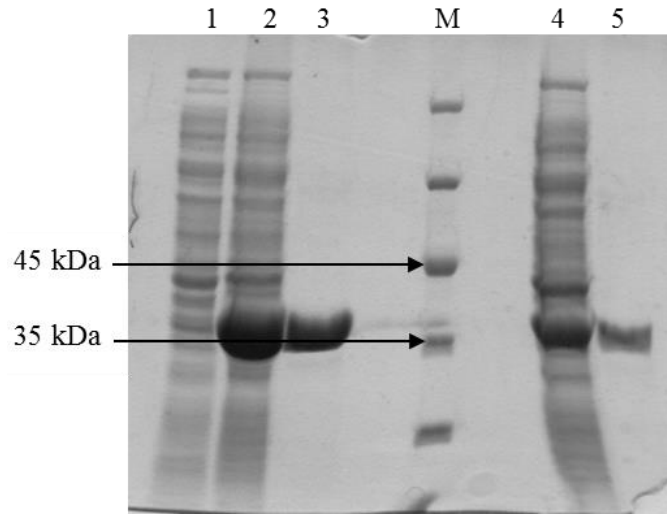
3.3. Mutant Genlerin Ekspresyonu ve Proteinlerin Saflaştırılması

Mutant genler (TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5) *E. coli* BL21(DE3)pLysS konakçı hücrelerine aktarıldı ve indükleme işleminin ardından ekspres edilen mutant proteinler, N ucunda 6 tane histidin birimi içerdiğinden dolayı, paramagnetik nikel parçacıkları içeren "Magne His Protein Purification System (Promega)" kullanılarak saflaştırıldı.

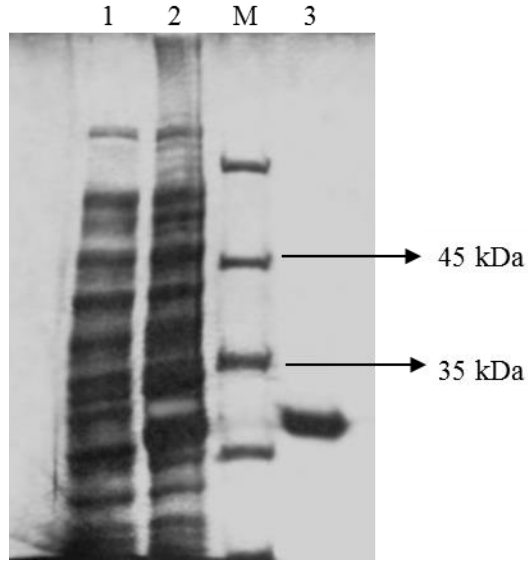
3.4. Mutant Enzimlerin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.4.1. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

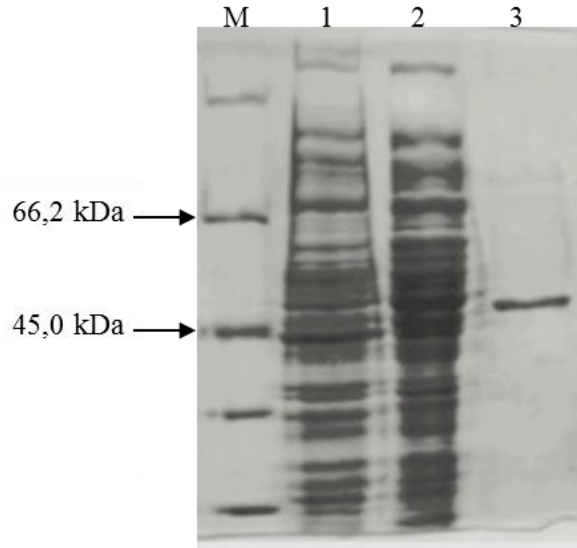
Protein ekspresyonu ve saflaştırma işlemlerinin doğruluğu SDS- PAGE ile tespit edildi. Bu amaçla yaklaşık 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez yapıldı ve elektroforez jeli Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyandı. Fazla boyanın uzaklaştırılmasıyla proteinlerin ekspresyonunun ve saflaştırılma işleminin etkili bir biçimde yapıldığı ortaya konuldu (Şekil 12-14).



Şekil 12. %12'lik SDS-PAGE elektroforezi. M: Moleküler ağırlık standartları, 1:İndüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 2:PHP genini içeren IPTG ile 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 3:Saf TK4PHP, 4:Mutant TK4PHPM3 genini içeren IPTG ile 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 5:Saf TK4PHPM3



Şekil 13. %12'lik SDS-PAGE elektroforezi. M:Moleküler ağırlık standartları, 1:İndüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 2:Mutant TK4PHPM3-M4 genini içeren IPTG ile 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 3:Saf TK4PHPM3-M4



Şekil 14. %12'lik SDS-PAGE elektroforezi. M:Moleküler ağırlık standartları, 1:İndüklenmemiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 2:Mutant TK4PHPM3-M4-M5 genini içeren IPTG ile 3 saat indüklenmiş rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 3: Saf TK4PHPM3-M4-M5

3.4.2. Enzim Aktivitesi Tayini

3.4.2.1. Genel PTE Substratları ile Aktivite Tayini

TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in PTE aktivitesine sahip olup olmadığını belirlemek için öncelikle genel PTE substratları olan paraokson, paratyon ve malatyon kullanılarak 2.3.3.'de belirtildiği gibi aktivite tayinleri gerçekleştirildi, ancak herhangi bir aktivite gözlenemedi.

3.4.2.2. Genel Esteraz Substratları ile Aktivite Tayini

PTE substratları varlığında herhangi bir aktivite gözlenemeyince, mutant enzimlerin sahip olduğu esteraz aktivitesinde nasıl bir değişimin meydana geldiğini belirlemek amacıyla *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) substratları ile aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, PTE'ye benzetilmek üzere PHP'deki tüm eksikliklerin giderildiği TK4PHPM3-M4-M5 için en yüksek aktivite TK4PHP'de olduğu gibi *p*NPA substratı varlığında görüldü. Ayrıca, TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktivitesinin, *p*NPA ve *p*NPB varlığında, TK4PHP ile karşılaştırıldığında dikkate değer bir oranda değişmediği belirlendi.

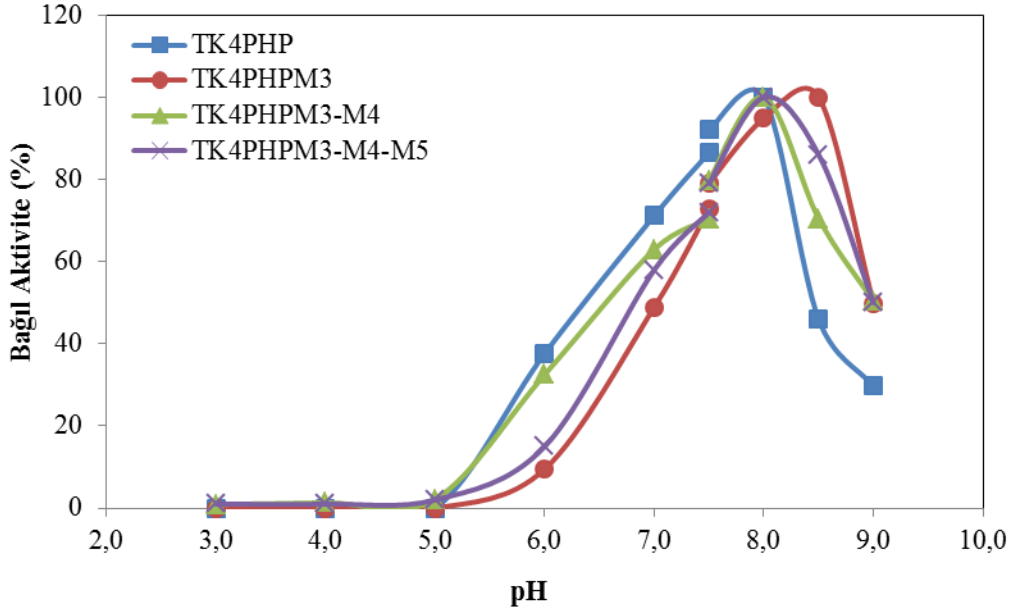
Tablo 12. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in çeşitli substratlar varlığında esteraz aktivitesi

Substrat	Spesifik aktivite (U/mg protein)			
	TK4PHP	TK4PHPM3	TK4PHPM3-M4	TK4PHPM3-M4-M5
<i>p</i> NPA	0,423	0,616	0,453	0,468
<i>p</i> NPB	0,423	0,597	0,418	0,427
<i>p</i> NPL	0,004	0,005	0,014	0,012
<i>p</i> NPP	0	0	0,003	0,003

Ancak TK4PHP'nin lop 8'indeki eksikliği gidermek için yapılan ilk mutasyonla oluşturulan TK4PHPM3'ün *pNPA* ve *pNPB* substratları varlığında aktivitesinde yaklaşık %50 artış gözlemlendi (Tablo 12).

3.4.3. Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5' in esteraz aktivitesinin optimum pH değerlerini belirleyebilmek amacıyla farklı pH değerlerindeki tamponlar kullanılarak enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri kullanılarak pH-%Bağıl Aktivite grafiği çizildi (Şekil 15).

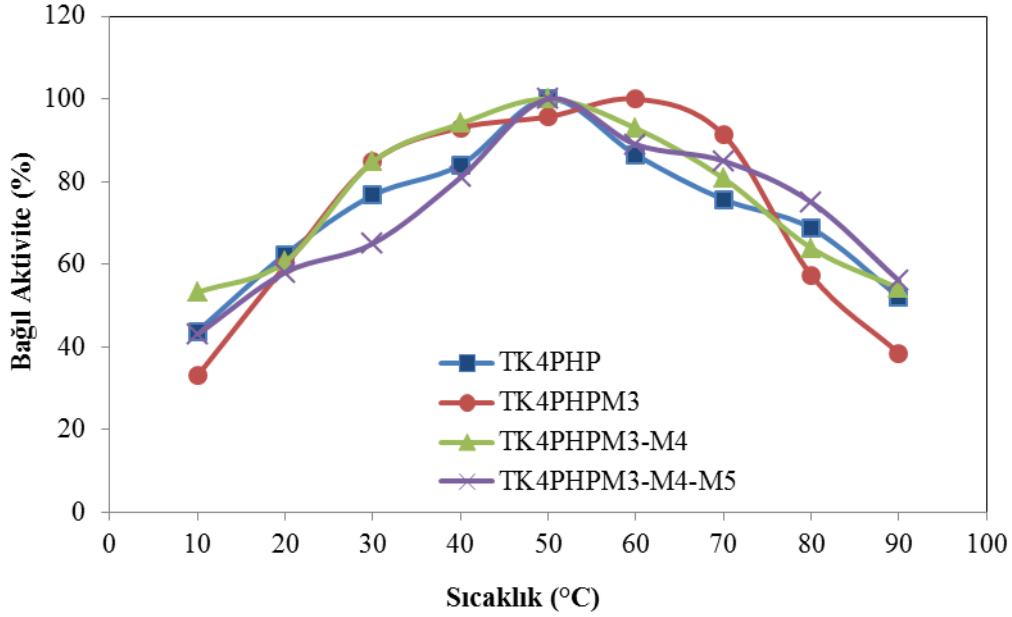


Şekil 15. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 'in esteraz aktivite üzerine pH'nın etkisi

Elde edilen pH-%Bağıl Aktivite grafiğinden rekombinant TK4PHP'de 8,0 olan optimum pH'nın mutant TK4PHPM3'de 8,5'e kaydığı görüldü. TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 mutant enzimlerinde ise optimum pH değerinin, TK4PHP'deki gibi yine 8,0 olduğu tespit edildi.

3.4.4. Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 aktivitesinin optimum sıcaklık değerleri, 10 °C'lik artışlarla 10-90 °C arasında aktivite tayinleri yapılarak belirlendi (Şekil 16).



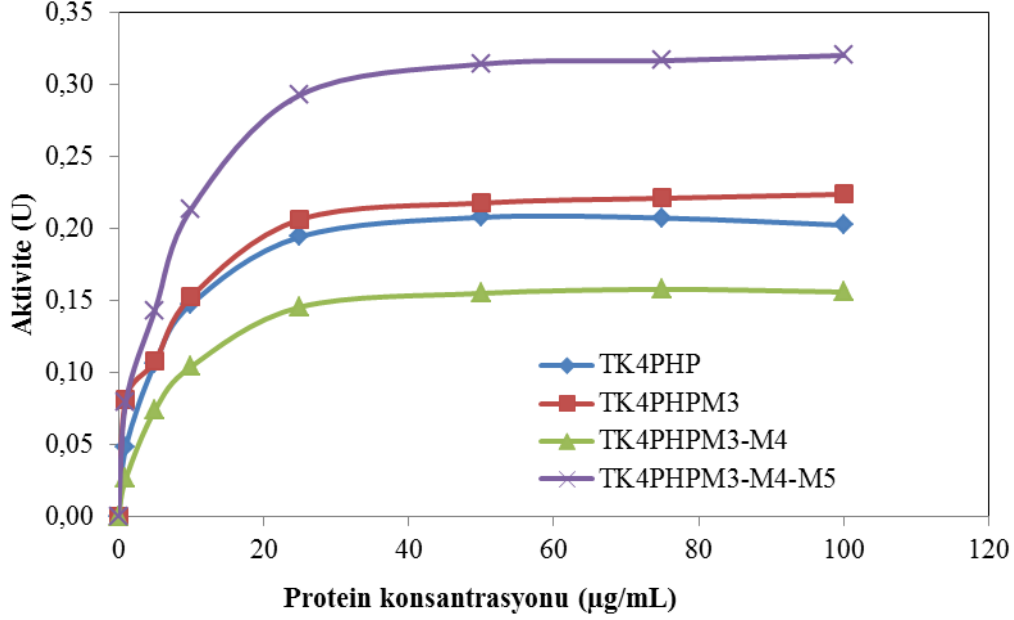
Şekil 16. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in esterez aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi

Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildiğinde rekombinant TK4PHP enzimi için 50 °C olan optimum sıcaklığın TK4PHPM3 için 60 °C olduğu tespit edildi. TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 mutant enzimlerinde ise optimum sıcaklık değerinin, TK4PHP'de olduğu gibi yine 50 °C olduğu belirlendi.

3.4.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimlerin esterez aktivitelerinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla reaksiyon karışımında, ayrı ayrı 1-100 µg/mL arasındaki değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı ve protein konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 17'den de görüldüğü gibi

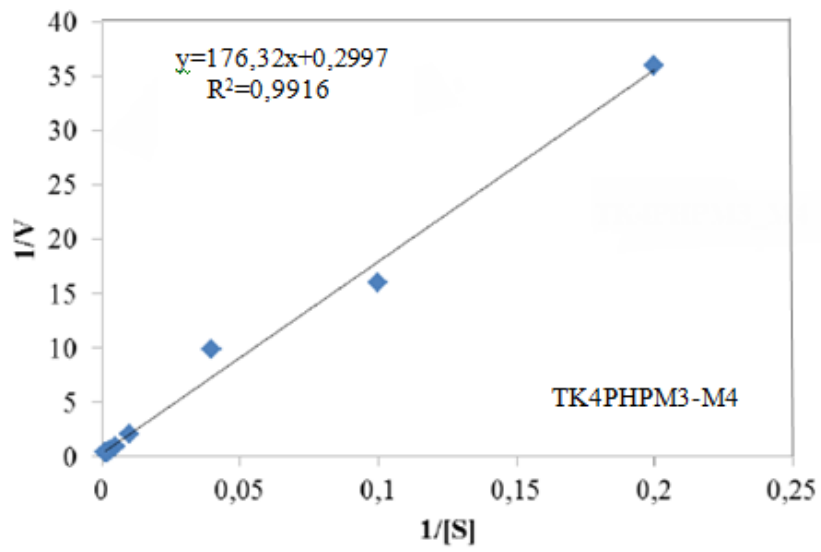
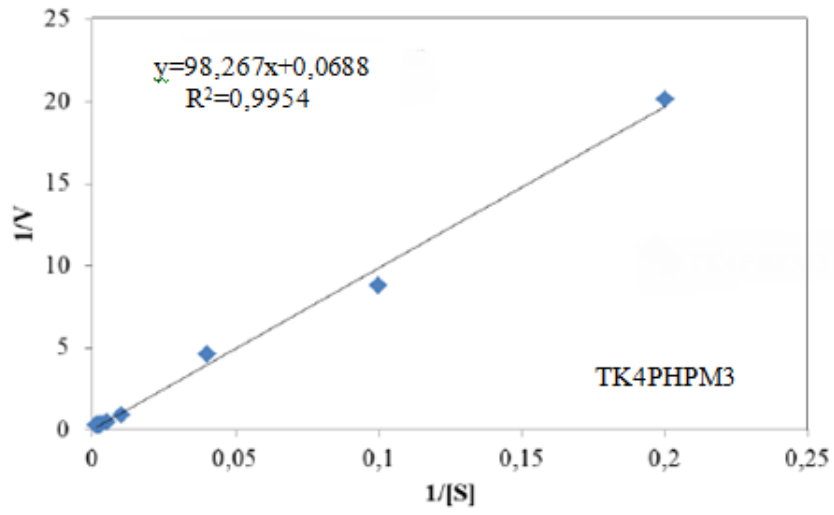
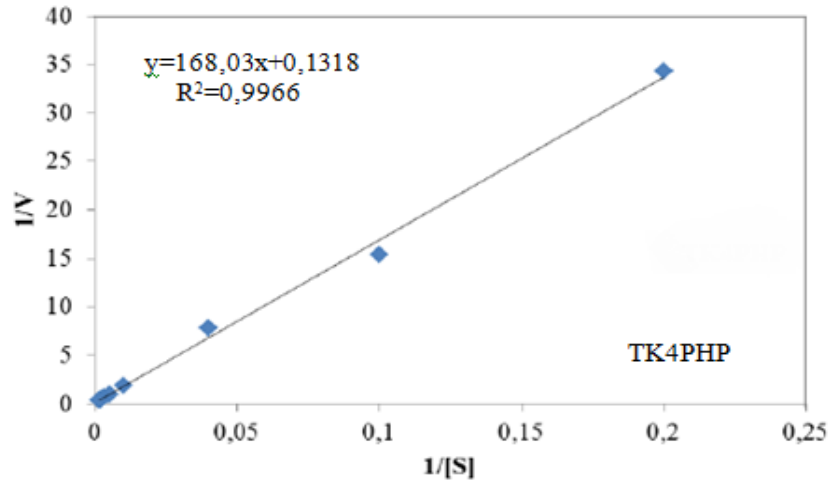
rekombinant TK4PHP ve TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4,TK4PHPM3-M4-M5 mutant enzimleri için optimum protein konsantrasyonu 25 µg/mL olarak belirlendi.



Şekil 17. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktiviteleri üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

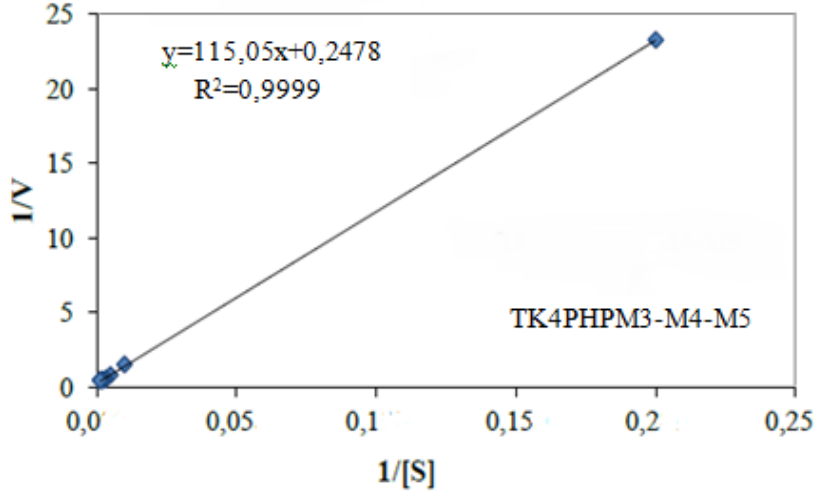
3.4.6. Bazı Kinetik Parametrelerin İncelenmesi

Rekombinanat ve mutant PHP enzimleri için K_m ve V_{max} değerlerini belirleyebilmek amacıyla 5-800 µM son konsantrasyonda *p*NPA içeren etanol:tampon karışımları hazırlanarak, sabit protein konsantrasyonunda ve optimum şartlar altında gerçekleştirilen aktivite tayinleri sonrasında Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 18). Bu grafikler kullanılarak rekombinant TK4PHP ve diğer mutant enzimler için hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri Tablo 13'te gösterilmiştir. Buna göre yapılan mutasyonlara bağlı olarak hem K_m hem de V_{max} değeri TK4PHPM3'te artmış ancak diğer mutant enzimlerde azalmıştır.



Şekil 18. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 için Lineweaver-Burk grafikleri

Şekil 18'in devamı

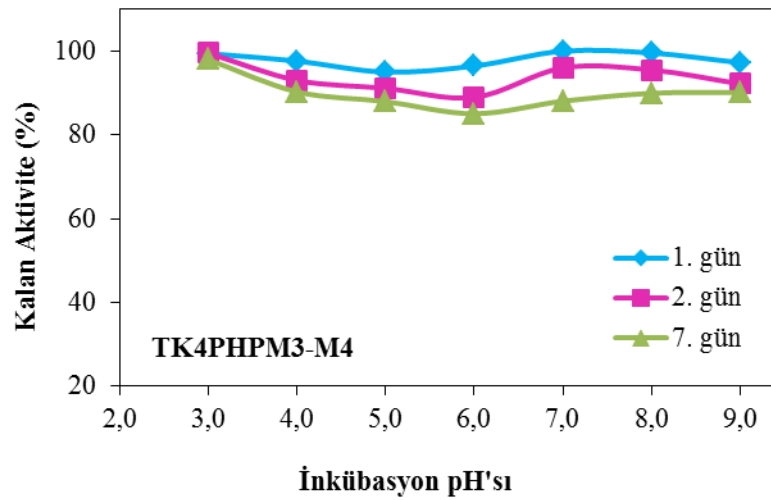
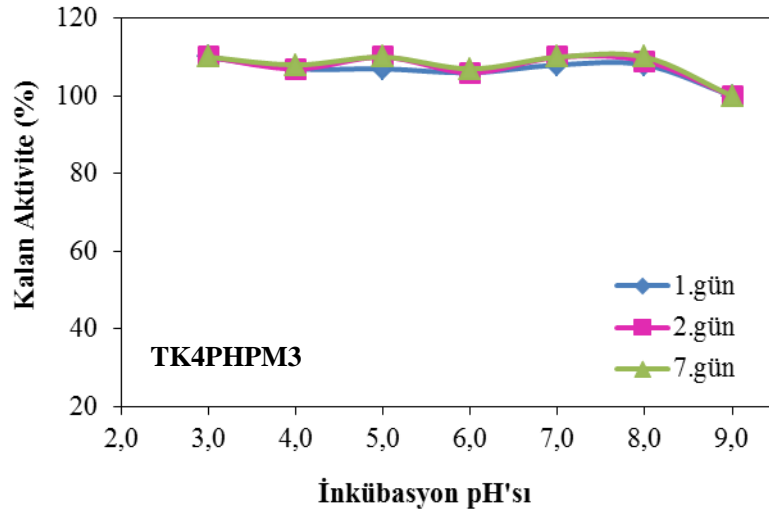
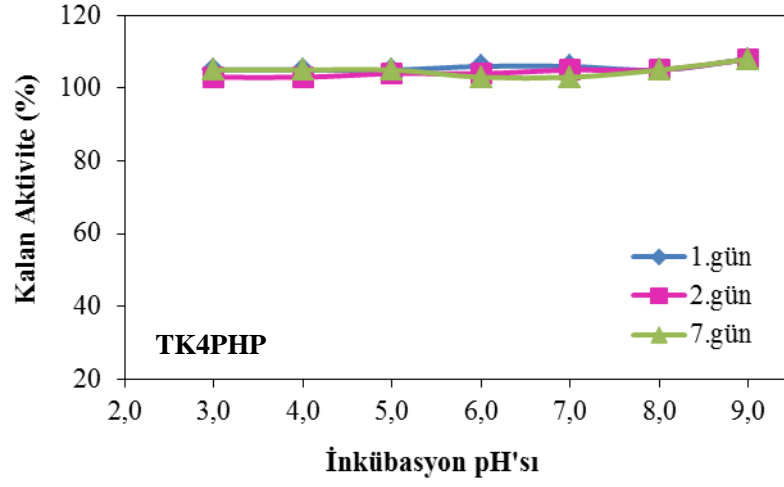


Tablo 13. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'e ait kinetik değerler

	TK4PHP	TK4PHPM3	TK4PHPM3-M4	TK4PHPM3-M4-M5
K_m (mM)	1,27	1,43	0,59	0,46
V_{max} (U/mg protein)	7,59	14,53	3,34	4,04

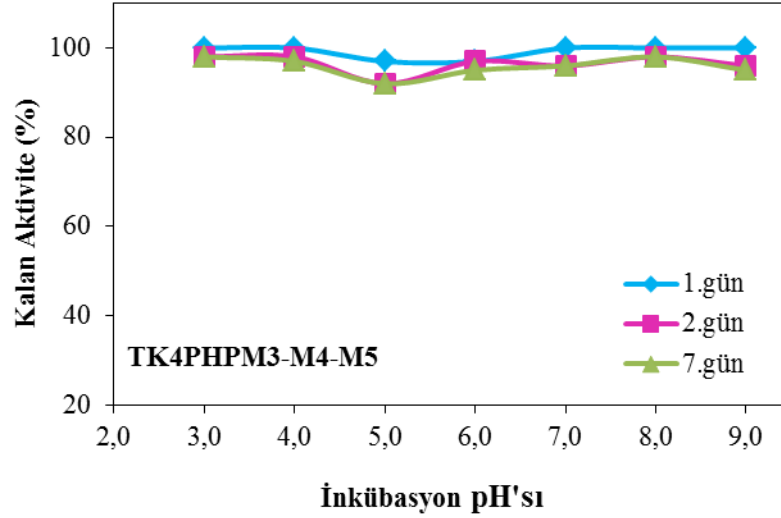
3.4.7. Enzimlerin pH Kararlılıklarının İncelenmesi

Rekombinant ve mutant enzimlerin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim çözeltileri 2.3.8.'de belirtildiği gibi pH 3,0-9,0 tamponları içerisinde, 4 °C'de 1, 2 ve 7 gün boyunca inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim:tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bakılarak bu değerler %100 olarak kabul edildi ve bu değerlerden faydalanarak inkübe edilen enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı. Daha sonra inkübasyon pH'sına karşı %kalan aktiviteler grafiğe geçirildi (Şekil 18).



Şekil 19. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 için pH kararlılıklarının incelenmesi

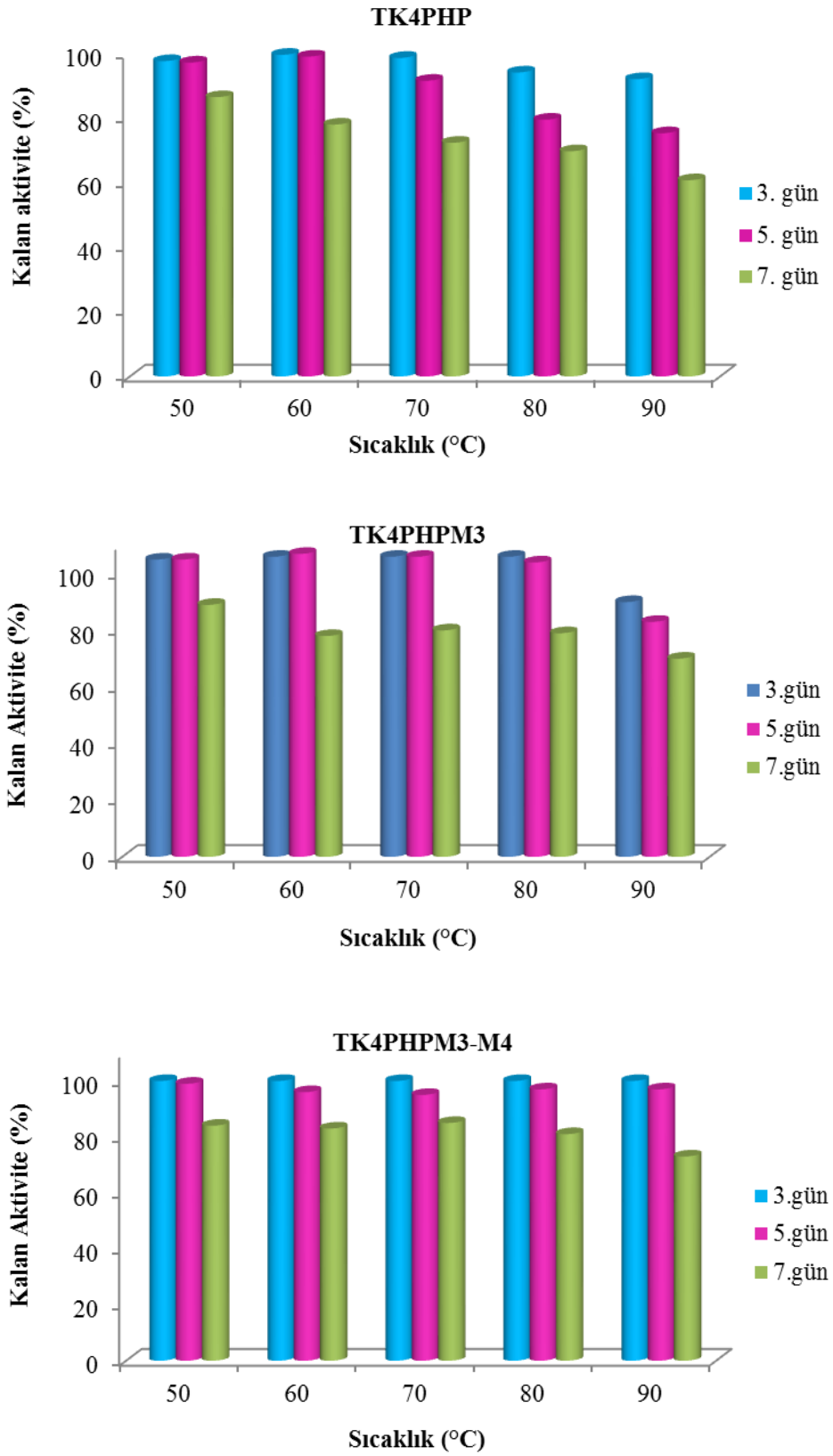
Şekil 19'un devamı



Şekil 19'dan da görüldüğü gibi 4 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda TK4PHPM3'ün pH kararlılığı %10 civarında bir artış göstermektedir. Yapılan ikinci mutasyon sonucu elde edilen TK4PHPM3-M4'ün pH kararlığında yaklaşık %10-15 oranında bir azalma olsa da TK4PHPM3-M4-M5'in 7 gün sonunda aktivitesinin tamamına yakınına koruduğu tespit edilmiştir.

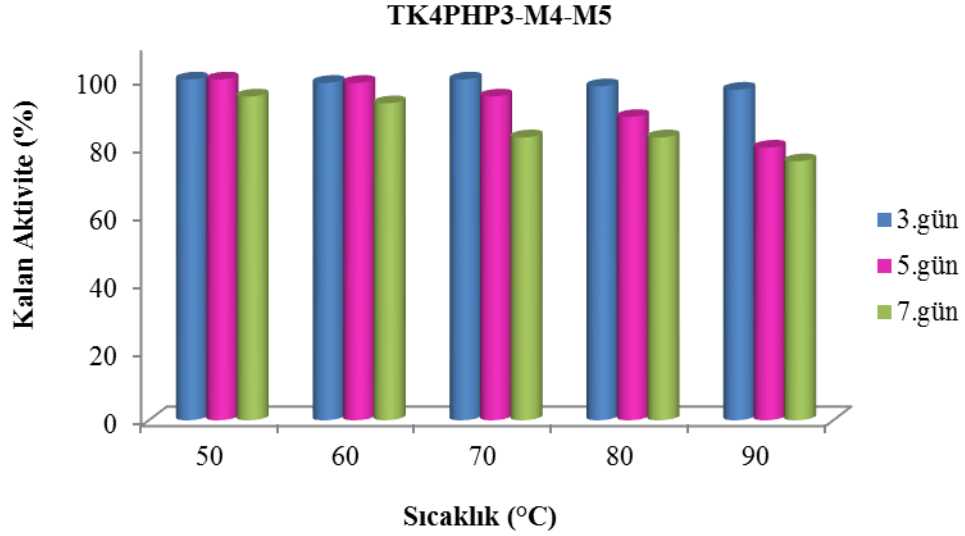
3.4.8. Enzimlerin Isıl Kararlılıklarının İncelenmesi

TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in ısı kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim çözeltileri 2.3.9.'da belirtildiği gibi inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile hiç muamele edilmemiş enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, inkübasyona maruz bırakılan enzimlerin %kalan aktiviteleri hesaplandı ve grafiğe geçirildi. Şekil 20'den de görüldüğü gibi TK4PHP'ye mutasyon yapılması ile elde edilen TK4PHPM3'te orijinal enzimle karşılaştırıldığında ısı kararlılık açısından çok fazla bir değişim olmamıştır. TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in ise rekombinant enzimle karşılaştırıldığında ısı kararlılık açısından 7. günün sonunda aktivitelerini daha iyi koruduğu görülmüştür.



Şekil 20. TK4PHP, TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 için ısıl kararlılıkların incelenmesi

Şekil 20'nin devamı



3.4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Enzimlerin esteraz aktiviteleri üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip metal iyonu ilavesi durumunda %kalan aktiviteler hesaplandı (Tablo 14-17).

Tablo 14 ve 15 incelendiğinde ilk mutasyon sonucunda TK4PHPM3 esteraz aktivitesinde, Ca^{2+} ve Co^{2+} varlığında önemli bir değişiklik olmadığı görülmektedir. TK4PHP 1 mM ve 5 mM Cu^{2+} varlığında sırasıyla %13 ve %100 inhibe olurken, aynı şartlar altında TK4PHPM3, %7 ve %53 inhibe olmaktadır. Diğer metal iyonları varlığında ise TK4PHPM3'te aktiviteler TK4PHP'ye göre az da olsa düşmektedir. TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktivitelerinde ise TK4PHP'e göre önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Tablo 14. TK4PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal iyonu	Kalan aktivite (%)	
	1 mM nihai konsantrasyon	5 mM nihai konsantrasyon
Yok	100	100
Na ⁺	98	88
Li ⁺	98	99
Mg ²⁺	98	96
Mn ²⁺	97	99
Zn ²⁺	97	102
Ca ²⁺	98	99
Co ²⁺	98	95
Cu ²⁺	87	0

Tablo 15. TK4PHPM3'ün esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal iyonu	Kalan aktivite (%)	
	1 mM nihai konsantrasyon	5 mM nihai konsantrasyon
Yok	100	100
Na ⁺	90	92
Li ⁺	82	85
Mg ²⁺	92	91
Mn ²⁺	90	81
Zn ²⁺	87	90
Ca ²⁺	96	98
Co ²⁺	94	97
Cu ²⁺	93	47

Tablo 16. TK4PHPM3-M4'ün esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal iyonu	Kalan aktivite (%)	
	1 mM nihai konsantrasyon	5 mM nihai konsantrasyon
Yok	100	100
Na ⁺	92	93
Li ⁺	92	93
Mg ²⁺	93	96
Mn ²⁺	92	95
Zn ²⁺	91	96
Ca ²⁺	100	97
Co ²⁺	95	101
Cu ²⁺	100	101

Tablo 17. TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Metal iyonu	Kalan aktivite (%)	
	1 mM nihai konsantrasyon	5 mM nihai konsantrasyon
Yok	100	100
Na ⁺	92	78
Li ⁺	94	90
Mg ²⁺	98	92
Mn ²⁺	99	98
Zn ²⁺	99	98
Ca ²⁺	98	95
Co ²⁺	96	95
Cu ²⁺	72	31

3.4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi

Aktiviteler üzerine bazı organik çözücülerin etkisini incelemek amacı ile, reaksiyon karışımlarına nihai konsantrasyonları %10 ve %30 olacak şekilde metanol, etanol, izopropanol, asetonitril, aseton ve DMSO ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Çözücü içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip %kalan aktiviteler hesaplandı (Tablo 18-21).

Tablo 19'dan da görüldüğü gibi %10 nihai konsantrasyonda özellikle asetonitril ve aseton varlığında TK4PHPM3 mutant enzimin aktivitesinde orijinal enzime göre azalmalar meydana gelmiştir. %30 nihai konsantrasyonda ise metanol ve DMSO hariç diğer çözücüler durumunda TK4PHPM3, TK4PHP'den daha yüksek aktivitelere sahip olmuştur. TK4PHPM3-M4 durumunda önemli bir değişim gözlenmezken, TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktivitesinde %30 nihai konsantrasyonda, asetonitril ve DMSO varlığında TK4PHPM3'e kıyasla artış tespit edilmiştir.

Tablo 18. TK4PHP'nin esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

Organik çözücü	Kalan aktivite (%)	
	%10 nihai konsantrasyon	%30 nihai konsantrasyon
Yok	100	100
Metanol	101	84
Etanol	101	59
İzopropanol	101	47
Asetonitril	100	25
Aseton	100	39
DMSO	100	85

Tablo 19. TK4PHPM3'ün esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

Organik çözücü	Kalan aktivite (%)	
	% 10 nihai konsantrasyon	% 30 nihai konsantrasyon
Yok	100	100
Metanol	101	72
Etanol	102	80
İzopropanol	96	86
Asetonitril	93	57
Aseton	81	76
DMSO	100	65

Tablo 20. TK4PHPM3-M4'ün esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

Organik çözücü	Kalan aktivite (%)	
	% 10 nihai konsantrasyon	% 30 nihai konsantrasyon
Yok	100	100
Metanol	99	94
Etanol	99	62
İzopropanol	99	52
Asetonitril	99	25
Aseton	99	49
DMSO	99	71

Tablo 21. TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

Organik çözücü	Kalan aktivite (%)	
	% 10 nihai konsantrasyon	% 30 nihai konsantrasyon
Yok	100	100
Metanol	100	80
Etanol	99	85
İzopropanol	98	89
Asetonitril	95	71
Aseton	90	78
DMSO	100	81

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yüksek optimum sıcaklık ve pH değerleri ile organik çözücülerdeki kararlılıklarından dolayı termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler birçok biyoteknolojik uygulama alanına sahiptirler (Herbert,1992; Schmid ve Verger, 1998). Ayrıca son yıllarda yapılan mutasyon çalışmalarıyla birlikte enzimlere, organik çözücülere karşı, ekstrem sıcaklıklar ve pH'lar gibi farklı şartlar altında kararlılık ve performans kazandırabilmek veya enzimlerin, substrat özgünlüklerini değiştirebilmek amacıyla, yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesini sağlamak mümkün hale gelmiştir (Tao ve Cornish, 2002). Tez kapsamında çalışılan fosfotriesteraz homolog proteini (PHP)'nin varlığı çok az sayıda mikroorganizmada bildirilmiştir. Ayrıca, farklı organizmalardan PHP kodlayan genlerin klonlanması ve ekspres edilip ayrıntılı biyokimyasal karakterizasyonunun yapıldığı çalışmaların sayısı da yok denecek kadar azdır.

Yapılan bu çalışmada, pET-28a(+) vektörüne klonlanmış olan *Geobacillus caldxylosilyticus* (*G. caldxylosilyticus*) TK4 PHP geni üzerinde bölge spesifik mutasyonlar yapılmış, elde edilen mutant genler uygun bir konakçı hücrede ekspres edilmiş, mutant proteinler, protein saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmış ve enzimler biyokimyasal olarak ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiştir.

Literatür bilgileri değerlendirildiğinde PHP'lerin, PTE'lere aktif bölge ve üç boyutlu yapı açısından oldukça fazla benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ancak, birinci, yedinci ve sekizinci β/α birimlerini örten 3 aktif bölge lopu (lop 1, lop 7, lop 8) *E. coli* PHP'sinde olduğu gibi TK4PHP'de de PTE'den daha kısadır (Buchbinder vd., 1998; Afriat vd., 2006; Yıldırım vd., 2009). Bu veriler göz önüne alındığında ilk olarak, substrat bağlanma birimleri olan Phe306 ve Tyr309'u içeren lop 8'deki 9 amino asitlik söz konusu kısalığı giderecek bir mutasyon yapıldı. Elde edilen mutant enzim (TK4PHPM3) biyokimyasal olarak karakterize edildiğinde herhangi bir PTE aktivitesine sahip olmadığı görüldü ve bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda diğer eksikliklerin görüldüğü lop 7 ve lop 1'deki farklılıkları giderecek mutasyonlar gerçekleştirildi. Bu mutasyonlar sonucunda da sırasıyla TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 mutant enzimleri elde edildi. Saf mutant proteinler kullanılarak yapılan aktivite tayini çalışmalarında, öncelikle mutant enzimlerin PTE aktivitesine sahip olup olmadığını belirlemek için genel PTE substratları olan

paraokson, paratyon ve malatyon kullanıldı ancak herhangi bir aktivite elde edilemedi. Buradan mutant enzimlerin PTE substratlarını hidrolizleme yeteneğine sahip olmadıkları sonucuna varıldı. *Deinococcus radiodurans* ekstremofilinden klonlanan organofosfat parçalayan bir enzimin, düşük PTE aktivitesini artırmak için lop 7 ve lop 8'deki farklılıklar giderilmiş, aktivitede herhangi bir iyileşme elde edilememiştir. Eksik olan bütün loplara tamamlandığında ise çözünür olmayan bir protein üretilmiştir ve bu nedenle enzimin aktivitesi tayin edilememiştir (Xiang vd., 2009). Bunun yanında, ePHP'de, Thr210Ala ve Thr245Ala mutasyonları ile yabancıtıpe bulunmayan fakat çok düşük bir paraoksonaz aktivitesi elde edilmiştir. Thr210Ala mutasyonu aktif bölgeyi oluşturan lop 7'de meydana gelirken, Thr245Ala mutasyonu ise lop 8 üzerinde bulunmaktadır (Roodveldt ve Tawfik, 2005).

PTE substratları varlığında aktivite elde edilemediğinden, rekombinant TK4PHP enziminin sahip olduğu esteraz aktivitesinde nasıl bir değişimin meydana geldiğini belirleyebilmek amacıyla *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) substratları ile esteraz aktivitesi tayinleri gerçekleştirildi. Saflaştırılan mutant enzimlerde, esteraz aktivitesi en fazla *p*NPA ve *p*NPB varlığında gözlenmiş olup, ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları *p*NPA substratı varlığında gerçekleştirilmiştir (Tablo 12). *Bacillus subtilis*DR8806, *Pelagibacterium halotolerans* B2^T ve *Mycobacterium tuberculosis* esterazlarının da en yüksek aktiviteye *p*NPA varlığında sahip oldukları belirtilmiştir (Asoodeh ve Ghanbari, 2012; Wei vd., 2013; Chen vd., 2014).

Rekombinant TK4PHP ve mutant TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in aktivitesinin *p*NPA substratı kullanılarak pH'ya bağımlılığı incelendiğinde optimum pH değerlerinin TK4PHP, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5 için 8,0, TK4PHPM3 için ise 8,5 olduğu gözlemlendi (Şekil 14). pH 8,0-8,5 arasındaki optimum pH değerleri birçok esteraz için benzerdir. Örneğin, *p*NPA varlığında *Brevibacterium sp.* R312 esteraz 4a'sı (Lambrechts vd.,1995) ve *p*NPB varlığında ısıl kararlı *Geobacillus thermodenitrificans* T2 esterazı (Yang vd.,2012) için optimum pH değeri 8,0 olarak belirlenirken, bir tavuk hücresi esterazında optimum aktivite pH 8,5'de görülmüştür (Fendri vd., 2012). *Geobacillus thermoleovorans* YN'den klonlanan rekombinant EstB ve EstC için de optimum pH sırasıyla 8,0-9,0 olarak tespit edilmiştir (Soliman ve Gaballa, 2013). Ayrıca *Bacillus cereus* AGP-03 esterazının da *p*NPB varlığında optimum pH'sı 8,5 olarak belirtilmiştir (Ghati ve Paul, 2014).

TK4PHP, TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in optimum sıcaklık değerleri *p*NPA varlığında 50 °C olarak tespit edildi ve 80 °C'ye kadar aktivitelerinin %60'tan fazlasını korudukları görüldü. Lop 8'deki farklılığın giderilmesi ile elde edilen mutant TK4PHPM3'ün optimum sıcaklığı, TK4PHP enzime oranla 10 °C arttı ve 60 °C olarak tespit edildi. Ayrıca enzimin, 50 ve 70 °C'lerde optimum aktivitesinin yaklaşık %90'ına sahip olduğu belirlendi (Şekil 15). *Picrophilus torridus*'dan klonlanan EstB ve *Bacillus cereus* AGP-03 esterazlarının optimum sıcaklığının 55 °C (Hess vd.,2008; Ghati ve Paul, 2015), *Pyrococcus furiosus*, *G. thermodenitrificans* T2 ve *Thermomyces lanuginosus* esterazlarının ise 60 °C (Almeidavd., 2006; Yang vd., 2012; Li vd, 2014) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Aspergillus fumigatus*'den klonlanan bir esteraz üzerinde yapılan Ala134Thr-Val160Thr bölge spesifik mutasyonları ile optimum sıcaklığın, rekombinant enzime göre 5 °C artarak 45 °C olduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2014).

Rekombinant ve mutant PHP'lerin esteraz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi 0,1 mM *p*NPA varlığında incelendiğinde, optimum protein konsantrasyonlarının 25 µg/mL olduğu ve bu konsantrasyonun üzerinde protein kullanıldığında aktivitede herhangi bir değişim olmadığı görüldü (Şekil 16). Literatürde PHP'lerin veya PHP mutantlarının esteraz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

PHP'lerin esteraz aktivitesinin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenebilmesi için, sabit protein konsantrasyonunda ve farklı substrat (*p*NPA substratı için) konsantrasyonlarında aktivite tayinleri yapıldı. Lineweaver-Burk eğrisinden (Şekil 17) K_m ve V_{max} değerleri sırası ile TK4PHP için 1,27 mM ve 7,59 U/mg protein, TK4PHPM3 için 1,43 mM ve 14,53 U/mg protein, TK4PHPM3-M4 için 0,59 mM ve 3,34 U/mg protein, TK4PHPM3-M4-M5 için ise 0,46mM ve 4,04 U/mg protein olarak hesaplandı (Tablo 13). Buna göre yapılan ilk mutasyonla birlikte enzimin V_{max} değeri, yaban tip enzime göre yaklaşık 2 kat artarken, yapılan son mutasyon sonucunda K_m değerinde yaklaşık 2,8 katlık bir azalma meydana getirmiştir. Aynı substrat varlığında, K_m değerleri, *G. thermoleovorans* YN, *B. subtilis* DR8806, *B. megaterium* ve *S. solfataricus* P1 esterazları için sırasıyla 6,74; 4,2; 317,5 ve 24,0 mM olarak bildirilmiştir (Soliman vd., 2007; Asoodeh ve Ghanbari, 2012; Zheng vd. 2015; Nam vd. 2013).

Biyoteknolojik açıdan önemli substratlar üzerinde etki eden birçok endüstriyel enzimin K_m değerinin 0,01 mM ile 100 mM arasında olduğu bildirilmiştir (Fullbrook, 1996). Bu nedenle, *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sinde bölge spesifik mutasyonlar

yapılarak elde edilen mutant enzimlerin bu yönüyle diğer esterazlar gibi endüstriyel alanlarda kullanılabileceği görülmektedir.

Rekombinant ve mutant PHP'lerin pH kararlılığı, saf enzimler, farklı pH'lardaki tamponlar içinde 4 °C'de 1, 2 ve 7 gün boyunca inkübasyona bırakılarak incelendi. Bunun sonucunda TK4PHPM3-M4 mutantı hariç diğer enzimlerin aktivitelerini %90'dan fazla koruduğu (Şekil 18), hatta TK4PHPM3 aktivitesinde, bütün pH'larda yaklaşık %10 oranında bir artış gösterdiği belirlendi. TK4PHPM3-M4 durumunda ise pH kararlılığında yaklaşık %10-15 oranında bir azalma tespit edildi. Dolayısıyla mutant TK4PHP'lerin geniş bir pH aralığında oldukça kararlı olduğu söylenebilir. Aydın'ın Alangüllü Kaplıcası'ndan izole edilen termofilik bir bakteri olan *Bacillus* sp. 4'den elde edilip, kısmen saflaştırılan esterazın oda sıcaklığında farklı pH'lardaki tamponlarda bekletildiğinde, pH 4,0, 6,0, 8,0 ve 10,0'da 10 saat inkübasyon sonunda aktivitesini sırasıyla %82, %98, %84 ve %45 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Aynı enzim, pH 6,0'da 24 ve 30 saat bekletildiğinde aktivitede hızlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Ateşlier ve Metin, 2006). Bununla birlikte *Rhodococcus* sp. LKE-028'den saflaştırılan bir esterazın aktivitesinin pH 6,0-11,0 aralığında %50'sinden fazlasını koruduğu bildirilmiştir (Kumar vd., 2012). Ayrıca *Pseudomonas mandelii*'den izole edilen bir esterazın Trp208Tyr mutasyonu ile 40 °C'deki ısı kararlılığının 13 kat ve mutant *Aspergillus fumigatus* esterazının ise 45 °C'de 30 dakika inkübasyon sonrası kararlılığının %20-40 arası arttığı tespit edilmiştir (Boyineni vd., 2014; Zhang vd., 2014).

G. caldxylosilyticus TK4 PHP'sinin ve TK4PHPM3, TK4PHPM3-M4, TK4PHPM3-M4-M5 mutant enzimlerinin ısı kararlılığı incelendiğinde, 50-90 °C arasındaki sıcaklıklarda inkübe edilen enzimin aktivitelerinde 3 gün sonunda neredeyse hiç değişme olmadığı görüldü. 5 gün sonunda, 90 °C'de enzim aktivitelerinde yaklaşık %20'lik bir azalma olduğu, 7 gün sonunda ise TK4PHPM3-M4 ve TK4PHPM3-M4-M5'in orijinal enzimle karşılaştırıldığında ısı kararlılık açısından aktivitelerini daha iyi koruduğu tespit edildi (Şekil 13). Dolayısıyla TK4PHP'de yapılan mutasyonların enzimin esteraz aktivitesinin ısı kararlılığı üzerinde oldukça olumlu sonuçlar doğurduğu söylenebilir. *P. furiosus* esterazı, 75 °C'de 2 saat bekletildiğinde aktivitesinin neredeyse tamamını korumakta, 100 °C'de ise aktivitesini hemen kaybetmektedir (Almeida vd., 2006). *Bacillus* sp. esterazı 65 °C'de 10 saat inkübe edildiğinde aktivitesini %50 oranında kaybetmiştir (Ateşlier ve Metin, 2006). *P. torridus* EstA ve EstB esterazlarının 90 °C'de sırasıyla 21 ve 10 saat inkübe edilmeleri sonucunda aktivitelerinin %50'sini kaybettikleri bildirilmiştir

(Hess vd., 2008). Bunlara ek olarak, tavuk hücresinden elde edilen bir esteraz 50 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra aktivitesinin %75’ini korurken (Fendri,2012), rekombinant *G. thermodenitrificans* T2 EstL5 esterazı (Yang vd., 2012), 12 saat 55 °C’de bekletildiğinde aktivitesinde herhangi bir kayıp meydana gelmemiştir. *Sulfolobus solfataricus* P1 esterazı (Nam vd., 2013) 50 °C’de, 120 saat sonunda aktivitesini tamamen korurken, *Thermomyces lanuginosus* esterazı 70 °C’de 60 dakika bekletildikten sonra aktivitesinin %47’sini kaybetmiştir (Li vd., 2014). Bu bilgiler ışığında *G. caldxylosilyticus* TK4 mutant PHP’lerinin literatürde şimdiye kadar bildirilmemiş olan oldukça ısı kararlı esteraz aktivitelere sahip oldukları söylenebilir.

Birçok enzim, aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olabilirler. Bu sebeple metal iyonları, proteinler karşısında, farklı ligand özellikleri gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd.,1999; Di Tusa vd., 2001). Rekombinant ve mutant PHP’lerin esteraz aktivitesi üzerine Na⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının etkisi 1 mM ve 5 mM nihai konsantrasyonlarda olacak şekilde incelendi (Tablo 14-17). Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ ve Ca²⁺ varlığında mutant enzimlerin esteraz aktivitesinde dikkate değer bir değişim gözlenmedi. TK4PHP 1 mM ve 5 mM Cu²⁺ varlığında sırasıyla %13 ve %100 inhibe olurken, aynı şartlar altında TK4PHPM3, %7 ve %53 inhibe olmaktadır. Dolayısıyla bu mutasyonla birlikte Cu²⁺ iyonu varlığında inhibisyonun azaldığı görülmektedir. Buna benzer sonuçlar Na⁺ ile *P. torridus* EstA ve EstB esterazlarında (Hess vd., 2008) ve *B. subtilis* (RRL 1789) esterazında (Kaiser vd., 2006) elde edilmiştir. *P. torridus* EstA ve EstB esterazlarının Co²⁺ ve Cu²⁺ iyonları varlığında (Hess vd., 2008), *Ralstonia* sp. M1(Quyen vd., 2007) ve *Rhodococcus* sp.LKE-028 (Kumar vd., 2012) esterazlarının ise Zn²⁺ varlığında inhibe olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *Bacillus subtilis* DR8806 esterazının da Co²⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺ varlığında, *Pseudomonas* sp. TB11 esterazının ise Ca²⁺ ve Mn²⁺ varlığında inhibe olduğu ortaya konulmuştur (Asoodeh ve Ghanbari, 2012; Dong vd., 2015).

Enzimlerin organik çözücüler ortamında biyokatalizör olarak kullanımı, endüstride potansiyel uygulama alanlarından dolayı, birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Bu çalışmada da rekombinant ve mutant PHP’lerin esteraz aktiviteleri üzerine metanol, etanol, izopropanol, asetonitril, aseton ve DMSO’nun etkisi incelenmiştir (Tablo 18-21). Buna

göre, %10 nihai konsantrasyonda özellikle asetonitril ve aseton varlığında TK4PHPM3 mutant enzimin aktivitesinde orijinal enzime göre %20 oranında bir azalma meydana gelmiştir. %30 nihai konsantrasyonda ise metanol ve DMSO hariç diğer çözücüler durumunda TK4PHPM3, TK4PHP'den daha yüksek aktivitelere sahip olmuştur. TK4PHPM3-M4 durumunda önemli bir değişim gözlenmezken, TK4PHPM3-M4-M5'in esteraz aktivitesinde %30 nihai konsantrasyonda, asetonitril ve DMSO varlığında TK4PHPM3'e kıyasla artış tespit edilmiştir. DMSO'da %10 nihai konsantrasyonda gözlenen aktivite korunumu, *Rhodococcus* sp. LKE-028 esterazında da 10 günlük inkübasyonun ardından görülmüştür (Kumar vd., 2012). %30 nihai konsantrasyonda aseton varlığında mutant PHP'ler %20-25 oranında bir inhibisyona uğramışlardır, tavuktan saflaştırılan bir esteraz ise bu durumda aktivitesini tamamen kaybetmiştir (Fendri 2012). Kim ve arkadaşlarının 2015'te yaptığı bir çalışmada ise nihai %10 DMSO konsantrasyonunda *Bacillus gelatini* KACC 12197 esterazının aktivitesinde artış tespit edilmiştir.

Elde edilen bütün bu veriler göz önüne alındığında, *G. caldxylosilyticus* TK4 PHP'sine yapılan 3 farklı bölge spesifik mutasyonla PTE'ler ile aralarındaki en büyük sıra farklılıklarının giderildiği ancak yine de bu enzimlere PTE aktivitesinin kazandırılmadığı tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten, mutant esteraz enzimlerinin TK4PHP ile karşılaştırıldığında bazı metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı daha dirençli ve bunun yanında daha ısı ve pH kararlı oldukları belirlenmiştir.

5. ÖNERİLER

Endüstride enzim kullanımının giderek yaygınlaşması, farklı kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir (Kolcuoğlu, 2005). Özellikle rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi ve farklı uygulama alanlarında kullanılabilir olması, enzimin özelliklerinin iyileştirilmesine veya çok daha uygun şartlarda üretilmesine imkan sağlamaktadır.

Fosfotriesteraz homolog proteinlerin (PHP'lerin) 3 boyutlu yapıları fosfotriesterazlarla (PTE'lerle) üst üste karşılaştırıldığında bir takım yapısal farklılıkların bulunduğu, bunlardan özellikle aktif bölgeyi oluşturan lop 1, lop 7 ve lop 8'deki eksikliklerin giderilmesinin PHP'ye PTE aktivitesi kazandırılması açısından önemli olduğu daha önce de belirtilmiştir. Bu nedenle, TK4PHP'ye PTE aktivitesi kazandırmak amacıyla sözü geçen eksikliklerin giderildiği bölge spesifik mutasyonlar yapılmış ancak hedeflenen PTE aktivitesi gözlenememiştir. Bu durumda, öncelikle, PHP ve PTE kodlayan genlerin primer sıralarının karşılaştırılmasıyla aktif bölge loplarında gözlenen farklılıkların giderilebileceği birçok rastgele nokta mutasyon gerçekleştirilip, ekspres edilen enzimin aktivitesi üzerine ne şekilde etki ettiği incelenebilir. Bunun yanında, doğrudan aktif bölge loplarıyla ilgili olmayan ancak mutasyonla birlikte proteinin primer ve bundan dolayı da tersiyer yapısında değişiklik meydana getirebilecek böylelikle enzimin aktif bölgesinin yapısını ve/veya substratına olan ilgisini değiştirebilen bazı rastgele mutasyonlar da yapılabilir. Örneğin, literatürde rastlanmamakla birlikte, PDPTE'de olup PHP'lerde bulunmayan proteinin N- ucundaki yaklaşık 40 amino asitten oluşan eksiklik giderilebilir ve bu mutasyonun enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenebilir. Yine farklı bir örnek olarak, PTE'nin primer yapısında 169. pozisyonda bulunan ve tam olarak korunmamış olan lisinin PHP'lerde bu pozisyonda bir glutamat birimi bulunması nedeniyle bu değişikliği giderebilecek bir nokta mutasyon yapılabilir ve söz konusu mutasyonun da enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenebilir. PHP'lere PTE aktivitesi kazandırılmasına yönelik yapılan mutasyon çalışmalarının sayısı oldukça az olmakla birlikte yukarıda bahsedilen mutasyonların dışında yapısal farklılıkları ortadan kaldıracak rastgele veya moleküler modelleme çalışmalarıyla belirlenecek birçok mutasyon yapıp, bunların proteinin PTE aktivitesi üzerine nasıl bir etkide bulunduğu incelenebilir ki, bugün literatürde gözlenen de budur.

Mutant enzimler, güçlü bir promotorun altında histidin kuyruğu ile ekspres edilmiştir. Histidin kuyruğu enzimin saflaştırılmasını kolaylaştırmasına rağmen, enzim aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle, enzimin histidin kuyruğu içermeyecek şekilde ekspres edilmesi ve sonrasında karakterizasyon çalışmaları ile enzimin spesifik aktivitesinin, V_{max} ve K_m değerlerinin, pH ve ısıl kararlılığının yeniden belirlenmesi çalışılabilir. Ayrıca literatürde kromatografik yöntemlerle saflaştırılan rekombinant enzimlerin varlığı görülmektedir (Bajaj vd., 2015). Bu nedenle daha ileri bir çalışmada nikel kolonu ile tek basamakta saflaştırılarak elde edilen mutant enzimin katalitik etkinliği ve özellikleri, polihistidin kuyruğu içermeyen mutant enzimle veya *G. caldxylosilyticus* TK4 suşundan kromatografik yollarla elde edilen PHP ile karşılaştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Afriat, L., Roodveldt, C., Manco, G. ve Tawfik, D.S., 2006. The Latent Promiscuity of Newly Identified Microbial Lactonases Is Linked to a Recently Diverged Phosphotriesterase, Biochemistry, 45, 13677-13686.
- Almeida, R.V., Alqueres, S.M.C., Larentis, A.L., Rössle, S.C., Cardoso, A.M., Almeida, W.I., Bisch, P.M., Alves, T.L.M. ve Martins O.B., 2006. Cloning, Expression, Partial Characterization and Structural Modeling of a Novel Esterase from *Pyrococcus furiosus*, Enzyme and Microbial Technology, 39, 1128-1136.
- Amitai, G., Gaidukov, L., Adani, R., Yishay, S., Yacov, G., Kushnir, M., Teitlboim, S., Lindenbaum, M., Bel, P., Khersonsky, O., Tawfik, D.S. ve Meshulam, H., 2006. Enhanced Stereoselective Hydrolysis of Toxic Organophosphates by Directly Evolved Variants of Mammalian Serum Paraoxonase, Federation of European Biochemical Societies, 273, 1909-1919.
- Arnold, F. H., 2001. Combinatorial and Computational Challenges for Biocatalyst Design, Nature, 409, 253-257.
- Arslan, K. ve Akyüz, B., 2009. Gen Transfer Teknolojileri, E.Ü. Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 6, 1, 77-82.
- Asoodeh, A. ve Ghanbari, T., 2012. Characterization of an Extracellular Thermophilic Alkaline Esterase Produced by *Bacillus subtilis* DR8806, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 85-86, 49-55.
- Ateşlier, Z.B.B. ve Metin, K., 2006. Production and Partial Characterization of a Novel Thermostable Esterase from a Thermophilic *Bacillus* sp., Enzyme and Microbial Technology, 38, 628-635.
- Aubert, S.D., Li, Y. ve Raushel, F.M., 2004. Mechanism for the Hydrolysis of Organophosphates by the Bacterial Phosphotriesterase, Biochemistry, 43, 5707-5715.
- Ayna, Ç., Kolcuoğlu, Y., Öz, F., Çolak, A. ve Ertunga, N.S., 2013. Purification and Characterization of a pH and Heat Stable Esterase from *Geobacillus* sp. TF17, Turkish Journal of Biochemistry, 38, 329-336.
- Bajaj, P., Tripathy, K.R., Aggarwal, G. ve Pande, A.H., 2015. Expression and Purification of Biologically Active Recombinant Human Paraoxonase 1 from Inclusion Bodies of *Escherichia coli*, Protein Expression and Purification, Article in Press.
- Baker. G.C., Gaffer. S., Cowan. A.D. ve Suharto. A.R., 2001. Bacterial Community Analysis of Indonesian Hot Springs, FEMS Microbiology Letters, 200, 103-109.

- Boyineni, J., Kim, J., Kang, B.S., Lee, C.W. ve Jang, S.H., 2014. Enhanced Catalytic Site Thermal Stability of Cold-Adapted Esterase EstK by a W208Y Mutation, Biochimica et Biophysica Acta, 1844, 1076-1082.
- Benner, S. ve Ellington, A.D., 1988. Interpreting the Behavior of Enzymes: Purpose or Pedigree?, CRC Critical Reviews in Biochemistry, 23, 369-426.
- Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M. ve Holden, H.M., 1995. 3-Dimensional Structure of the Binuclear Metal Center of Phosphotriesterase, Biochemistry, 34, 7973-7978.
- Bigley, A.N. ve Raushel, F.M., 2012. Catalytic Mechanisms for Phosphotriesterases, Biochimica et Biophysica Acta, 1834, 443-453.
- Bock, W.C., Katz, A.G., Markham, G.D. ve Glusker J.P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions, Journal of the American Chemical Society, 121, 7360-7372.
- Bornscheuer, U. T. ve Kazlauskas, R. J., 1999. Hydrolyses In Organic Synthesis Regio and Stereoselective Biotransformations, Wiley Vch, Weinheim, 105 p.
- Bornscheuer, U. T., 2002. Microbial Carboxyl Esterases, Classification, Properties and Application in Biocatalysis, Fems Microbiology Reviews, 26, 73-81.
- Bruins, M.E., Jansen, A.E.M. ve Boom, R. M., 2001. Thermozyms and Their Applications, Applied Biochemistry and Biotechnology, 90, 155-186.
- Buchbinder, J.L., Stephenson, R.C., Dresser, M.J., Pitera, J.W., Scanlan, T.S. ve Fletterick, R.J., 1998. Biochemical Characterization and Crystallographic Structure of an *Escherichia coli* Protein from the Phosphotriesterase Gene Family, Biochemistry, 37, 5096-5106.
- Buning, C., Cnaters, G.W., Comba, P., Dennison, C., Jeuken, L., Melter, M. ve Sanders-Loehr, J., 2000. Loop-Directed Mutagenesis of the Blue Copper Protein Amicyanin from *Paracoccus versutus* and Its Effect on the Structure and the Activity of the Type-1 Copper Site, Journal of American Chemical Society, 122, 204-211.
- Burhan, A., Ünalđı, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A. ve Gülnaz, O., 2003. Enzymatic Properties of a Novel Thermostable, Thermophilic, Alkaline and Chelator Resistant Amylase from an Alkaliphilic *Bacillus* sp. İsolate ANT-6. Process Biochemistry, 38, 1397-1403.
- Chakraborti, S., Sani, R.K, Banerjee, U.C. ve Sobti, R.C., 2003. Production and Partial Characterization of a Novel β -galactosidase from a Newly Isolated *Bacillus polymyxa*, Scientia Iranica, 10, 3, 279-286.
- Chen, L., Dang, G., Deng, X., Cao, J., Yu, S., Wu, D., Pang, H. ve Liu, S., 2014. Characterization of a Novel Exported Esterase Rv3036c from *Mycobacterium tuberculosis*, Protein Expression and Purification, 104, 50-56.

- Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M.A., Wu, F. ve Raushel, F.M., 2001b. Enhancement, Relaxation, and Reversal of the Stereoselectivity for Phosphotriesterase by Rational Evolution of Active Site Residues, Biochemistry, 40, 1332-1339.
- Cho, C.M.-H., Ashok Mulchandani, A. ve Chen, W., 2004. Altering the Substrate Specificity of Organophosphorus Hydrolase for Enhanced Hydrolysis of Chlorpyrifos, Applied and Environmental Microbiology, 70, 4681-4685.
- Choi, Y.J. ve Lee, B.H., 2001. Culture Conditions for the Production of Esterase from *Lactobacillus casei* CL96, Bioprocess and Biosystems Engineering, 24, 59-63.
- Chough, S.H., Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J., ve Rogers, K.R., 2002. Organophosphorus Hydrolase-Based Electrode for Determination of Organophosphate Pesticides, Electroanalysis, 14, 273-276.
- Chu, X.Y., Wu N.F., Deng M.J., Tian J., Yao B. ve Fan Y.L., 2006. Expression of Organophosphorus Hydrolase OPHC₂ in *Pichia pastoris*: Purification and Characterization, Protein Expression and Purification, 49, 9-14.
- Çolak, A., Camedan, Y., Faiz, O., Sesli, E. ve Kolcuoğlu, Y., 2009. An Esterolytic Activity from a Wild Edible Mushroom, *Lycoperdon perlatum*, Journal of Food Biochemistry, 33, 482-499.
- Danis, T.G., Karagiozoglou, D.T., Tsakiris, I.N., Alegakis, A.K. ve Tsatsakis, A.M., 2011. Evaluation of Pesticides Residues in Greek Peaches During 2002-2007 After the Implementation of Integrated Crop Management, Food Chemistry, 126,97-103.
- Das, R. ve Gerstein M., 2000. The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Functional & Integrative Genomics, 1, 76-88.
- DeFlaun, M. F. ve Fredrickson, J. K., 2007. Isolation and Characterization of a *Geobacillus thermoleovorans* Strain from an Ultra-deep South African Gold Mine. Systematic and Applied Microbiology, 30, 2, 152-164.
- Dong, J., Zhao, W., Mohammed, A.A., Jingtao Sunc, G., Hua, X., Zhang,W., Han, L., Fan, Y., Feng, Y., Shen, Q. ve Yang, R., 2015. A Novel Extracellular Cold-Active Esterase of *Pseudomonas* sp. TB11 from glacier No.1: Differential Induction, Purification and Characterisation, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 121, 53-63.
- Dumas, D.P., Caldwell, S.R., Wild, J.R. ve Raushel, F.M., 1989. Purification and Properties of the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, Journal of Biological Chemistry, 264, 19659-19665.
- Dumas, D.P., Durst, H.D., Landis, W.G., Raushel, F.M. ve Wild, J.R., 1990. Inactivation of Organophosphorus Nerve Agents by the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 277,155-159.

- Dülger, S., Gönen, 2003. Kestanbol ve Diyadin Kaplıcaları'ndan Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Eisenkraft, A., Gilburd, D., Kassirer, M. ve Kreiss, Y., 2014. What Can We Learn on Medical Preparedness from the Use of Chemical Agents Against Civilians in Syria?, American Journal of Emergency Medicine, 32, 186.
- Ekici, A., Timur, M. ve Bağış, H., 2006. Transgenik Canlılar ve Akuakültürdeki Önemi, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 23, 211-214.
- Ekinci, M.S., Akyol, İ., Karaman, M. ve Ozkose, E., 2005. Hayvansal Biyoteknoloji Uygulamalarında Güncel Gelişmeler, K.S.Ü Fen ve Mühendislik Dergisi, 8, 89-95.
- Eren Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, K.S.Ü. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9, 12-19.
- Ertunga, N.S., Cakmak, U., Çolak, A., Faiz, O. ve Sesli E., 2009. Characterization of Esterolytic Activity from Two Wild Mushroom Species *Amanita vaginata* and *Tricholoma terreum*, Food Chemistry, 115, 1486-1490.
- Faiz, O., Çolak, A., Sağlam Ertunga, N., Çanakçı, S. ve Beldüz A.O., 2007. Determination and Characterization of Thermostable Esterolytic Activity from a Novel Thermophilic Bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 40, 588-594.
- Fendri, A., Louati, H., Sellami, M., Gargouri, H., Smichi, N., Zarai, Z., Aissa, I., Miled, N. ve Gargouri, Y., 2012. A Thermoactive Uropyl Esterase from Chicken; Purification, Characterization and Synthesis of Flovaur Esters, International Journal of Biological Mcromolecules, 50, 1238-1244.
- Filion, M., Bhakta, V., Nguyen, L., Liaw, P. ve Sheffield, W., 2004. Full or Partial Substitution of the Reactive Center Loop of Alpha-1-proteinase Inhibitor by that of Heparin Cofactor II: P1 Arg is Required for Maximal Thrombin Inhibition, Biochemistry, 43, 14864-14872.
- Firidin, Ş., 2010. Rekombinant DNA Teknolojisi, Yunus Araştırma Bülteni, 3, 16-18.
- Fujiwara, S., 2002. Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94, 518-525.
- Fullbrook, P.D., 1996. Practical Applied Kinetics, 2, New York: Stockholm Pres.
- Gandhi, N. N., 1997. Applications of Lipases, Journal of American Oil Chemists Society, 74, 6, 621-634.
- Gao, R., Feng, Y., Ishikawa, K., Ishida, H., Ando, S., Kasugi, Y. ve Gao, S., 2003. Cloning, Purification and Properties of Hyperthermophilic Esterase from Archaeon *Aeropyrum pernix* K1. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 24, 5, 1-8.

- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable, Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus sp.*, Applied and Environmental Microbiology, 64, 3533-3535.
- Ghanem, E. ve Raushel, F.M., 2005. Detoxification of Organophosphate Nerve Agents by Bacterial Phosphotriesterase, Toxicology and Applied Pharmacology, 207, 459-470.
- Ghati, A. ve Paul, G., 2014. Purification and Characterization of a Thermo-halophilic, Alkali-stable and Extremely Benzene Tolerant Esterase from a Thermo-halo Tolerant *Bacillus cereus* Strain AGP-03, Isolated from 'Bakreshwar' Hot Spring, India, Process Biochemistry, 50, 771-781.
- Gong, Y., Xu, G.C., Zheng, G.W., Li, C.X. ve Xu, J.H., 2014. A Thermostable Variant of *Bacillus subtilis* Esterase: Characterization and Application for Resolving *dl*-Menthyl Acetate, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 109, 1-8.
- Gopal, S., Rastogi, V., Ashman, W. ve Mulbry, W., 2000. Mutagenesis of Organophosphorus Hydrolase to Enhance Hydrolysis of the Nerve Agent VX, Biochemical and Biophysical Research Communications, 279, 516-519.
- Gupta, R.D., Goldsmith, M., Ashani, Y., Simo, Y., Mullokandov, G., Bar, H., Ben-David, M., Leader, H., Margalit, R., Silman, I., Sussman, J.L. ve Tawfik, D.S., 2011. Directed Evolution of Hydrolases for Prevention of G-type Nerve Agent Intoxication, Nature Chemical Biology, 7, 120-125.
- Gül Güven, R., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimler, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 9, 1, 1-10.
- Gül-Güven, R., 2007. Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* sub sp. *rittmanii*'den β -galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Gümüşel, F., 2002. Kocaeli Sanayii İçin Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi, Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık Sektörü, 73-135.
- Haider, T. Ve Qayyum, H., 2007. Calcium Alginate Entrapped Preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Its Stability and Applications in the Hydrolysis of Lactose, International Journal of Biological Macromolecules, 41, 72-80.
- Haki, G.D. ve Rakshit, S., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresour Technology, 89, 17-34.
- Hao, J. ve Berry, A., 2004. A Thermostable Variant of Fructose Bisphosphate Aldolase Constructed by Directed Evolution Also Shows Increased Stability in Organic Solvents, Protein Engineering Design and Selection, 17, 9, 689-697.

- Harold, J.A. ve Ottea, J.A., 2000. Characterization of Esterase Associated with Profenofos resistance in the Tobacco Budworm, *Heliothis virescens* (F.), Archives Insect Biochemistry and Physiology, 45, 47-59.
- Harrison, E.H., 2000. Lipases and Carboxylesterases Possible Roles in the Hepatic Utilization of Vitamin A, Journal of Nutrition, 130, 340-344.
- Hasan, F., Shah, A. A. ve Hameed, A., 2006. Industrial Applications of Microbial Lipases, Enzyme and Microbial Technology, 39, 235-251.
- Hawwa, R., Larsen, S.D., Ratia, K. ve Mesecar, A.D., 2009. Structure-Based and Random Mutagenesis Approaches Increase the Organophosphate-Degrading Activity of Phosphotriesterase Homologue from *Deinococcus radiodurans*, Journal of Molecular Biology, 393, 36-57.
- Herbert, R.A., 1992. A Perspective on the Biotechnological Potential of Extremophiles, Trends in Biotechnology, 10, 395-402.
- Hess, M., Katzer, M. ve Antranikian G., 2008. Extremely Thermostable Esterases from the Thermoacidophilic Euryarchaeon *Picrophilus torridus*, Extremophiles, 12, 351-364.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Li, B.-C. ve Herrmann, R., 1996. Complete Sequence Analysis of the Genome of the Bacterium *Mycoplasmampneumoniae*, Nucleic Acids Research, 24, 4420-4449.
- Hong, S.B. ve Raushel, F.M., 1996. Metal-Substrate Interactions Facilitate the Catalytic Activity of the Bacterial Phosphotriesterase, Biochemistry, 35, 10904-10912.
- Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H. ve Imanaka, T., 2002. Extremely Stable and Versatile Carboxylesterase from a Hyperthermophilic Archaeon, Applied and Environmental Microbiology, 68, 3925-3931.
- Hou, X., Maser, R.L., Magenheimer, B.S. ve Calvet, J.P., 1996. A Mouse Kidney- and Liver-Expressed cDNA having Homology with a Prokaryotic Parathion Hydrolase (Phosphotriesterase) Gene: Abnormal Expression in Injured and Polycystic Kidneys, Gene, 168, 157-163.
- Irene, H., Tara D.S., Harcourt R.L., Russell R.J. ve Oakeshott J.G., 2002. Identification of an OPD (Organophosphate Degradation) Gene in an *Agrobacterium* Isolate, Applied and Environmental Microbiology, 68, 3371-3376.
- Kademi, A. ve Ait-Abdelkader, N., 2000. Purification and Characterization of a Thermostable Esterase From the Moderate Thermophile *Bacillus circulans*. Applied Microbiology and Biotechnology, 54, 173-179.
- Kaiser, P., Raina, C., Parshad, R., Johri, S., Verma, V., Andrabi, K.I. ve Qazi G.N., 2006. A Novel Esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): Purification and Characterization of the Enzyme, Protein Expression and Purification, 45, 262-268.

- Kakugawa, S., Fushinobu, S., Wakagi, T. ve Shoun, H., 2007. Characterization of a Thermostable Carboxylesterase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*, Applied Microbiology and Biotechnology, 74,585-591.
- Karaca, O.B. ve Güven, M., 2004. Mikrobiyolojik Kaynaklı Proteolitik ve Lipolitik Enzim Kullanımının Beyaz Peynirlerin Özellikleri ve Olgunlaşma Hızları Üzerine Etkisi, Gıda, 29, 239-248.
- Kim, J., Deng, L., Hong, E. ve Ryu, Y., 2015. Cloning and Characterization of a Novel Thermostable Esterase from *Bacillus gelatini* KACC 12197, Protein Expression and Purification, 116, 90-97.
- Kolakowski, J.E., DeFrank, J.J., Harvey, S.P., Szafraniec, L.L., Beaudry, W.T., Lai, K. ve Wild, J.R., 1997. Enzymatic Hydrolysis of the Chemical Warfare Agent VX and its Neurotoxic Analogues by Organophosphorus Hydrolase, Biocatalysis and Biotransformation, 15, 297-312.
- Kontkanen, H., Tenkanen, M., Fagerstrom, R. ve Reinikainen, T., 2004. Characterization of Steryl Esterase Activities, Journal of Biotechnology, 108, 51-59.
- Köksel, H., Dönmez, S. ve Özkaya H., 1989. Rekombinant DNA Teknolojisinin Gıda Enzimlerinin Üretiminde Kullanılma Olanakları, Gıda, 14, 1, 43-49.
- Kristjansson, M.M. ve Asgeirsson, B., 2002. Properties of Extremophilic Enzymes and Their Importance in Food Science and Technology, Handbook of Food Enzymology (ed. J.R. Whitaker), NY, USA, 77-99.
- Kumar, L., Singh, B., Kumar, D.A., Mukherjee, J. ve Ghosh, D., 2012. A Thermoalkaliphilic Halotolerant Esterase from *Rhodococcus* sp. LKE-028 (MTCC5562): Enzyme Purification and Characterization, Process Biochemistry, 47, 983-991.
- Kumar, S., Tsai, C. ve Nussinov, R., 2000. Factors Enhancing Protein Thermostability, Protein Engineering, 13, 179-191.
- Lambrechts, C., Escudero, J. ve Galzy, P., 1995. Purification and Properties of Three Esterases from *Brevibacterium* sp. R312, Journal of Applied Bacteriology, 78, 180-188.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. T. ve Pyun, Y., 1999. Isolation and Characterization of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiology Letters, 179, 393-400.
- Levisson, M., Van der Oost, J. ve Kengen, S.W.M., 2007. Characterization and Structural Modeling of a New Type of Thermostable Esterase from *Thermotoga maritima*, FEBS Journal, 274, 2832-2842.

- Li, W.S., Lum, K.T., Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M.A. ve Raushel, F.M., 2001. Stereoselective Detoxification of Chiral Sarin and Soman Analogues by Phosphotriesterase, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 9, 2083-2091.
- Li, X.J, Zheng, R.C., Wu, Z.M., Ding, X. ve Zheng, Y.G., 2014. Thermophilic Esterase from *Thermomyces lanuginosus*: Molecular Cloning, Functional Expression and Biochemical Characterization, Protein Expression and Purification, 101, 1-7.
- Liu, B., Wang, Y. ve Zhang, X., 2006. Characterization of a Recombinant Maltogenic Amylase from Deep Sea Thermophilic *Bacillus* sp. *WPD616*, Enzyme and Microbial Technology, 39, 805-810.
- Lopes, M.F.S., Cunha, A.E., Clemente, J.J., Carrondo, M.J.T. ve Crespo, M.T.B., 1999. Influence of Environmental Factors on Lipase Production by *Lactobacillus plantarum*, Applied Microbiology and Biothecnology, 51, 249-254.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951. Protein Mesurement with the Folin Phenol Reagent, The Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. ve Parker, J., 2000. Bock Biology of Microorganisms, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Manco, G., Giosue, E., D'Auria, S., Herman, P., Carrea, G. ve Rossi, M., 2000. Cloning, Overexpression, and Properties of a New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to Hormone-Sensitive Lipase Subfamily from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 373, 182-192.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. ve Sambrook, J., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NewYork.
- Marrs, T.C., 2007. Toxicology of Organophosphate Nerve Agents, In: Marrs, T.C., Maynard, R.L., Sidell, F.R. (Eds.), Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 191-221.
- Masson, P. ve Rochu, D., 2009. Catalytic Bioscavengers: The Next Generation of Bioscavenger-based Medical Countermeasures. In: Gupta, R. (Ed.), Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. Academic Press, London, 1053-1065.
- Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M. ve Manco, G.A, 2005. A Thermostable Phosphotriesterase from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Cloning, Overexpression and Properties, Extremophiles, 9, 297-305.
- Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chauhan, S. ve Chen, W., 1998a. Enzyme Biosensor for Determination of Organophosphates, Field Analytical Chemistry & Technology, 2, 263-269.

- Mulchandani, A., Mulchandani, P., Kaneva, I. ve Chen, W., 1998b. Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents Using Recombinant *Escherichia coli* with Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase. 1. Potentiometric Microbial Electrode, Analytical Chemistry, 70, 4140-4145.
- Mumford, H., Docx, C.J., Price, M.E., Green, A.C., Tattersall, J.E.H. ve Armstrong, S.J., 2013. Human Plasma-derived BuChE as a Stoichiometric Bioscavenger for Treatment of Nerve Agent Poisoning, Chemico-Biological Interactions, 203, 160-166.
- Nam, J.K., Park, Y.J. ve Lee, H.B., 2013. Cloning, Expression, Purification, and Characterization of a Thermostable Esterase from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 94, 95-103.
- Niehaus, F., Bertolo, C., Kahler, M. ve Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Application, Applied and Microbiology and Biotechnology, 51, 711-729.
- Nikolaos, E.L., 2005. Directed Enzyme Evolution: Bridging the Gap Between Natural Enzymes and Commercial Applications, Biomolecular Engineering, 22, 7-9.
- Oliver, J. Naidoo, A., Vandin, L., Pugnaghi, F., Gatehouse, D. ve Comelli, R., 2000. Carboxylesterases, a Key Factor in Evaluating Potential Genotoxicity of Trinem Antibiotics, Mutagenesis, 15, 45-55.
- Ollis, D. L., 1992. The K/L Hydrolase Fold, Protein Engineering, 5, 197-211.
- Omburo, G.A., Kuo, J.M., Mullins, L.S. ve Raushel, F.M., 1992. Characterization of the Zinc Binding Site of Bacterial Phosphotriesterase, Journal of Biological Chemistry, 267, 13278-13283.
- Özcengiz, G., 2002. Endüstriyel Üretimde Gen Teknolojileri, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri Özel, 8, 3, 104-119.
- Panda, T. ve Gowrishankar, B.S., 2005. Production and Applications of Esterases, Applied Microbiology and Biotechnology, 67, 160-169.
- Philipp, W.J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., Bergh, S., Bloom, B.R., Jacobs, W., Jr. ve Cole, S.T., 1996. An Integrated Map of the Genome of the *Tubercle Bacillus*, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and Comparison with *Mycobacterium leprae*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 3132-3137.
- Quyen, D.T., Dao, T.T. ve Nguyen, S.L.T., 2007. A Novel Esterase from *Ralstonia* sp. M1: Gene Cloning, Sequencing, High-Level Expression and Characterization, Protein Expression and Purification, 51, 133-140.
- Raushel, F.M., 2002. Bacterial Detoxification of Organophosphate Nerve Agents, Current Opinion in Microbiology, 5, 288-295.

- Rhee, J.K., Ahn, D.G., Kim, Y.G. ve Oh, J.W., 2005. New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to the Hormone sensitive Lipase Family, Cloned from a Metagenomic Library, Applied and Environmental Microbiology, 71, 817-825.
- Rogers, K.R., Wang, Y., Mulchandani, A., Mulchandani, P. ve Chen, W., 1999. Organophosphorus Hydrolase-Based Assay for Organophosphate Pesticides, Biotechnology Progress, 15, 517-521.
- Roodveldt, C. ve Tawfik, D.S., 2005. Shared Promiscuous Activities and Evolutionary Features in Various Members of the Amidohydrolase Superfamily, Biochemistry, 44, 12728-12736.
- Russell, R. J. M, Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W. ve Taylor, G.L., 1998. Structural Adaptations of the Cold-Active Citrate Synthase from an Antarctic Bacterium, Structure, 6, 3, 351-361.
- Russell, R. J. M., Ferguson, J. M. C., Hough, D. W., Danson, M. J. ve Taylor, G.L., 1997. The Crystal Structure of Citrate Synthase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å Resolution, Biochemistry, 36, 9983-9994.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. ve Maniatis T., 1989. Detection and Analysis of Proteins Expressed from Cloned Genes. In: Ford, N., Nolan, C.F.M. ve Ockler, M. (Editors), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scanlan, T. S. ve Reid, R.C., 1995. Evolution in Action, Chemistry & Biology, 2, 71-75.
- Schmid, R.D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, Angewandte Chemie-International Edition, 37, 1608-1633.
- Schrader, G., 1950. Organische Phosphor-Verbindungen Als Neuartige Insektizide (Auszug), Angewandte Chemie, 62, 471-473.
- Seibert, C.M. ve Raushel, F.M., 2005. Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase Superfamily, Biochemistry, 44, 6383-6391.
- Shen, D., Xu, J.H., Wu, H.Y. ve Liu, Y.Y., 2002. Significantly Improved Esterase Activity of *Trichosporun brassicae* Cells for Ketoprofen Resolution by 2-Propanol Treatment, Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 18, 219-224.
- Sinha, S.N., Vasudev, K., Rao, V.V. ve Odetokun, M., 2011. Quantification of Organophosphate Insecticides in Drinking Water in Urban Areas Using Lyophilisation and High-performance Liquid Chromatography-electrospray Ionization-mass Spectrometry Techniques, International Journal of Mass Spectrometry, 300, 1, 12-20.

- Soliman, N.A. ve Gaballa, A.A., 2013. A Molecular Study on Thermostable Carboxyl Esterase and Esterase/Acylaminoacyl-peptidase Enzymes of *Geobacillus thermoleovorans* YN, Research Journal of Biochemistry, 8, 2-10.
- Soliman, N.A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y.R., Schmid, R.D. ve Lange S., 2007. Molecular Cloning and Characterization of Thermostable Esterase and Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN Isolated from Desert Soil in Egypt, Process Biochemistry, 42,1090-1100.
- Sökmen, B.B., 2005. Kayısı (*Armeniaca vulgaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, Doktora Tezi, İ.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Tao, H. ve Cornish V.W., 2002. Milestones in Directed Enzyme Evolution, Current Opinion in Chemical Biology, 6, 858-864.
- Thompson, M.J. ve Eisenberg, D., 1999. Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability, Journal of Molecular Biology, 290, 2, 595-604.
- Tirawongsaroj, P. ve Sriprang, R., 2008. Novel Thermophilic and Thermostable Lipolytic Enzymes from a Thailand Hot Spring Metagenomic Library, Journal of Biotechnology,133, 1, 42-49.
- URL-1, www.expasy.ch/tools/dna.html, 1 Ocak 2016.
- URL-2, www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo, 1 Ocak 2016.
- Ünlü, A.E., 2004. *Candida rugosa* Lipazının Özellikleri ve Enantiyo Seçimliliğinin Arttırılması, Seminer, Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Van Den Burg, B., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, Microbiology, 6, 213-218.
- Vieille, C. ve Zeikus, J.G., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiol Mol Biol R, 65, 1-43.
- Walsh, G., 2002. Proteins: Biochemistry and Biotechnology, John Wiley&Sons Baffins Lane, West Sussex, England.
- Wang, J., Krause, R., Block, K., Musameh, M., Mulchandani, A. ve Schoning, M.J., 2003.Flow Injection Amperometric Detection of OP Nerve Agents Based on anOrganophosphorus Hydrolase Biosensor Detector, Biosensors & Bioelectronics, 18, 255-260.
- Wang, X., Minasov, G. ve Shoichet, B.K.J., 2002. Evolution of an Antibiotic Resistance Enzyme Constrained by Stability and Activity Trade-Off, Journal of Molecular Biology, 320, 85-95.

- Wei, X., Jiang, X., Yea, L., Yuana, S., Chena, Z., Wuc, M. ve Yua, H., 2013. Cloning, Expression and Characterization of a New Enantioselective Esterase from a Marine Bacterium *Pelagibacterium halotolerans* B2^T, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 97, 207-277.
- Williams, R.A.D., Simith, K.E., Welch, S.G., Micallef, J., ve Sharp, R.J., 1995. DNA Relatednes of *Thermus* Suşs, Description of *Thermus brockianus* sp. nov., and Proposal to Reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori), International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 495-499.
- Worek, F., Seeger, T., Reiter, G., Goldsmith, M., Ashani, Y., Leader, H., Sussman, J.L., Aggarwal, N., Thiermann, H. ve Tawfik, D.S., 2014. Post-exposure Treatment of VX Poisoned Guinea Pigs with the Engineered Phosphotriesterase Mutant C23: A Proof-of-Concept Study, Toxicology Letters, 231, 45-54.
- Wrasidlo, W., Schroder, U., Bernt, K., Hubener, N., Shabat, D., Gaedicke, G. ve Lode, H., 2002. Synthesis, Hydrolytic Activation and Cytotoxicity of Etoposide Prodrugs, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12, 557-560.
- Xiang, D., Kolb, P., Fedorov, A., Meier, M., Fedorov, L., Nguyen, T., Sterner, R., Almo, S., Shoichet, B., ve Raushel, F., 2009. Functional Annotation and Three-Dimensional Structure of Dr0930 from *Deinococcus radiodurans*, a Close Relative of Phosphotriesterase in the Amidohydrolase Superfamily, Biochemistry, 48, 2237–2247.
- Yang, Z., Zhang, Y., Shen, T., Xie, Y., Mao, Y. ve Ji, C., 2012. Cloning, Expression and Biochemical Characterization of a Novel, Moderately Thermostable GDSL Family Esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2, Journal of Bioscience and Bioengineering, 115, 133-137.
- Yıldırım, M., Colak A., Col M. ve Canakci S., 2009. A New Recombinant Phosphotriesterase Homology Protein from *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4: An Extremely Thermo- pH Stable Esterase, Process Biochemistry, 44, 1366-1377.
- Yu, Q.S., Holloway, H.W., Flippen-Anderson, L.L., Hoffman, B., Brossi, A. ve Greig, N.H., 2001. Methyl Analogues of the Experimental Alzheimer Drug Phenserine: Synthesis and Structure and Structure/Activity Relationships for Acetyl- and Butyryl cholinesterase Inhibitory Action, Journal of Medicinal Chemistry, 44, 4062-4071.
- Zhang, J., Liu, J., Zhou, J., Ren, Y., Dai, X. ve Xiang, H., 2003. Thermostable Esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*: High-Level Expression, Purification and Characterization, Biotechnology Letters, 25, 1463-1467.
- Zhang, S., Wu, G., Feng, S. ve Liu, Z., 2014. Improved Thermostability of Esterase from *Aspergillus fumigatus* by Site-Directed Mutagenesis, Enzyme and Microbial Technology, 64-65, 11-16.

Zheng, J., Wang, J., Zhou, S., Ying, X. ve Wang, Z., 2015. A Stereoselective Esterase from *Bacillus megaterium*: Purification, Gene Cloning, Expression and Catalytic Properties, Protein Expression and Purification, in Pres.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kırklareli’de doğdu. Lise öğrenimini Kırklareli Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2002-2007 yılları arasında KTÜ, Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü’nde lisans öğrenimi gördü. 2010 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimini tamamladı ve aynı yıl doktora başladı. 2012 yılından beri KTÜ Prof. Dr. Saadettin GÜNER Yakıt Uygulama ve Araştırma Merkez’inde Uzman olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir.