



**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**DENİZEL ORTAMLARDA PLASTİKLERİN PARÇALANMA  
SÜREÇLERİNİ HIZLANDIRACAK BİR KÜTİNOLİTİK  
ESTERAZ ENZİMİNİN FONKSİYONEL METAGENOMİK  
YÖNTEMLERLE KEŞFİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Fatma ŞEN**

Danışman  
**Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL**

SAMSUN  
2023

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI



**DENİZEL ORTAMLARDA PLASTİKLERİN PARÇALANMA  
SÜREÇLERİNİ HIZLANDIRACAK BİR KÜTİNOLİTİK  
ESTERAZ ENZİMİNİN FONKSİYONEL METAGENOMİK  
YÖNTEMLERLE KEŞFİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Fatma ŞEN**

Danışman

**Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL**

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)  
tarafından 120Z329 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN  
2023

## TEZ KABUL VE ONAYI

Fatma ŞEN tarafından, Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL danışmanlığında hazırlanan “DENİZEL ORTAMLARDA PLASTİKLERİN PARÇALANMA SÜREÇLERİNİ HIZLANDIRACAK BİR KÜTİNOLİTİK ESTERAZ ENZİMİNİN FONKSİYONEL METAGENOMİK YÖNTEMLERLE KEŞFİ ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 10.7.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

|        | Unvanı Adı Soyadı<br>Üniversitesi<br>Ana Bilim/Ana Sanat Dalı                                                            | Sonuç                                                                     |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Başkan | Prof. Dr. Gazi GÖRÜR<br>Niğde Ömer Halisdemir<br>Üniversitesi<br>Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı                            | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Prof. Dr. Münir TUNÇER<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik<br>Ana Bilim Dalı                  | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman<br>ADIGÜZEL<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik<br>Ana Bilim Dalı | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

31 /08 / 2023

Fatma ŞEN

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı :** DENİZEL ORTAMLARDA PLASTİKLERİN PARÇALANMA SÜREÇLERİNİ HIZLANDIRACAK BİR KÜTİNOLİTİK ESTERAZ ENZİMİNİN FONKSİYONEL METAGENOMİK YÖNTEMLERLE KEŞFİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 31/08/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

31 / 08 /2023

Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL

## ÖZET

### DENİZEL ORTAMLARDA PLASTİKLERİN PARÇALANMA SÜREÇLERİNİ HIZLANDIRACAK BİR KÜTİNOLİTİKESTERAZ ENZİMİNİN FONKSİYONEL METAGENOMİK YÖNTEMLERLE KEŞFİ

Fatma ŞEN  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans, Ağustos/2023  
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL

Yaşadığımız yüzyılın en büyük sorunlarından biri plastikler ve diğer sentetik esterlerin yaygın kullanımından doğan çevre kirliliğidir. Sucul ekosistemlerdeki mikroorganizmalar mevcut ortamın şartlarına ayak uydurma kapasitesi yüksek canlılardır ve farklı tip esterleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler. Buna rağmen, literatürde plastikler ve diğer sentetik esterlerin parçalanmasında kullanılabilecek mikroorganizma temelli esteraz/kütinaz enzimleri sınırlıdır. Ancak, kültürel yöntemlerle izole edilemeyen çok sayıda mikroorganizmanın da benzer enzimleri üretme potansiyelinin olabileceği tahmin edilmektedir. Bundan dolayı, sunulan tez kapsamında fonksiyonel metagenomik yöntem kullanılarak ülkemiz kumsallarında atılı plastik parçaları ile ilişkili mikroorganizmaların genlerinin taranması ile denizel ortamlarda kararlı kütinaz/esteraz enzimlerinin keşfi hedeflenmiştir.

Bu kapsamda; 12 farklı kumsaldan atık plastik parçaları toplanmış ve her alan için 30-40 kb'lık DNA parçaları içeren klonlardan oluşan metagenomik kütüphaneler hazırlanmıştır. Katı besiyerinde gerçekleştirilen taramalar neticesinde 24 klonun hem tributirin (Trb) hem de polikaprolakton (PCL) parçalama yeterneği olduğu tespit edilmiştir. Kütinolitik enzim üretme potansiyeli en yüksek olan yani *p*-nitrofenil-bütirat (*p*NP-B) karşında diğer *p*NP-esterlerden daha yüksek özgünlüğe sahip hücre içi ve hücre dışı protein çözeltilerinin elde edildiği klon belirlenmiştir. Bu klondan ekstrakte edilen fosmid DNA *Sma*I restriksiyon enzimi ile 2-6 kb aralığındaki fragmanlara parçalanmıştır. Elde edilen DNA parçaları pUC19 vektörüne klonlanarak *E.coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. Alt klonlardan hem Trb hem de PCL parçalama yeterneği olanı seçilerek içerdiği DNA parçasındaki potansiyel enzime ait açık okuma çerçevesi belirlenmiş ve gen çoğaltılarak pET20b(+)'ya klonlanmış ve *E. coli* BL21(DE3)' de ifade edilmiştir. İfade edilen enzim saflaştırıldıktan sonra maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH'nın sırasıyla 30 ve 7.0 olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, enzimin NaCl varlığında aktivitesi ve kararlılığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, gerçekleştirilen tez kapsamında denizel ortamlarda aktif olabilecek bir kütinolitik esterazın heterolog üretimi sağlanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Fonksiyonel metagenomik, Plastik, Kütinaz, Esteraz, Biyoremediasyon

## ABSTRACT

### DISCOVERY OF A CUTINOLYTIC ESTERASE ENZYME, WHICH ACCELERATE BIODEGRADATION OF PLASTICS, BY FUNCTIONAL METAGENOMIC METHODS

Fatma ŞEN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Molecular Biology and Genetics Programme

Master, August/2023

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ali Osman ADIGÜZEL

In the century we live one of the biggest problem of world face is arising the widespread use of plastics and other synthetic esters. Microorganisms lives in aquatic ecosystems with a high capacity to adapt to the conditions of the current environment as they can adapt to use different carbon source as energy source. However, microorganism-based enzymes responsible to degradation of plastic and other synthetic esters which is not studied extensively. Although, many microorganisms cannot be isolated by cultural methods may have the potential to produce similar enzymes. Therefore, as a topic of thesis, we aimed to discover stable cutinase/esterase enzymes in marine environments by screening the genes from microorganisms which associated with discarded plastic pieces on the beaches of our countryside by using functional metagenomic methods.

In this context, plastic pieces collected from 12 different beaches of country and metagenomic libraries consisting of clones containing 30-40 kb DNA fragments for each area designed. The libraries scanned against specific substrate and 24 clones that capable of cleaving both tributyrin (Trb) and polycaprolactone (PCL). After then, clones show high specificity of pNP-ester activity measured against p-nitrophenyl-butyrate (pNP-B). The fosmid DNA extracted from this clone was fragmented to 2-6 kb with SmaI restriction enzyme. The DNA fragments cloned into pUC19 vector and transformed *E.coli* DH5 $\alpha$  cells. The open reading frame of the DNA fragment determined for subclones degrades both Trb and PCL. This gene amplified and cloned pET20b(+), as final expressed in *E. coli* BL21(DE3). For purified enzyme the temperature and pH at which it showed maximum activity were 30°C and 7.0, respectively. However, the activity and stability of the enzyme in the presence of NaCl measured. Within the scope of this thesis, heterologous production of a cutinolytic esterase that can be active in marine environments has been provided.

**Keywords:** Functional Metagenomic, Plastic, Cutinase, Esterase, Bioremediation

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve tüm yüksek lisansım boyunca tüm yardımları, yönlendirmeleri, emeği ve sabrı için danışmanım ve mentörüm Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman Adıgüzel'e en içten teşekkürlerimi borç bilirim. Bu tez çalışmasını yaparken çalışmada emeği geçen ve yardımlarını esirgemeyen Sümeyye Cilmeli, Zeynep Gül Aytaş, İlknur İnci ve Recep Durgun teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her aşamasında ve her adımında beni destekleyen, yanımda olan aileme, annem AYŞE ŞEN ve babam MEHMET ŞEN'e hem ailem oldukları hem de tüm destekleri için minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Fatma ŞEN

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEZ KABUL VE ONAYI .....                                                                                           | i    |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI .....                                                                               | ii   |
| TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI .....                                                                         | ii   |
| ÖZET .....                                                                                                         | iii  |
| ABSTRACT .....                                                                                                     | iv   |
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....                                                                                            | v    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                  | vi   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                                      | vii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                              | viii |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                                                              | ix   |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                     | 1    |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....                                                                                        | 3    |
| 2.1. Enzim Tanımı .....                                                                                            | 3    |
| 2.2. Enzimlerin Tarihçesi .....                                                                                    | 3    |
| 2.3. Enzimlerin Sınıflandırılmaları ve İsimlendirilmeleri .....                                                    | 8    |
| 2.3.1. Enzimlerin İsimlendirilmeleri ve Sınıflandırılmaları .....                                                  | 8    |
| 2.3.2. Enzim Sınıflandırma Sistemi .....                                                                           | 9    |
| 2.3.3. Enzimlerin Sınıflandırılmasında Kullanılan Altı Ana Grup .....                                              | 10   |
| 2.4. Esterazlar ve Lipazlar .....                                                                                  | 14   |
| 2.4.1. Esterazların Tanımlanması .....                                                                             | 17   |
| 2.4.2. Esterazların Biyokatalitik Aktiviteleri .....                                                               | 18   |
| 2.5. Kütinazlar .....                                                                                              | 19   |
| 2.5.1. Bakteriyel Kütinazlar .....                                                                                 | 20   |
| 2.5.2. Kütinazların Kullanılma Alanları .....                                                                      | 20   |
| 2.6. Plastik Kirliliği ve Biyolojik Geri Dönüşüm .....                                                             | 21   |
| 2.6.1. PET Hidrolizinde Enzimler .....                                                                             | 23   |
| 2.6.2. Kütinazlar ile Poliester Yapıların Yıkımı .....                                                             | 25   |
| 2.7. Metagenomik .....                                                                                             | 27   |
| 2.7.1. Bilimsel Çalışmalarda Metagenomik Yaklaşım .....                                                            | 27   |
| 2.8. Kütinaz Enzimi Önemi ve Metagenomik Yöntemler ile Tez Çalışmasına Konu Olması .....                           | 28   |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                                                        | 31   |
| 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar .....                                                                           | 31   |
| 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler .....                                                          | 33   |
| 3.3. Mikroplastik Plastik Örneklerin Toplanması .....                                                              | 38   |
| 2.3. Plastik Örneklerinden Çevresel DNA İzolasyonu .....                                                           | 39   |
| 3.5. DNA yoğunluğu ve kalitesinin belirlenmesi .....                                                               | 40   |
| 3.6. Agaroz Jel Elektroforezi .....                                                                                | 40   |
| 3.7. 16S rRNA Genlerinin Çoğaltılması için Polimeraz Zincir Reaksiyonu ....                                        | 40   |
| 3.8. Çevresel DNA'ların fragmentasyonu ve geri kazanımı .....                                                      | 41   |
| 3.9. Metagenomik kütüphanelerin oluşturulması .....                                                                | 42   |
| 3.10. Metagenomik kütüphanelerdeki klonların katı besiyerinde enzim üretme kapasitelerinin taranması .....         | 44   |
| 3.11. Fosmid izolasyonu .....                                                                                      | 44   |
| 3.12. Katı besiyerinde enzim üretme kapasitesi olan klonların sıvı besiyerinde enzim üretimlerinin taranması ..... | 45   |
| 3.13. Ekstraselüler ve İntraselüler Ham Enzim Çözeltilisinin Hazırlanması .....                                    | 45   |
| 3.14. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi .....                                                                 | 45   |
| 3.15. Enzim aktivitesinin belirlenmesi .....                                                                       | 46   |

|           |                                                                                                              |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.16.     | Alt klonların oluşturulması ve açık okuma çerçevelerinin tespit edilmesi                                     | 46        |
| 3.17.     | Biyoinformatik çalışmalar.....                                                                               | 48        |
| 3.18.     | Enzim Kodlayan Genlerin Heterolog İfadesi .....                                                              | 49        |
| 3.19.     | SDS-PAGE.....                                                                                                | 52        |
| 3.20.     | Enzimin optimum çalışma pH'sının belirlenmesi.....                                                           | 52        |
| 3.21.     | Enzimin farklı pH'lardaki kararlılığının belirlenmesi.....                                                   | 52        |
| 3.22.     | Enzimin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi .....                                                      | 53        |
| 3.23.     | Enzimin farklı sıcaklıklardaki kararlılığının belirlenmesi .....                                             | 53        |
| 3.24.     | Enzimin NaCL varlığındaki aktivitesinin belirlenmesi.....                                                    | 53        |
| <b>4.</b> | <b>BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>                                                                             | <b>54</b> |
| 4.1.      | Plastik Örneklerinin Toplanması ve Çevresel DNA'ların izolasyonu .....                                       | 54        |
| 4.2.      | Çevresel DNA'ların fragmentasyonu.....                                                                       | 58        |
| 4.3.      | Metagenomik kütüphanelerin oluşturulması.....                                                                | 59        |
| 4.4.      | Metagenomik kütüphanelerdeki klonların katı besiyerinde enzim üretme kapasitelerinin taranması .....         | 59        |
| 4.5.      | Katı besiyerinde enzim üretme kapasitesi olan klonların sıvı besiyerinde enzim üretimlerinin taranması ..... | 61        |
| 4.6.      | Alt klonların oluşturulması ve açık okuma çerçevelerinin tespit edilmesi                                     | 75        |
| 4.7.      | Enzimi Kodlayan Genlerin Heterolog İfadesi.....                                                              | 79        |
| 4.8.      | Enzimin optimum çalışma pH'sının belirlenmesi.....                                                           | 81        |
| 4.9.      | Enzimin farklı pH'lardaki kararlılığının belirlenmesi.....                                                   | 81        |
| 4.10.     | Enzimin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi .....                                                      | 82        |
| 4.11.     | Enzimin farklı sıcaklıklardaki kararlılığının belirlenmesi .....                                             | 83        |
| 4.12.     | Enzimin NaCl varlığındaki aktivitesinin belirlenmesi .....                                                   | 83        |
| <b>5.</b> | <b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                                                                | <b>85</b> |
|           | <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                                                        | <b>88</b> |
|           | <b>ÖZ GEÇMİŞ.....</b>                                                                                        | <b>99</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                   |                                                         |
|-------------------|---------------------------------------------------------|
| AP                | : Amfisilin                                             |
| BOİ               | : Aspartik asit                                         |
| ATP               | : Adenozin trifosfat                                    |
| BSA               | : Dana serumu albumini                                  |
| DNA               | : Deoksiribonükleik asit                                |
| EtBr              | : Etidyumbromür                                         |
| Gly               | : Glisin                                                |
| His               | : Histidin                                              |
| LB                | : Luria Bertani                                         |
| NAD <sup>+</sup>  | : Nikotinamid adenin dinükleotid                        |
| NADH              | : Nikotinamid adenin dinükleotid hidrit                 |
| NADP <sup>+</sup> | : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat                 |
| NCBI              | : Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi                    |
| Ni-NTA            | : Nikel yüklü afinite kolon kromatografisi rezini       |
| NP                | : Naproksen                                             |
| PET               | : Polietilen terafitalat                                |
| PLA               | : Polilaktik asit                                       |
| <i>p</i> NP       | : <i>para</i> -nitrofenol                               |
| <i>p</i> NPA      | : <i>para</i> -nitofenil asetat                         |
| <i>p</i> NPB      | : <i>para</i> -nitofenil bütirat                        |
| <i>p</i> NPH      | : <i>para</i> -nitofenil heksonat                       |
| <i>p</i> NPK      | : <i>para</i> -nitofenil kaprilat                       |
| <i>p</i> NPL      | : <i>para</i> -nitofenil laurat                         |
| <i>p</i> NPM      | : <i>para</i> -nitofenil miristat                       |
| <i>p</i> NPP      | : <i>para</i> -nitofenil palmitat                       |
| Ser               | : Serin                                                 |
| IUBMB             | : Uluslararası biyokimya ve moleküler biyoloji birliği  |
| EDTA              | : Etilendiamin tetraasetik asit                         |
| CHAPS             | : 3-[(3-Kolamidoprol)dimetilammonio]-1-propanesulfonat. |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Enzimler ve genel yapısal çeşitlilikleri.....                                                                                                  | 3  |
| Şekil 2.2. Enzim çalışmalarına katkı yapan önemli gelişmeler.....                                                                                         | 7  |
| Şekil 2.3. $\alpha/\beta$ katlanma yapısına sahip bir esteraz enzimi.....                                                                                 | 15 |
| Şekil 2.4. Aedes aegypti AAEL005112 karboksilesteraz geni ikincil yapısı.....                                                                             | 16 |
| Şekil 2.5. Temel karboksilesteraz hidroliz reaksiyonu.....                                                                                                | 17 |
| Şekil 2.6. Yukarıdaki şematik görsel kütinaz enziminin katlanma yapısı.....                                                                               | 19 |
| Şekil 2.7. Kütinazların birçok farklı alanda kullanımı.....                                                                                               | 20 |
| Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan laminar kabin.....                                                                                                        | 31 |
| Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan hassas terazi, pH metre, ısı bloğu, manyetik karıştırıcı ve vorteks.....                                                  | 32 |
| Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan santrifüjler.....                                                                                                         | 33 |
| Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan yatay elektroforez sistemi, dikey elektroforez sistemi ve güç kaynağı.....                                                | 33 |
| Şekil 3.5. Plastik parçalarının toplandığı kumsalların Türkiye haritası üzerindeki konumları.....                                                         | 38 |
| Şekil 3.6. Örnek toplama sırasında çekilen fotoğraflar ve plastik parçalardan örnekler.....                                                               | 39 |
| Şekil 3.7. Fragmentasyon sonrasında DNA'ların yürütüldüğü agaroz jel.....                                                                                 | 42 |
| Şekil 3.8. Jelden ekstraksiyon için kullanılan protokolün grafiksel özeti.....                                                                            | 42 |
| Şekil 3.9. CopyControl™ Fosmid Library Production (Lucigen) kiti ve içeriği.....                                                                          | 43 |
| Şekil 3.10. Çizilen BSA ve pNP standart grafikleri.....                                                                                                   | 46 |
| Şekil 3.11. pUC19 vektörünün gen haritası ve çoklu klonlama bölgesi.....                                                                                  | 47 |
| Şekil 3.12. pET20b(+) genel haritası ve vektörün T7 promotoru altındaki sinyal dizisi, restriksiyon kesim bölgeleri ve histidin etiketinin konumları..... | 49 |
| Şekil 3.13. PZR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan protokolün grafiksel özeti.....                                                               | 50 |
| Şekil 4.1. Kumsal örnekleme alanlarından toplanan mikropplastiklerden edile DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.....                       | 57 |
| Şekil 4.2. Kumsal örnekleme alanlarına ait izolasyon sonrası DNA çözeltilerinden çoğaltılan 16S rRNA genlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.....    | 58 |
| Şekil 4.3. Kumsal örnekleme alanlarından izole edilen DNA'ların fragmentasyonu sonrasında %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.....                          | 58 |
| Şekil 4.4. Transfeksiyon sonrasında hücrelerin kloramfenikol içeren LB agar besiyerlerinde gelişimi.....                                                  | 59 |
| Şekil 4.5. Transfekte klonların kloroform ile desteklenmiş LB, TrLB ve PcLB agar besiyerlerinde nokta ekimi sonrasında geliştirilmesi.....                | 59 |
| Şekil 4.6. Trb ve PCL parçalayabilen klonlara ait kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zon örnekleri.....                                                  | 60 |
| Şekil 4.7. Kütinolitik aktivite gösteren klonlar.....                                                                                                     | 61 |
| Şekil 4.8. CEV01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri.....           | 62 |

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.9. CEV02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında.....                                    | 63 |
| Şekil 4.10. KIZ01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 63 |
| Şekil 4.11. KIZ02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 64 |
| Şekil 4.12. KON01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında.....                                   | 64 |
| Şekil 4.13. KON02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında.....                                   | 65 |
| Şekil 4.14. GUM01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 65 |
| Şekil 4.15. KAD01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 66 |
| Şekil 4.16. KAD02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 67 |
| Şekil 4.17. KAD03 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 67 |
| Şekil 4.18. KAD04 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 68 |
| Şekil 4.19. ALT01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 68 |
| Şekil 4.20. ALT02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 69 |
| Şekil 4.21. BAY01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 69 |
| Şekil 4.22. BAY02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 70 |
| Şekil 4.23. SIL01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 70 |
| Şekil 4.24. AKL01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 71 |
| Şekil 4.25. AKL02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 71 |
| Şekil 4.26. ATA01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 72 |
| Şekil 4.27. BOL01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 72 |
| Şekil 4.28. BOL01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 73 |
| Şekil 4.29. KAS01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 73 |
| Şekil 4.30. KAS02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri..... | 74 |

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.31. KAS02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim.....                                       | 74 |
| Şekil 4.32. Transformasyon sonrası mavi beyaz seçim, nokta ekim ile kontrolü, seçilen alt-klonların tributirinli LB besiyerinde ve PCL'li LB besiyerinde taranmaları..... | 75 |
| Şekil 4.33. Signal P analiz sonucu.....                                                                                                                                   | 76 |
| Şekil 4.34. Pfam analizi sonucu.....                                                                                                                                      | 76 |
| Şekil 4.35. CEstKAD01'in filogenetik ağaçtaki pozisyonu.....                                                                                                              | 77 |
| Şekil 4.36. Dizi hizalama, CEstKAD01'in GX SXG korunmuş amino asit motifi.....                                                                                            | 77 |
| Şekil 4.37. Pyhre2, CEstKAD01'in GX SXG korunmuş amino asit motifi.....                                                                                                   | 78 |
| Şekil 4.38. PSIPREP web aracı tarafından çizilmiş enzimin domainlerini gösteren grafik ve SWISS-MODEL ile çizilmiş enzimin üç-boyutlu yapısı.....                         | 79 |
| Şekil 4.39. Koloni PCR ile klonların taranması.....                                                                                                                       | 79 |
| Şekil 4.40. Hedef geni içeren pET20b(+) barındıran klonun ekstraselüler enzim aktivitesinin TrLB ve PcLB besiyerlerinde zon oluşumlarının gösterilmesi.....               | 79 |
| Şekil 4.41. SDS-PAGE analizi, hedef geni içeren pET20b(+) barındıran E. Coli'den ifadesi edilen genin görüntülenmesi.....                                                 | 80 |
| Şekil 4.42. Kısmi saf enzimin SDS-PAGE analizi.....                                                                                                                       | 80 |
| Şekil 4.43. CEstKAD01 enziminin farklı pH aralıklarına sahip tamponlar ile optimum pH ortamının belirlenmesi.....                                                         | 81 |
| Şekil 4.44. CEstKAD01 enziminin farklı pH aralıklarına sahip tamponlar ile optimum pH ortamında kararlılığın belirlenmesi.....                                            | 82 |
| Şekil 4.45. CEstKAD01 enziminin farklı sıcaklıklarda aktivite değişiminin belirlenmesi.....                                                                               | 82 |
| Şekil 4.46. CEstKAD01 enziminin farklı sıcaklıklarda kararlılığının belirlenmesi.....                                                                                     | 83 |
| Şekil 4.47. CEstKAD01 enziminin % cinsinden farklı tuz konsantrasyonlarında aktivite değişiminin belirlenmesi.....                                                        | 84 |

## TABLÖLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.1. Enzim komisyonu tarafından belirlenen enzim alt grupları.....                                                                                                                                               | 9  |
| Tablo 2.2. Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin sınıflandırılmasında kullanılan ikinci rakam.....                                                                                                                          | 10 |
| Tablo 2.3. Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin sınıflandırılmasında kullanılan üçüncü rakam.....                                                                                                                          | 10 |
| Tablo 2.4. Transferazların isimlendirilmesinde kullanılan ikinci rakam.....                                                                                                                                            | 11 |
| Tablo 2.5. Transferazların isimlendirilmesinde kullanılan üçüncü rakam.....                                                                                                                                            | 11 |
| Tablo 2.6. Hidrolaz sınıfı enzimlerin isimlendirilmesinde kullanılan ikinci rakam.....                                                                                                                                 | 12 |
| Tablo 2.7. Liyaz sınıfı enzimlerin isimlendirilmesinde kullanılan ikinci rakam.....                                                                                                                                    | 12 |
| Tablo 2.8. Liyaz sınıfı enzimlerin isimlendirilmesinde kullanılan üçüncü rakam.....                                                                                                                                    | 13 |
| Tablo 2.9. Liğaz sınıfı enzimlerin isimlendirilmesinde kullanılan ikinci rakam.....                                                                                                                                    | 14 |
| Tablo 2.10. Esteraz ve Lipaz enzimlerinin nitelik bakımından karşılaştırılması.....                                                                                                                                    | 18 |
| Tablo 3.1. LB Broth besiyerinin bileşenleri ve oranları.....                                                                                                                                                           | 34 |
| Tablo 3.2. LB Broth besiyerinin bileşenleri ve oranları.....                                                                                                                                                           | 34 |
| Tablo 3.3. Liziz çözeltisi bileşenleri ve yoğunlukları.....                                                                                                                                                            | 35 |
| Tablo 3.4. Liziz tamponunun hazırlanması sırasında kullanılan bileşenler.....                                                                                                                                          | 35 |
| Tablo 3.5. TA tamponunun hazırlanması sırasında kullanılan bileşenler.....                                                                                                                                             | 36 |
| Tablo 3.6. PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve miktarları.....                                                                                                                                                       | 41 |
| Tablo 3.7. Ayırma ve yükleme jellerinin hazırlanışı.....                                                                                                                                                               | 52 |
| Tablo 4.1. Mikroplastiklerin yüzeyinden izole edilen DNA'ların yoğunlukları ve A260/A280 değerleri.....                                                                                                                | 56 |
| Tablo 4.2. Farklı örnekleme alanlarındaki DNA parçaları kullanılarak inşa edilen metagenomik kütüphanelerden taranan klonlar arasından TRB, PCL ve her ikisini katı besiyerinde parçalayabilen klonların sayıları..... | 61 |

# 1. GİRİŞ

Global dünyanın yüzleşmesi gereken en önemli sorunlardan biri hızla gelişen ve genişleyen endüstriyel uygulamalardan insani kullanıma kadar plastik, sentetik ester, çözünebilir ester ve benzer moleküler/ kimyasal yapıya sahip (ara)ürünlerin kullanımının meydana getirdiği atıklardır. Oldukça uzun yarılanma ömrüne sahip olan bu yapıların atık olarak doğada birikimi en çok denizel ortamlarda görülmektedir ve bu ekosistemdeki canlıların vücutlarında dahi mevcuttur (Austin vd., 2018). Plastik kullanımının günümüzdeki aşırılığı sonucu bu materyalin doğaya olan zararlarının azaltılması için çaba sarf edilmekle birlikte bu amaca katkı sağlayabilecek bilimsel araştırmalara olan ilgi de oldukça artmış durumdadır. Bahsedilen ortam koşullarında yaşayan canlılardan bulunduğu ortamın şartlarına ayak uydurma kapasitesi çok yüksek olan mikroorganizmalar plastikleri ve türevlerini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmek için kendi enzimatik ve biyokimyasal aktivitelerini evrimleştirerek adaptasyon sağlarlar (Austin vd., 2018). Bu evrimsel dayanaktan yola çıkılarak bahsedilen kimyasal yapıların ortamlardan uzaklaştırılabilmesi için endüstriyel biyoteknoloji ve sentetik biyoteknolojik uygulamalar hızla gelişmektedir. Birçok araştırmacı doğanın halihazırda sahip olduğunu düşündüğü savunma mekanizmasını araştırmak üzere, plastikler üzerinde etkili olabilecek bakterilerin doğadan izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Fakat organizmaların doğadan izolasyonunun çok da kolay olmayışı ile bu çalışmalarda plastiklerin parçalanmasında rol alan bakteriyel metabolitleri belirleyememişlerdir.

Daha güncel yapılan bilimsel çalışmalarda ise endüstriyel kullanım potansiyeli yüksek enzimlerden olan kütinazların (EC 3.1.1.74) yaşamımızda çok yaygın kullanımı olan tereftalik asit ve etilen glikol içeriklerinden oluşan polietilen tereftalat (PET) üzerinde modifikasyon potansiyeline sahip olduğu görülmüştür (Guebitz vd., 2008, Donelli vd. 2009, Suliman vd., 2012). Kütinaz enzimleri ayrıca epoksi ve hidroksi yağ asitlerinden oluşmuş doğal bir polyester olan kütindeki ester bağların hidrolizini gerçekleştirir (Kawai vd., 2019). Kütinazlar alifatik ve aromatik polyesterlerin yüzey modifikasyonunu ve degradasyonunu sağlayabilmeleri nedeni ile potansiyelinin fark edilmesi sonucu yapılan araştırmalar günden güne artarak büyük ilgi görmektedir (Suliman vd., 2012). Ancak günümüzde PET ve benzeri yapıya sahip atıklar üzerine modifikasyon yapabilme yeteneğine sahip sınırlı sayıda kütinaz keşfedilip tanımlanabilmiştir (Suliman vd., 2012). Bu nedenle PET ve benzeri

yapılara etki edebilecek potansiyele sahip yeni kütinazların keşfedilmesi izolasyonu ve karakterize edilmesi büyük önem arz etmektedir. Bahsedilen global soruna çözüm üretebilmek ve literatürden elde edilen veriler ışığında enzim keşfinin ve uygulamalarının biyoteknolojik alanlardaki potansiyelinden yola çıkarak Türkiye'nin sahil ekosisteminde var olan mikrobiyal ekosisteminden esteraz ve PET gibi yapılara etki edebilecek yeni enzimlerin fonksiyonel metagenomik yöntemlerle keşfi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasında genel bir özetle amacımız;

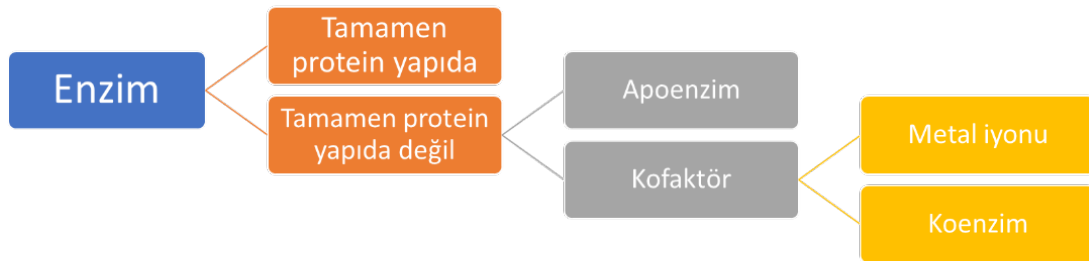
1. Bakteriyel kökenleri kütinazlar üzerinde ise az sayıda bakteri türünde (*Thermobifida sp.*, *Pseudomonas sp.*) çalışma yapılmış olması ve bakterilerdeki metabolik çeşitlilik göz önüne alındığında farklı habitatlarda yapılacak olan araştırmalar neticesinde yeni özelliklere sahip bakteriyel kökenli kütinazların keşfi oldukça muhtemeldir. Bu nedenle bu tez çalışmasında ihtimal dahilinde yeni kütinaz enzim keşfi amaçlanmıştır.
2. Türkiye'nin tüm bölgelerinin sahillerinden toplanan örnekler ile klasik yöntemler olmadan daha güncel ve kullanışlı olabilecek olan fonksiyonel metagenomik yöntemler kullanılarak hedef enzim açısından ülkedeki çeşitliliğe bir bakış getirilebileceği düşünülmektedir.
3. Bakteriyel kökenli kütinazlara yönelik araştırmalar ve yayınlar incelendiğinde denizel ortamlarda aktif ve kararlı kütinaz enzimi keşfine yönelik bilimsel çalışma konusunun ele alınmadığı görülmüştür. Bu proje ile denizel ortamlarda aktif ve kararlı olan kütinazların keşfi ve endüstriyel, çevresel uygulamalarda önemli bir rekabet avantajı sağlayacağı öngörülmektedir.
4. Tez projesi kapsamında elde edilecek enzim farklı amaçlar doğrultusunda üretilecek kimerik protein tasarımı için ve komposit materyal yapımı için kaynak olarak kullanılabilecektir.
5. Bu tez çalışması sonuçları daha ileri protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak hedef enzimin daha verimli hale getirmek amaçlı yeni çalışmalara ışık tutabilmeside önemlidir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Enzim Tanımı

Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Kimyasal bir reaksiyonun hızını artırır ve yapısal ya da herhangi bir bozulmaya uğramadan bulundukları reaksiyonlardan çıkarlar. Diğer bir deyişle, enzimler bir tepkimeyi hızlı şekilde denge pozisyonuna getiren aracı moleküllerdir. Enzimlerin katalizledikleri kimyasal reaksiyonda etkileşime geçtikleri reaktantlar substrat olarak isimlendirilmektedir ve enzimlerin mevcut kimyasal reaksiyonlarda kullandıkları substratlar enzimlere özgüdür (Palmer ve Bonner, 2007).

Tüm enzimler temel de protein yapılıdır ancak yapılarında metaller ya da organik moleküllerde bulunabilmektedir. Bir enzimin protein yapısı dışında kalan kısmı kofaktör olarak adlandırılır ve bir kofaktör tek başına katalitik aktiviteden yoksundur (Palmer ve Bonner, 2007). Kofaktörler bazen organik moleküller (tiamin, riboflavin, biotin, folik asit, B<sub>12</sub> vitamini, piridoksal ve benzeri) olabilir ki bu durumda koenzim olarak isimlendirilmektedirler. Öte yandan, bir ya da birden fazla metal iyonu ( Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ve benzeri) da kofaktör olarak enzimlerin yapısına katılabilmektedir. Bazı durumlarda ise koenzimler metallerle kompleks yapmış bir yapıda yani metalloorganik yapıda da olabilmektedirler. Enzimlerin kofaktörden yoksun inaktif halleri apoenzim olarak adlandırılırken kofaktör ile kompleks haldeki aktif bir enzimin tümü holoenzim olarak adlandırılmaktadır (Martinez-Carrion vd., 1970). Enzimlerin genel yapısal çeşitlilikleri Şekil 2.1’de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Enzimler ve genel yapısal çeşitlilikleri

### 2.2 Enzimlerin Tarihçesi

19. yüzyılın sonuna kadar sütün ekşimesi ve alkolün fermantasyonu gibi süreçlerin mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirildiği düşünülmekteydi. 1833

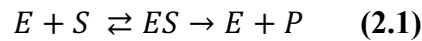
yılına gelindiğinde ise nişastanın parçalanmasında görevli amilaz olarak bilinen aktif yapı/enzim kısmen izole edilebilmiş ve o zamanlarda diyastaz olarak adlandırılmıştır (Armstrong, 1933; Heckmann ve Paradisi, 2020). Bundan kısa bir süre sonra ise gastrik sıvıdan sindirim sisteminde protein içerikli besinlerin parçalanmasını sağlayan pepsin enzimi elde edilmiştir (Fruton, 2002). Bu ve bunun gibi enzim işlevli yapılar zaman içinde fermente ediciler olarak adlandırılmaya başlanır (Kohler, 1971). Justus von Leibig bu fermente ediciler olarak adlandırılan maddenin canlı hücrelerden gelen ancak aktif yaşam formu olmayan yapılar olabileceğini söylemiştir fakat Louis Pasteur ve diğer bilim insanları ise “vitalizm” olarak adlandırılan fermente edicilerin canlılık içermesi gerektiği görüşünü savunmuştur (Kohler, 1973; Manchester, 1995; Heckmann ve Paradisi, 2020; Kochler, 1971).

Fermente ediciler ile ilgili bu çekişme sürerken zamanla fermente edici (ferment) sözcüğünün yerine enzim terimi geçmiştir. Enzim sözcüğü ilk olarak 1878’de Wilhelm Kühne tarafından önerilmiştir ve gerçekte Yunanca “maya-dan”, “mayanın içinden” anlamına gelir (Heckman ve Paradisi, 2020; 3Kühne, 1877). Daha sonra 1897’ li yıllarda Eduard ve Hans Büchner kardeşlerin şeker fermantasyonunun maya özütü eklenerek gerçekleştirildiğini (canlı hücre varlığı olmadan) göstermesi ile daha uygun bir şekilde cansız, canlılık içermeyen kataliz teorisi oluşmuştur (Buchner, 1907).

1926 yılında James Sumner fasulye özütü (jack bean; *Canavalia ensiformis*) kullanarak üreaz enzimini kristallendirmiş ve protein yapıda olduğunu göstermiştir (Sumner, 1946; Sumner, 1968). Devam eden yıllarda ise John H. Northrop pepsin, tripsin ve kimotripsinin de aralarında bulunduğu başka birçok enzimi saflaştırarak kristalendirebilmiştir (Northrop, 1946). Enzimlerin saflaştırılabilmesi işlemi sayesinde birçok enzim saf halde elde edilebilmiş ve bunların yapıları, özellikleri zaman içinde tanımlanabilmiştir (Palmer ve Bonner, 2007). Enzimlerin izolasyonu, saflaştırılmaları ve kristallendirme ile enzimlerin tanımlanması üzerine gerçekleştirilen çalışmalar James Sumner’ın hipotezini desteklemiş ve böylece James Sumner 1946 yılında kimya dalında Nobel ödülü almayı hak kazanmıştır. James Sumner, nobel dersinde enzimlerin önemini “bir organik kimyagerin hiçbir zaman geleneksel kimyasal yollarla bir kamış şekerini sentezleyemeyeceği ancak, enzimler kullanarak sadece kamış şekerini değil, aynı zamanda dekstran, levanı, nişasta ve glikojeni de sentezleyebilecektir” cümlesi ile ifade etmiştir (Sumner, 1946). Böylelikle, enzimlerin

hücre dışında da aktivitelerini belirli koşullar altında koruyabileceği hatta endüstriyel ürünlerin üretimin de dahi kullanılabileceği dünya tarafından kabul görmüştür.

1949 yılına gelindiğinde, çok sayıda enzim sınıfı keşfedilerek kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Pek çok biyokimyasal yolak ve ara ürün tamamen açığa çıkarılmıştır, ancak enzimlerin çalıştığı mekanizma ile ilgili olarak daha çok az şey bulunmuştur. Emil Fischer tarafından 1894'te önerilen ünlü anahtar-kilit modeli ve 1913'ten Michaelis-Menten enzim kinetiği modeli aracılığıyla bir substratın katalizden önce enzime bağlanması gerektiği anlaşılmıştır (Lichtenthaler, 1995; Johnson ve Goody, 2011). Yine de bu bağlanmanın nasıl ilerlediği ve daha sonra katalizin nasıl gerçekleştiği henüz çözülememiş olsa da kinetik çalışmaları yardımı ile türetilmiş Michaelis-Menten modeli ve eşitliği kullanılarak enzimlerin reaksiyon hızını  $10^{17}$  kata kadar arttırdığı hesaplanmıştır. Eşitlik 2.1' de gösterilen modele göre; enzim (E) ve substrat (S), enzim-substrat kompleksini (ES) oluşturmak için tersinir bir şekilde birleşmekte ve daha sonra enzim ve ürün (P) geri döndürülemez bir reaksiyonla serbest bırakılacağı gösterilmiştir. Enzim-substrat kompleksi konsantrasyonunun dengede olduğu varsayımı altında substrat konsantrasyonuna [S], enzim konsantrasyonuna [E] bağlı olarak substrat tüketimini açıklayan Michaelis-Menten eşitliği (2.2) ile de birim zamanda (sn) ilgili enzim tarafından ürüne dönüştürülen substrat sayısı yani turnover sayısının ( $k_{cat}$ ) hesaplanabileceği rapor edilmiştir. Eşitliklerde verilen  $V_{max}$ ,  $E_0$ , ve  $K_m$  sırasıyla maksimum hızı, başlangıçtaki enzim konsantrasyonunu ve Michaelis-Menten sabitini ifade etmek için kullanılmaktadır.



$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{k_{cat} [E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

1948'de Linus Pauling, Fischer'in önerimini geliştirerek detayları 2000'li yıllarda açığa çıkarılacak olan “enzimlerin aktivitesi için geçiş (transisyon) durumunu stabilize etmesi gerektiği” hipotezini öne sürmüştür (Pauling, 1948). 1958 yılına gelindiğinde ise Koshland enzimlerin özgülüğü ile ilgili olarak özet şeklinde de olsa “indüklenmiş uyum” modelini önermiştir (Koshland, 1958).

Tarihsel süreçte enzimin aktivitesinin yanı sıra yapıları ile ilgilide çalışmalara rastlanmaktadır. Yirminci yüzyılın başından beri proteinlerin, amid bağları yoluyla bağlanan amino asit zincirlerinden oluştuğu varsayılmıştır. Ancak, bu dönemlerde bir

enzimi oluşturan proteinin yapısındaki amino asitlerin sırası ve hatta nispi miktarı iyi anlaşılamadığı için mevcut peptit hipotezinin kendisi sıklıkla sorgulanmaktaydı (Fruton, 1990; Koshland, 1959). 1951 yılında, Sanger'in insülin üzerine gerçekleştirdiği çalışma ile daha önce tahmin edildiği gibi insülinin temel yapısının amid bağlarıyla bağlanmış iyi tanımlanmış bir amino asit dizisi olduğunu ortaya çıkarmıştır (Sanger, 1951). Bu çalışması ile de 1958'de kimya dalında Nobel ödülüne layık görülmüştür. Aynı yıllarda enzimler ve proteinlerin yapısı ile ilgili başka önemli önemli çalışmalarda gerçekleştirilmiştir. Bu dönemde Linus Pauling bir amino asit zincirinin düzenli geometrik yapıya ( $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -tabaka) sahip olduğunu öne sürmüştür (Pauling ve Corey, 1951; Armen, 2004). Pauling'in X-ışını kırınımından elde edilen protein düzenli yapılanmanın (ikincil yapı) kanıtı 1951'de Max Perutz tarafından rapor edilmiştir (Perutz, 1951). 1958-1960 yılları arasında ise proteinlerin katlanma yapıları John Kendrew ve Max Perutz tarafından büyük oranda çözümlenmiştir. Hatta bu bulgu onlara 1962 yılında kimya alanında Nobel ödülü kazandırmıştır (Kendrew vd., 1958; Kendrew vd., 1960; Perutz vd., 1960). 1965'te lizozim üzerine gerçekleştirilen bir çalışma ile inhibitörlerin enzim üzerinde bağlandığı bölgeler, enzimin aktif bölgesi ve bu bölgede yer alan amino asitler belirlenebildi (Blake vd., 1965). Bu gelişmeyi takiben (1967) karboksipeptidaz A ve kimotripsin enzimlerinin yapısı çözümlendi (Reeke vd., 1967; Matthews vd., 1967). Karboksipeptidaz üzerine gerçekleştirilen çalışmada enzimin serbest ve substrat bağlı iken yapısal olarak birtakım farklılıklar meydana geldiği belirlendi. Kimotripsin üzerine gerçekleştirilen çalışma ile de proteazların yaygın katalitik üçlüsü ve oksianyon boşluğunu (günümüzde lipazlar, esterazlar, kütinazlar ve diğer bazı hidrolitik enzimlerde de olduğu gibi) ortaya çıkarmanın yolunu bulunmuştur. Bu yapısal çalışmalar 1971'de Protein Veri Bankası (PDB)'nin kurulmasına öncülük etmiştir (Jaskolski vd., 2014). Başlangıçta sadece 7 yapı bulunduran veri tabanı 1979'da 50'ye ve bundan üç yıl sonra da 100 yapıya ulaşmıştır. Günümüzde ise neredeyse 200.000 protein yapısı içermektedir.

Enzimlerin endüstride aktif kullanımları 1970'li yıllarda glukoz izomerazın yüksek fruktoz mısır şurubu üretimde, penisilin açılazın ise 6-aminopenisillanik asit (6-APA) üretiminde kullanılmalarıyla başlamıştır. Enzimlerin daha yaygın olarak kullanılabilmesi için üretimlerinin önemli ölçüde artırılması gerekmektedir. Ek olarak, enzimlerin daha verimli kullanımı için enzim aktif bölgelerinin bir şekilde

modifiye edilmesi gerekmektedir. Her iki sorunun da çözüm anahtarı, DNA'nın proteinleri nasıl kodladığını anlamak ve DNA'yı manipüle etmenin etkili yollarının geliştirilmesindeydi. 1960'ların sonuna kadar gerçekleştirilen protein ve enzim araştırmalarına paralel olarak, DNA araştırmaları da devam ediyordu ve bu sırada genetik kod tamamen çözülmüştür. Ayrıca, 1961'de Anfinsen tarafında DNA'nın amino asit dizilerini kodladığı ve amino asit dizisinin proteinlerin yapısını tek başına belirlediği hipotezi ortaya atılmış ve 1970'lere gelindiğinde büyük oranda kabul görmüştür (Kendrew, 1963).

1970-1980 yılları arasında ise rekombinant DNA ve gen klonlama teknolojileri ile ilgili birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Paul Berg'in 1972'de ilk rekombinant DNA ile ilgili raporu netricesinde herhangi bir organizmadan herhangi bir DNA parçasını başka bir organizmaya aktarmanın mümkün olduğu açıkça gösterilmiştir (Jackson vd., 1972). Bolivar ve Rodriguez (BR) tarafından 1977'de gen aktarımında kullanım amacıyla pBR322 plazmidi geliştirilmiştir (Bolivar vd., 1977). Daha sonra, bu plazmidde pUC plazmit serisi türetilmiş ve böylece gen aktarımının kolorimetrik analiz ile takibi olanaklı kılınmıştır (Vieira ve Messing, 1982). Bu gelişmeler ışığında 1980'li yıllarda DNA insertünün T7 ptomotoru altında seçici olarak ifadesine izin veren pBR322 kökenli pET serisi plazmidler ve buna uygun *E. coli* DE3 gibi konak organizmalar türetilmiştir (Studier ve Moffatt, 1986; Studier vd., 1990). Böylelikle, günümüze gelinceye dek enzim üretimi, modifikasyonu, keşfi üzerine gerçekleştirilen araştırmaların sayısı önemli bir ivme kazanmıştır. Enzim çalışmalarına katkı yapan önemli gelişmeler Şekil 2.2.'deki zaman çizelgesinde özetlenmektedir.



## Şekil 2. 2. Enzim çalışmalarına katkı yapan önemli gelişmeler

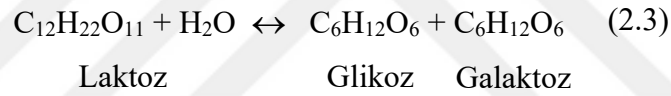
Günümüzde ise enzimler halen birçok bilimsel araştırmanın konusudur ve endüstriyel birçok alandan sağlık sektörüne, gıda sektörüne kadar geniş bir kullanım yelpazesine sahiptirler.

### 2.3. Enzimlerin Sınıflandırılmaları ve İsimlendirilmeleri

#### 2.3.1. Enzimlerin İsimlendirilmeleri ve Sınıflandırılmaları

Enzimler sınıflandırılırken genelde isimlerinin sonuna ‘-az’ eki getirilir. Bu şekilde isimlendirilmenin birçok istinası mevcuttur. Proteolitik enzimler yani proteinlerin yıkılması reaksiyonlarından sorumlu enzimler ‘-in’ ekini kelimenin sonuna ek olarak alır. Örneğin tripsin enzimi bu şekilde yapılan isimlendirmeye bir örnektir.

Enzimlerin bu şekilde yapılan isimlendirilmeleri genelde kullanılan substrattan gelmektedir (Palmer ve Bonner, 2007). Örneğin laktaz enzimi laktoz disakkaritinin yıkımı reaksiyonunda yer alan bir enzimdir ve bu yapının glikoz ve galaktoza hidrolizini hızlandırır reaksiyon (2.3).



Enzimler katıldıkları reaksiyon substratına göre isimlendirilmelerinin yanında katıldıkları reaksiyonun doğasına, gerçekleşme şekline göre de gruplandırılırlar. Ayrıca, katalaz gibi bazı enzimler ise ne substratın ne de reaksiyonun doğasını ifade eden isimlendirme şekline uyar. Katalaz hidrojen peroksidin dekompozisyonunu ifade eder. Buna karşın bazı tip enzimlerde hem substratın hem de reaksiyonun çeşidini ifade eder, örneğin malat dehidrogenaz.

Günümüz genom bilimindeki veri birikimine benzer bir şekilde, enzimoloji ve biyokimya üzerine geçmişten günümüze biyokimyasal reaksiyonlar, enzim kinetiği, kristalografik yapı çalışmaları ile fazlaca bilgi birikimi elde edilmiştir (Cuesta vd., 2015). Bu bilgi birikiminin sonucunda enzimlerin tanımlanması ve isimlendirilmesi bir süre sonra handikap haline gelmeye başlamıştır (McDonald, 2013). Bu nedenle, bu konuda bilim insanları arasında karmaşık ve yoğun bir tartışma konusu olmaya başlamıştır (McDonald, 2013). 1956 yılına gelindiğinde biyokimya ve enzimoloji alanında çalışan bilim insanları daha yenilikçi ve birçok bilgiyi içerebilen bir isimlendirme yöntemi oluşturmuşlardır (Cuesta vd., 2015). Yukarıda ifade edildiği

üzere enzimlerin isimlendirilmesinde farklı ifade şekilleri mevcuttur. Artan enzim çeşitliliği içinde belirli kurallarla bu enzimlerin ifade edilmesi de önemlidir. Buna istinaden 1964'lü yıllarda kurulan Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Topluluğu (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: IUBMB) tarafından bir enzim sınıflandırma düzeni/listesi sağlanmaktadır ve bu liste her yenilendiğinde kurum tarafından duyurulmaktadır (Palmer & Bonner, 2007).

### 2.3.2 Enzim Sınıflandırma Sistemi

IUBMB enzim komisyonu, enzimleri katalizledikleri reaksiyonlara göre temel olarak altı farklı gruba ayırmıştır (McDonald, 2014). Her enzim için o enzimi tanımlayan rakamlardan oluşan ve enzime özel olan bir kod verilmiştir (McDonald, 2014). İlk rakam enzimin hangi ana gruba dahil olduğunu ifade etmektedir (Palmer ve Bonner, 2007).

Tablo 2.1 Enzim komisyonu tarafından belirlenen enzim alt grupları (McDonald, 2014).

| İlk rakam | Ana Grup       | Katalizlenen Reaksiyon Türü                         |
|-----------|----------------|-----------------------------------------------------|
| 1-        | Oksidoredüktaz | Oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları                 |
| 2-        | Transferaz     | İki molekül arası atom veya grup transferi          |
| 3-        | Hidrolaz       | Hidroliz reaksiyonları                              |
| 4-        | Liyaz          | Substrattan bir grubun ayrılması (hidrolizle değil) |
| 5-        | İzomeraz       | İzomerizasyon reaksiyonları                         |
| 6-        | Ligaz          | İki molekülün sentetik olarak birbirine eklenmesi   |

İkinci ve üçüncü rakam ise katalizlenme reaksiyonun çeşidini belirtmektedir (Palmer & Bonner, 2007). Örneğin, ikinci rakam genellikle reaksiyona dahil olan grupları ve bileşeni tanımlamaktadır (McDonald, 2021). Aynı olmayan ama çok benzer olan reaksiyonlara katılan enzimler ilk üç rakam yönünden aynı olmaktadır ancak dördüncü rakam bu enzimlerin asıl substratını ifade ederek bu tip enzimlerin ve reaksiyonlarını ayırtılmasını sağlamaktadır (Palmer & Bonner, 2007).

Önemli noktalardan bir diğeri ise izoenzim olarak adlandırılan aynı reaksiyonları katalizleyebilen farklı enzimler aynı enzim sınıflandırma koduna

sahiplerdir (Pelley, 2012). Laktat dehidrogenaz (E.C. 1.1.1.27) bu tip enzimlere örnektir. İnsan vücudunda aynı reaksiyonu katalizleyen beş farklı laktat dehidrogenaz enzimi aynı kod ile ifade edilmektedir (Palmer & Bonner, 2007).

Tüm enzim katalizörlerin yer aldığı reaksiyonlar belirli oranlarda geri dönüştürülebilir ve reaksiyonda ileri yönde kataliz yapan enzim ile geri yönde kataliz yapan enzimin sınıflandırılması da birbirinden farklıdır (Palmer & Bonner, 2007).

### 2.3.3 Enzimlerin Sınıflandırılmasında Kullanılan Altı Ana Grup

#### 2.3.3.1 Oksidoredüktazlar

Bu tür enzimler bir substrattan diğerine H, O gibi atomların ya da elektron transferinin olduğu reaksiyonlarda katalizör olarak görev almaktadırlar (Paul vd., 2019). Oksidoredüktazların kodlanmasında kullanılan rakamlardan ikincisi ise reaksiyondaki H, O ya da elektron vericisi olan grupları temsil etmektedir (Palmer & Bonner, 2007). Oksidoredüktazların sınıflandırılmasında kullanılan ikinci rakamın anlamını ifade eden örnek Tablo 2.2’de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin sınıflandırılmasında kullanılan ikinci rakamın anlamı.

| İkinci rakam | Hidrojen, elektron verici gruplar |
|--------------|-----------------------------------|
| 1            | CHOH                              |
| 2            | C=O                               |
| 3            | -CH.CH-                           |

Üçüncü rakam ise hidrojen veya elektron alıcısını temsil etmektedir. Oksidoredüktazların sınıflandırılmasında kullanılan üçüncü rakamın anlamını ifade eden örnekler Tablo 2.3’te gösterilmektedir.

Tablo 2.3. Oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin sınıflandırılmasında kullanılan üçüncü rakamın anlamı (Palmer & Bonner, 2007).

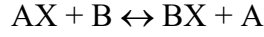
| Üçüncü rakam | Hidrojen, elektron alıcı grup        |
|--------------|--------------------------------------|
| 1            | NAD <sup>+</sup> , NADP <sup>+</sup> |
| 2            | Fe <sup>+3</sup>                     |
| 3            | O <sub>2</sub>                       |
| 99           | Sınıflandırılmamış elektron alıcısı  |

Oksidoredüktazların alışla gelmiş isimlendirilmesinde oksidazlar (H’nin O<sub>2</sub>’ye transferi) ve dehidrogenazlar (H’nin O<sub>2</sub>’ den farklı bir alıcıya aktarımı) da dahil edilir. Böylece, verici ve alıcı belirtilmektedir. Bu duruma örnek olarak laktat dehidrogenaz (E.C. 1.1.1.27) ve izositrat dehidrogenaz (E.C. 1.1.1.41) üzerinden verilebilir (Palmer & Bonner, 2007). Laktat dehidrogenaz enziminin katalizör olduğu reaksiyonda laktat

substratının alkol yan grubunda bulunan hidrojen atomu  $\text{NAD}^+$  grubuna transfer edilmektedir. Benzer şekilde, izositrat substratında bulunan alkol yan grubunun hidrojeni reaksiyondaki  $\text{NAD}^+$  grubuna aktarılmaktadır (Palmer & Bonner, 2007).

### 2.3.3.2 Transferazlar

İki molekül arasında atom ya da grup değişiminin gerçekleştiği reaksiyonlardır örneğin;



Ancak oksidoredüktaz ve hidroliz reaksiyonları bunlara dahil edilmemektedir. Bu enzimlerin sınıflandırılmasında kullanılan dördü kodlama rakamlarından ikincisi transferi gerçekleştirilen grubun isimlendirilmesinden gelmektedir.

Tablo 2.4. Transferazların isimlendirilmesinde kullanılan ikinci rakamın anlamı (Palmer & Bonner, 2007).

| İkinci rakam | Transfer edilen grup                        |
|--------------|---------------------------------------------|
| 1            | 1-Karbon grup                               |
| 2            | Aldehit, keton grup ( $\text{C}=\text{O}$ ) |
| 3            | Açıl grup ( $-\text{COR}$ )                 |
| 4            | Karbonhidrat grup (glikozil)                |
| 7            | Fosfat grup ( $-\text{PO}_4$ )              |

Üçüncü rakam ise transferi gerçekleşen grubu daha ayrıntılı ifade etmeyi sağlamaktadır (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Transferazların isimlendirilmesinde kullanılan üçüncü rakamın anlamı.

| Üçüncü rakam | Transfer edilen grup                  |
|--------------|---------------------------------------|
| 1            | $-\text{CH}_3$                        |
| 2            | $-\text{CH}_2\text{OH}$               |
| 3            | $-\text{COOH}$ ya da $-\text{CONH}_2$ |

Bu grupta sınıflandırmaya uymayan tek istisna enzim fosfat grubu transferinin gerçekleştirildiği reaksiyonlarda görevli transferazlardır. Bu durumda yapılan tanımlama belirli bir oranda mümkün olduğu için transfer edilen grubun alıcısı üzerinden isimlendirme yapılır (Palmer & Bonner, 2007).

### 2.3.3.3 Hidrolazlar

Suyun ( $H_2O$ )  $H^+$  ve  $OH^-$  a hidrolizini gerçekleştiren enzimler için hidrolaz genel isimlendirmesi kullanılmaktadır. Bu tip enzimler genel olarak nükleofilik katılım reaksiyonları göstermektedirler (Paul vd., 2019). Bu gruptaki her bir enzim için yapılan özel isimlendirme ve sınıflandırmasına göre verilen E.C. kodundaki ikinci rakam ise hidrolize uğrayan bağın çeşidine göre değişmektedir (Tablo 2.6) .

Tablo 2.6. Hidrolaz sınıfı enzimlerin isimlendirilmesinde kullanılan ikinci rakamın anlamı.

| İkinci rakam | Hidroliz olan bağ                       |
|--------------|-----------------------------------------|
| 1            | Ester yapıları                          |
| 2            | Glikozidik (karbonhidrat bağları)bağlar |
| 4            | Peptid (-CONH-) bağları                 |
| 5            | C-N bağları (peptidler dışında)         |

Bu kodlama sisteminde geçen üçüncü rakam ise hidrolizi gerçekleşen kimyasal bağın daha ileri seviye tanımlanmasını sağlamaktadır. Örneğin, EC 3.1.1 karboksilik ester (-COO-) hidrolaz enzimini, EC 3.1.2 tiol ester hidrolaz enzimini, EC 3.1.3 fosforik monoester (-O- $PO_3^{2-}$ ) hidrolaz enzimini tanımlamaktadır. Genel kullanılan isimlendirilmeleri ise basitçe etki edilen substratın ismi ve bu isme eklenen ‘-az’ eki ile oluşturulmaktadır.

#### 2.3.3.4 Liyazlar

Bu sınıfa ait enzimler hidrolitik olmayan grupların substratından ayrılıp yer değiştirdiği reaksiyonları tanımlamaktadır. Bu enzimler genellikle ikili bağın olduğu atomlar arasındaki bağı ayrıştırmaktadır (Paul vd., 2019). Bu gruba ait enzimlerin sınıflandırılmasında kullanılan EC kodlama sistemindeki ikinci rakam kırılan bağı ifade ederken üçüncü rakam ise ayrıştırılan grubu ifade etmektedir (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. Liyaz sınıfı enzimlerin isimlendirilmesinde kullanılan ikinci rakamın anlamı.

| İkinci rakam | Kırılan bağ |
|--------------|-------------|
| 1            | C-C         |
| 2            | C-O         |
| 3            | C-N         |
| 4            | C-S         |

Üçüncü rakam için ise, kırılan bağın C-C olduğu ikinci grup temel alınarak Tablo 2.8'deki gibi ayrışan grubu ifade edecek şekilde atanmaktadır.

Tablo 2.8. Liyaz sınıfı enzimlerin isimlendirilmesinde kullanılan üçüncü rakamın anlamı (Palmer & Bonner, 2007).

| Üçüncü rakam | Ayrışan grup                                 |
|--------------|----------------------------------------------|
| 1            | Karboksil grup ( $\text{CO}_2$ )             |
| 2            | Aldehit grup ( $-\text{CH}=\text{O}$ )       |
| 3            | Ketoasit grup ( $-\text{CO}.\text{CO}_2^-$ ) |

### 2.3.3.5 İzomerazlar

Bu sınıfa ait enzimler ise rasemizasyon ve epimerizasyon gibi izomerizasyon reaksiyonlarına katılırlar ve katıldıkları reaksiyonlara göre isimlendirilirler (Paul vd., 2019; Cuesta vd., 2015). EC sınıflandırmasına göre kullanılan ikinci rakam örneğin; 1, rasemizasyon veya epimerizasyon reaksiyonlarını 2, cis-trans izomerizasyonları 3, intramoleküler oksidoredüktazları 4, intramoleküler transfer reaksiyonlarını ifade etmektedir (Palmer & Bonner, 2007). Üçüncü rakam ise izomerizasyon gerçekleşen molekülden gelmektedir. Örneğin; 1, 2 ve 3 numaraları sırasıyla amino asitler, hidroksi asitler ve karbonhidratlar için kullanılmaktadır. Örnek olarak EC 5.1.1.1 numaralı L-alaninin D-alanine dönüşümünü katalizleyen alanine rasemaz enzimi verilebilir.

### 2.3.3.6 Ligazlar

Ligaz grubuna ait enzimler ise yeni oluşan bağların katalizinde görevlidirler (Cuesta vd., 2015). Adenozin trifosfat veya diğer trifosfat yapıları enerji kaynağı olarak kullanılırlar EC kodlama tipinde ise kullanılan ikinci rakam sentezlenen, yeni oluşan bağı vurgularken üçüncü rakam ise oluşan bağın ayrıntılı ifadesini sağlar (Tablo 2.9). Örneğin EC 6.3.1 için asit-ammonia ligaz, EC 6.3.2 için ait-amino asit ligaz bağı oluşumu tanımlanır (Palmer & Bonner, 2007).

Tablo 2.9. Ligaz sınıfı enzimlerin isimlendirilmesinde kullanılan ikinci rakamın anlamı.

| İkinci rakam | Oluşan bağ |
|--------------|------------|
| 1            | C-O        |
| 2            | C-S        |
| 3            | C-N        |
| 4            | C-C        |

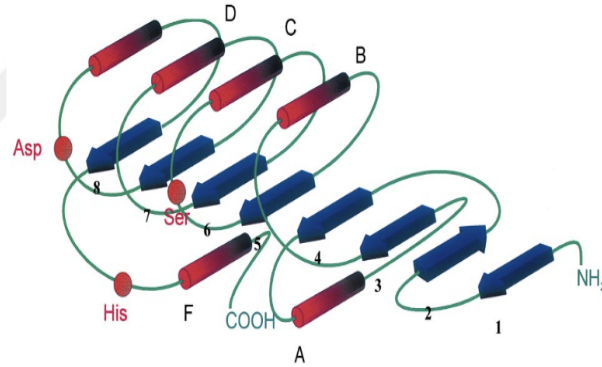
Sınıflandırma ile ilgili olarak, uzaktan akraba enzimlerin sınıflandırılması ve farklı fonksiyonlara sahip homolog enzimlerin sınıflandırılması da ayrıca ele alınmaktadır (Cai vd., 2004). Birbiri ile çok düşük dizi benzerliğine sahip bazı proteinlerin benzer işlevlere sahip olduğu bilinmektedir (Enrigh ve Ouzounis, 2000; Frishman, 1992; Nagano, 1002). Uzaktan akraba olan ve düşük dizi benzerliğine sahip enzimlerin geleneksel dizileme yöntemleri ve kümeleme yöntemleri ile belirlenmesi zordur. Bu nedenle, uzaktan ilişkili proteinlerin fonksiyonel niteliklerinin tahmini için yeni yaklaşımlar getirilmiştir. Bunlar, korunmuş motiflerin sınır ağı analizini (Frishman ve Argos, 1992) enerji analizini (Abagyan vd., 1994) yapıya bağlı dizi hizalamasını (Yang vd., 2002) ve önceden hesaplanmış dizi benzerlik bilgilerini kullanan dizi kümelemesi metodlarına dayalı aile sınıflandırmasını içermektedir (Enrigh vd., 2002).

Farklı fonksiyonlara sahip homolog enzimlerin sınıflandırılmasında homolog proteinlerin mutlaka analog işlevi olması gerekmemektedir (Benner vd., 2000). Bu nedenle, farklı işlevlere sahip homolog proteinleri ayırt edebilen protein işlevi tahmin yöntemleri geliştirmek daha kullanışlı bir yoldur. Bir proteinin işlevi çeşitli faktörler tarafından belirlenebilmektedir. Enzimin aktif bölgesindeki herhangi bir mutasyon, yapısal varyasyonlar ve farklı enzim domainleri homolog proteinler arasında işlevsel çeşitliliğe neden olabilmektedir (Tod vd., 2001). Bu değişiklikler, yerel dizi düzeyinde küçük gibi görünse bile enzim üzerinde fizikokimyasal etkilere neden olabilmektedir. Böylece; enzimin hidrofobiklik, normalleştirilmiş van der Waals hacmi, polarite, polarize edilebilirlik, yük, yüzey gerilimi, ikincil yapı ve çözücü erişilebilirliği gibi özelliklerinde değişimler gözlemlenebilmektedir. (Cai vd., 2004).

## 2.4 Esterazlar ve Lipazlar

Esterazlar ( EC 3.1.1.X) ester bağlarının yıkılıp yeniden yapıldığı reaksiyonları katalizleyen hidrolaz enzim sınıfına ait enzimlerdir. Bu gruba ait enzimler hayvanlar,

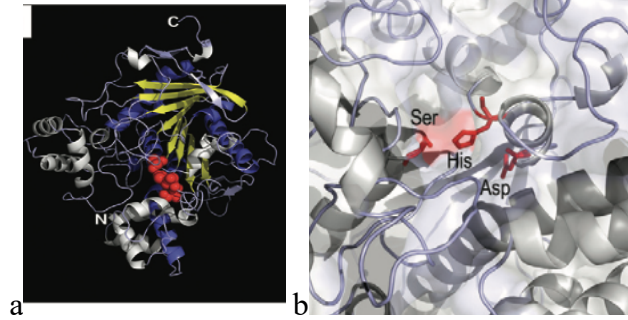
bitkiler ve mikroorganizmalara kadar geniş yayılım göstermektedir (Bornscheuer, 2002). Birçok esteraz türü enzim geniş substrat toleransına sahiptir. Bu enzimler, katabolik reaksiyonlara katılabilmek için evrimsel süreçte birçok etki ve değişim durumlarına maruz kaldıkları için kimyasal olarak birden fazla molekül üzerine etki edebilmektedirler (Bornscheuer, 2002). Esterazların süper aile olarak, birçoğu karboksil esteraz grubudur ve alfa/beta ( $\alpha/\beta$ ) hidrolaz katlanma yapısına sahiptir ( Pfam PF00561 alanı) (Hotelier et al., 2010; Hotelier et al., 2004; Montella et al., 2012; Punta et al., 2012). Alfa/beta hidrolaz katlanması (Şekil 2.3) oluşturan domainler genellikle farklı substratları hidrolize edebilen, işlevsel olarak farklı olan enzimlerde bulunmaktadır (Bornscheuer, 2002). Bu üst aile proteazlar, lipazlar, esterazlar, dehalogenazlar, peroksidazlar ve epoksihidrolazlar gibi enzimleri içermektedir. Ayrıca, Şekil 2.3'te örneklenen alfa/beta katlanma yapısı doğada bulunan en yaygın protein katlanma şekillerinden biridir (Hotelier et al., 2004; Montella et al., 2012; Nardini & Dijkstra, 1999; Ollis et al., 1992).



Şekil 2.3.  $\alpha/\beta$  katlanma yapısına sahip bir esteraz enzimi.  $\beta$ - plakalar (1-8) mavi oklarla gösterilmektedir. Kırmızı kolonlar  $\alpha$ - helikal yapıları (A-F) temsil etmektedir. Katalitik bölgede yer alan serin-aspartik asit-histidin ise turuncu yuvarlan şekiller ile şematize edilmiştir (Bornscheuer, 2002)

Esteraz enzimine olan ilgi kofaktör ihtiyaçlarının olmamasından ve genelde stabil olmalarından kaynaklanmaktadır (Bornscheuer, 2002). Hidrolaz türüne ait bu enzimlerin temelde en önemli iki alt sınıfı bulunmaktadır. Bunlardan biri lipazlar (EC 3.1.1.1), diğeri ise esterazlardır (EC 3.1.1.3). İki tür enzim için de üç boyutlu yapıda karakteristik  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanma motifi mevcuttur (Bornscheuer, 2002). Katalitik bölgesinde serin-aspartik asit-histidin ( bazı lipazlarda aspartik-asit yerine glutamik-asit bulunur) yer almakta ve genelde amino asit dizisinde Gly-X-Ser-x-Gly korunmuş

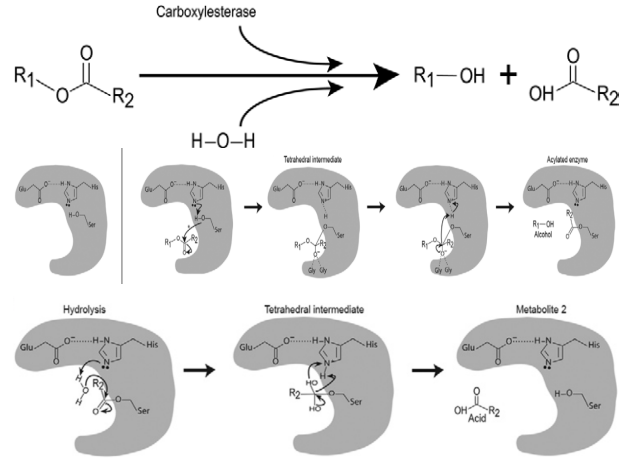
bölgesi aktif serin amino asidinin çevresinde bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Bornscheuer, 2002)



Şekil 2.4. *Aedes aegypti* AAEL005112 karboksilesteraz geni ikincil yapısı. 1: Karboksil esteraz geninin tahmin edilen ikincil yapısı, alfa sarmalı ve beta ikincil yapısı ve oklar ve iplikçi şekiller ile belirtilen halka şeklinde yapı sırası ile karboksil uç (C) ve amino uç (N) kısımlarını belirtir, 2: Katalitik bölgenin ve bu aktiviteyi gösterdiği amino asit üçlü katalitik bölgesi yakın görünüş ile çubuk modeli ile gösterilmiştir (Montella et al., 2012)

Ester bağı hidrolizi ya da oluşumu mekanizması temel olarak lipazlar ve esterazlar için aynıdır. Dört temel aşamadan oluşmaktadır (Montella et al., 2012). İlk olarak substrat enzimin yapısında aktif serin amino asidinin bulunduğu bölgeden bağlanmaktadır. Bu bölgede histidin ve aspartik asit amino asitlerince sabitlenen bir ara form oluşmaktadır (Clinton et al., 2011; Montella et al., 2012; Testa & Krämer, 2007). Sonrasında yapıdaki alkol (-OH) grubu yapıdan serbest bırakılır ve açıl enzim kompleksi meydana gelmektedir. Kimyasal yapıda nükleofilik grubun atağı ile (hidroliz edilen su , alkol ya da transesterifikasyon olan ester) tekrar tetrahedral (dörtgen) bir ara form oluşmakta ve devamındaki çözünme ile ürün oluşumu gerçekleşmektedir (asit veya ester). Böylece son aşamada enzim serbest kalmaktadır (Montella et al., 2012; Ollis et al., 1992; Sogorb & Vilanova, 2002).

Lipaz enzimlerinin apolar-sıvı ortamında aktivitesinin görece daha yüksek olması bu enzimleri esterazlardan ayırmaktadır ve bu durum ‘ ara yüzey aktivasyonu (interfacial activation)’ olarak adlandırılmaktadır. Esteraz enzimleri ise klasik Michaelis-Menten kinetiğine uyan enzimlerdir (Bornscheuer, 2002). Lipazlar en yüksek enzimatik aktivitelerini gösterebilmek için belirli bir oranda substrat yoğunluğuna ihtiyaç duymaktadırlar (Bornscheuer, 2002).



Şekil 2.5. Temel karboksilesteraz hidroliz reaksiyonu. Karboksilesterler karboksilesterazlar tarafından su varlığında alkol ve asit metaboliti olarak parçalanmaya uğrarlar. Karboksilesteraz enziminin bir karboksil esteri nasıl katalizlediğini tüm reaksiyon adımları ile göstermektedir (Montella et al., 2012)

Lipazlar için yapılan yapısal araştırmalar sonucu bu enzimlerde hidrofobik bölgenin (kapağın) lipaz enzimlerinin aktif bölgelerini çevrelediğini ve belirli bir oranda substratın bu bölgeye ulaşması sonrası bu bölgenin artık substrat tarafından ulaşılabilir ve açık hale geldiği Şekil 2.5’ de gösterilmiştir (Montella et al., 2012). Ayrıca, lipazların suda çözünmeyen, genellikle uzun yağ asitlerinden oluşan trigliserit yapıları, substratları tercih ederken esterazların ise daha basit yapılı etil asetat gibi yapıları tercih ettikleri rapor edilmektedir (Montella et al., 2012). 2000’li yılların başında yapılan bir çalışmaya göre lipazlar ve esterazlar üç boyutlu yapıca ve amino asit sekansları ile karşılaştırılmış ve bu iki enzimin türünün birbirinden pH-bağımlı elektrostatik bir tür imzaya sahip oldukları görülmüştür (Montella et al., 2012). Lipazların aktif bölgesi pH-bağımlı (pH 8) negatif bir potansiyelde olduğunda en yüksek aktiviteye sahiptir. Esterazlar ise bu duruma benzer bir davranış gösterirler fakat pH 6 iken genelde bu durum geçerlidir, yani daha düşük pH değerlerinde optimal aktiviteye sahiptir (Bornscheuer, 2002).

#### 2.4.1 Esterazların Tanımlanması

Esterazların tanımlanması ve aktivitelerinin belirlenmesi genellikle kromoforik para-nitrofenil ester veya tribütirinli besi yerleri gibi belirteçler ile sağlanabilmektedir. Esteraz enzimi üreten organizmalar suda çözünmeyen trigliseritler gibi substrat içeren besi ortamlarında zon oluşturabilen organizmalar üzerinden tanımlanabilmektedir.

Lipazlar, karboksil esterazlardan substrat spesifikliğine göre ayrıştırılabilir. Örneğin, para-nitrofenil palmitatın lipazlar tarafından yıkımı gerçekleştirilirken para-nitrofenil bütirat yıkımı çoğunlukla esterazlar tarafından gerçekleştirilebilmektedirler

(bazen bazı lipazlarda yıkımını gerçekleştirebilir). Esterazlar ve lipazlar arasındaki birtakım farklılıklar Tablo 2.10’da özetlenmektedir.

Tablo 2.10. Esteraz ve Lipaz enzimlerinin nitelik bakımından karşılaştırılması (Bornscheuer, 2002)

| Nitelik                 | Lipaz                         | Esteraz              |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------|
| Substrat Tercihi        | Trigliseritler, ikincil alkol | Basit esterler       |
| Aktivasyon/Kapak        | Evet                          | Hayır                |
| Substrat Hidrofobikliği | Yüksek                        | Yüksekten düşüğe     |
| Enantiyoseçicilik       | Genellikle yüksek             | Yüksek, düşük, sıfır |
| Çözücü sabitliği        | Yüksek                        | Yüksek, düşük        |

## 2.4.2 Esterazların Biyokatalitik Aktiviteleri

### 2.4.2.1 Optikçe Saf Bileşik Sentezi

Birçok karboksil esteraz enziminin farklı konakçı hücrelerde ifadesinin yapıldığı bilinmektedir (Bornscheuer, 2002) ve bu enzimlerden sadece birkaç tanesi optik olarak saf bileşiklerin sentezlendiği reaksiyonlarda kullanılabilmektedir (Bornscheuer, 2002). Bunun başlıca nedenleri arasında, sınırlı ticari mevcudiyetleri ve sıklıkla gözlenen orta derecede enantiyoseçicilik gösterilebilir (Bornscheuer, 2002).

Muhtemelen en iyi incelenmiş olan, *B. Subtilis* temelli olan karboksil esteraz naproxen (NP, steroidal olmayan bir anti-inflamatuvar ilaç) dir (Bornscheuer, 2002; Quax & Broekhuizen, 1994). Naproksenin yanı sıra yüksek enantiyoseçiciliğe sahip çeşitli 2-arilpropiyonik asitler de üretilir (Azzolina & Collina, 1995; Bornscheuer, 2002). Karboksil esteraz NP, 32 kDa’lık bir moleküler kütleyle, 8,5 ile 10,5 arasında optimum pH’a ve 35 ile 55°C arasında optimum bir sıcaklığa sahiptir (Bornscheuer, 2002). Karboksil esteraz NP, hücre içi bir protein olarak üretilir (Bornscheuer, 2002). Birçok farklı organizmadan temel alan karboksil esterazlar, karboksilik asit, birincil alkol, ikincil alkol ve üçüncül alkol yer aldığı reaksiyonları katalizleyerek kiral yapılarını üretir (Bornscheuer, 2002).

### 2.4.2.2 Diğer Uygulama Alanları

Esterazlar, kemo- veya bölgesel seçiciliğin gerçekleştiği reaksiyonlarda da kullanılabılır (Bornscheuer, 2002). En belirgin örnek, pektin veya ksilan gibi bitki hücre duvarı polisakkaritlerinden ferulik asidin salınması reaksiyonunda karboksil esterazların kullanılmasıdır (Bornscheuer, 2002). Ksilanlarda, ferulik asit, ksilan ana yapısına bağlı arabinoz bölgelerine bağlanır. Pektinlerde, ferulik asit, yan zincirlerde galaktoz veya arabinoz ile bağlantılı olabilir (Bornscheuer, 2002). Bu şekilde elde

edilen ferulik asit, enzimatik olarak tat bileşeni olan vaniline dönüştür (Falconnier et al., 1994; Lesage-Meessen et al., 1996).

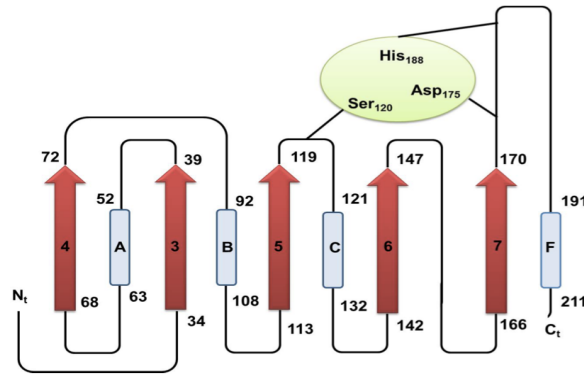
Mikrobiyal karboksil esterazlar, *Acinetobacter* sp. (Jones et al., 1999) benzil esterlerden bir asit açığa çıkarır. Elde edilen benzil alkoller daha sonra dehidrogenaz enzimlerince benzoatlara oksitlenir ve ayrıca L-ketoadipat yolağında metabolize edilir (Bornscheuer, 2002).

Başka bir endüstriyel önemi olan reaksiyon ise *B. Subtilis*'un para-nitrol benzil esterazında olduğu gibi özellikle Lorakarbef antibiyotiğindeki koruyucu gruplarının yavaşça uzaklaştırılması reaksiyonudur (Zock et al., 1994). Enzim, dimetil formamid içinde yalnızca zayıf bir şekilde kararlı olduğundan, esteraz, yapay olarak yönlendirilmiş evrim yoluyla geliştirilmeye çalışılmıştır (Bornscheuer, 2002).

## 2.5 Kütinazlar

Kütinazlar, alifatik polyester olan ve birçok bitkinin doğal bir şekilde var olan kendini koruma bariyeri olan kütinleri parçalamaları ile tanınmış ve keşfedilmişlerdir (Liang & Zou, 2022). Kütinaz enzimleride lipaz ve esteraz enzimleri gibi  $\alpha/\beta$  hidrolaz ailesi enzim ailesinin bir üyesidir (Liang & Zou, 2022). Diğer  $\alpha/\beta$  hidrolaz enzimlerinden farklı Kütinazlar farklı birtakım özelliklere sahiptir (Liang & Zou, 2022). Kütinazlar  $\alpha/\beta$  hidrolazların en küçük moleküler ağırlığa sahip üyesidir. Lipaz ve kütinazlar Ser-His-Asp katalitik bölgesine sahiptir fakat kütinazlar (Şekil 2.6) aktif bölgeyi çevreleyen bir kapak yapısına sahip değildir bu nedenle kütin dışında da birçok çeşitli substrat bu enzimin hedefi olabilir (Liang & Zou, 2022). Kütinazlar evrimsel süreçte birçok değişime uğramıştır bu nedenle çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Örneğin, kütinazların biyodegradasyon yetileri yalnızca büyük moleküler yapılı olan kütin ve sentetik plastiklerle sınırlı değil aynı zamanda düşük moleküler yapılı ester veya trigliseroller içinde aktiflik gösterir (Liang & Zou, 2022).

Daha önceden yapılan yayınlardan birçok kütinaz enziminin, ki bunlar mantar, bitki, bakteri kökenli olabilir çeşitli kütin, bitkisel yağ veya doğal olmayan polyesterlere etki edebildiği gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Yukarıdaki şematik görsel kütinaz enziminin katlanma yapısını göstermektedir. Beş  $\beta$ -ikincil yapısı 3 rakamından 7 ye kadar ve dört  $\alpha$ - ikincil katlanma yapısı A,B,C,D alfabetik harfleri ile gösterilmiştir (Martínez & Maicas, 2021)

Kütinazların farklı substratlara olan ilgisi ve özellikle endüstriyel ve biyoremediasyon alanındaki potansiyeli araştırmacıların ilgisini çekmektedir ve böylece farklı araştırmalara konu olmaktadır (Liang & Zou, 2022).

### 2.5.1 Bakteriyel Kütinazlar

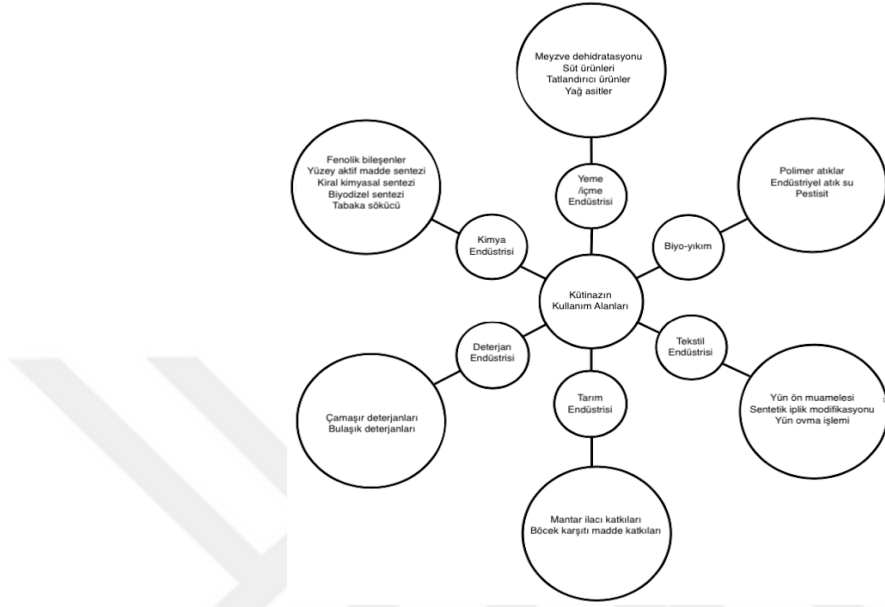
Birçok bilimsel çalışmanın konusu olan mantar kaynaklı kütinazların dışında bakteri temelli kütinazlarda kendilerine has özellikleri ile ilgi çekmektedirler (Liang & Zou, 2022). Katalitik aktivite bakımından bakteri ve mantar temelli kütinazlar çok benzerdirler ve her ikisinde de aktif Ser-His-Asp katalitik üçlüsü mevcuttur (Liang & Zou, 2022). Ancak bakteri kaynaklı kütinaz enzimlerinde amino asit kompozisyonunda mantar ile bitkiden farklı olarak özellikle metionin, histidin ve lizin amino asitleri tekrarları farklıdır (Liang & Zou, 2022). Bu farklılıktan dolayı bakteriyel kütinaz enzimleri en iyi aktivitelerini pH 8,5-10,5 aralığında verir (Liang & Zou, 2022). Önemli noktalardan bir diğeri de bakteriyel kütinazların mantar temelli olanlardan daha iyi termal ısıl kararlılığa sahip olmasıdır bu özellik endüstriyel uygulamalar için ayrıca önemlidir (Liang & Zou, 2022).

Bakteriyel kütinazlar aktif serin yönelimli organofosfat ve organoboronik asit gibi kimyasallar ile inkübe edilebilir (Liang & Zou, 2022). Bu mekanizma ile enzimlerin aktif serin bölgesi karakteristiği doğrulanır. Ancak tiol-yönelimli kimyasallar ve metal iyon yakalayıcılar aktivitesini etkilemez (Dutta vd., 2009).

### 2.5.2 Kütinazların Kullanılma Alanları

Kütinazlar popüler endüstriyel kullanımı olan enzimler arasındadır. Bu alanda kullanılan Kütinazlar yüksek kararlılık ve etkinliğe sahiptir. Kütinazlar Şekil

2.7’te özetlendiği gibi yiyecek endüstrisine, deterjan, tarım, yeme/içme, tekstil endüstrisi gibi çeşitli alanlara hitap eder. Bu alanlarda en yeni trendlerden biri ise kütinaz enziminin doğal veya bazı mühendislik yöntemler ile değiştirilmiş kütinazların doğal olmayan substratlara karşı biyo-katalitik araç olarak kullanılmasıdır.



Şekil 2.7. Kütinazların birçok farklı alanda kullanımına dair özet halinde bir diyagram (Liang & Zou, 2022)

## 2.6 Plastik Kirliliği ve Biyolojik Geri Dönüşüm

1990'lerden bu yana, küresel çevre kriziyle ilgili endişe nedeniyle, sentetik polimerlerin biyolojik bozunmasına ilişkin araştırmalar yoğun bir şekilde desteklenmiştir (Kawai et al., 2019). Buna bağlı olarak, biyobozunur polimerlerin üretimi giderek artmıştır, ancak yine de toplam plastik üretiminin düşük bir yüzdesini bu tür polimerler oluşturmaktadır. Bununla birlikte, petrol bazlı üretimden biyo-bazlı üretime geçiş bu tür yapılan üretime olan ilgiyi artırmıştır (Kawai et al., 2019). Plastik kullanımı sonucunda gerçekleşen plastik imhası, dünya nüfusundaki ve gelişmekte olan ülkelerdeki gayri safi milli hasıladaki artışla tutarlı bir şekilde artmaktadır (Kawai et al., 2019). Pek çok ülkede petrol bazlı plastiklerin biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerle değiştirilmesi ve kullanılmış plastiklerin geri dönüştürülmesinin teşvik edilmesi için çaba gösterilmesine rağmen, plastik atıkların çoğu karaya ve okyanuslara atılmaktadır.

Kara parçalarına atılan plastikler, oksijen ve güçlü güneş ışığına maruz kalmaktadır ve bunun sonucunda plastik atıkların yüzeyinde kısmi bozulmalar,

çatlamalar meydana gelir bu olayın sonucu olarakta özellikle deniz ekosisteminde ciddi sorunlara neden olan mikroplastikler oluşur (Moore, 2008). Çevresel mikroplastiklere ek olarak, diş macunları ve kozmetikler gibi ev ürünlerinde de plastik mikro-boncuklar kullanılmaktadır (Kawai et al., 2019). Deterjanlar ve lifli birtakım ürünlerden gelen mikroplastikler kullanımlarının sonunda kanalizasyon sistemi aracılığıyla okyanus ekosistemine karışır (Browne et al., 2011). Mikroplastikleri boyutlarına göre tanımlamak çok zordur, çünkü çeşitli şekillerde küçük plastik parçalar içerir (Kawai et al., 2019). Mikroplastikler, bazı bilim insanları tarafından 1 mm'den küçük plastik parçacıklar, diğerleri tarafından 5 mm'den küçük parçacıklar olarak tanımlanmıştır (Kawai et al., 2019). Mikroplastiklerin çoğu su kütlelerinde yüzer ve doğal olarak hayvanlar, kuşlar ve balıklar tarafından besinlerle alımları gerçekleşir. Hatta 1960'lı yıllarda midesi plastik poşetlerle dolu bir balinanın açlıktan ölü bulunduğu rapor edilmiştir. Bilim insanları, mikroplastiklerin genellikle kuşların ve balıkların midesinde ve deniz suyunda bulunduğu ve bu nedenle gıda zinciri yoluyla insanlar tarafından alınabileceğine dair bir uyarı yayınlamıştır. Hatta günümüzde mikroplastiklerin birçok hayvanın ve insanın sindirim sisteminde gözlemlendiği bilimsel çalışmalarca da rapor edilmiştir (Kawai et al., 2019). Mikroorganizmaların, insanlar tarafından salınan kirleticilerin temizlenmesinde ve ekosistemdeki malzeme dolaşımında önemli rol oynadığı ve polimerik malzemelerin mikrobiyal/enzimatik bozunmasını başlattığı veya sürdürdüğünü 1990'lı yıllardan bu yana bilinmektedir. Polietilen tereftalat (PET) polietilen diğer polipropilen, polistiren, polivinil klorür ve poliüretan yapıları plastikler gibi önemli plastiklerden biridir ve dünya çapında üretimi 2013 yılında 56 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (Neufeld L et al., 2016). Polietilentereftalatın PET'in şişe, elyaf, film ve kap imalatı gibi çeşitli uygulamaları vardır. Kullanımdan sonra, PET şişeler birçok yoldan geri kazanılabilir ve birçok ülkede geri dönüşüm sistemleri çalışır, ancak genel geri kazanım oranı yarıdan azdır ve yalnızca sınırlı bir miktar yeni ürüne geri dönüştürülebilir. Halihazırda, büyük miktarlarda PET çöpleri depolama alanlarına gider veya atık olarak bırakılır. Bu noktada PET çöplerinin çevreye salınmasını önlemek, kullanılmış PET atığını uygun biyolojik, kimyasal ve fiziksel işlemlerle geri kazanmak için karşı önlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. PET'in enzimatik geri dönüşümü 20 yılı aşkın bir süredir araştırılmaktadır ve bu araştırma halen devam etmektedir. Biyo-bozunur plastiklerin çoğu polyester olmasına rağmen ( polihidroksialkanoat, polikaprolakton, polibütilen süksinat, polibütilen süksinat-ko-adipat ve poli(bütilen adipat-ko-

tereftalat) (PBAT)), yine polyester bir yapı olan PET, biyo-bozunmaya daha dirençlidir (Kawai et al., 2019). Polyesterler üç gruba ayrılır, alifatik, alifatik-ko-aromatik ve aromatik. Alifatik polyesterler (doğal ve sentetik), ortam sıcaklığında çeşitli ester bağı hidrolazları tarafından hidrolize edilir. Alifatik-ko-aromatik poliesterlerin enzimatik hidrolizle parçalanması zordur, ancak karboksilesteraz (EC 3.1.1.1), triasilgliserol lipaz (EC 3.1.1.3) gibi karboksilik ester hidrolazlar (EC 3.1.1) arasında PBAT'ı parçalayan birçok olası enzim tanımlanmıştır. Aromatik polyesterler (PET) üzerinde etkili olan poliesteraz *Thermobifida fusca*' dan ilk olarak bir Alman araştırma grubu tarafından keşfedilmiş ve rapor edilmiştir (Müller et al., 2005). Kütinazlar karboksilik ester hidrolazlardır yapraklardaki kütiküler tabakanın kütinini veya ağaç kabuğundaki süberini bozabilirler. Kütinazlar üzerine araştırmalar fitopatogenik mantarlarla başlamıştır ve *Fusarium solanipisi*' den elde edilen kütinaz kapsamlı şekilde karakterize edilmiştir (Heredia, 2003; PE, 1981). Daha sonra polyester bozunması üzerine yapılan araştırmalar sonucunda kütinazların polyesterlerin hidrolizinde önemli bir rol oynadığı keşfedilmiştir (Baker et al., 2012; Tokiwa & Calabia, 2007; Zimmermann & Billig, 2011). Aslında bilinen tüm PET hidrolazlar kütinaz grubuna aittir. Yapılan başka çalışmalarda PET hidrolize edici kütinazların kristal yapıları substrat bağlama alanını belirlemek ve daha iyi enzimler elde etmek için incelenmiştir.

### 2.6.1 PET Hidrolizinde Enzimler

Enzimatik PET bozunmasının önemli mekanizması, PET liflerinin yüzey hidrofillenmesi ve böylece yıkıma hazır hale gelmesidir. Birçok fibril davranış faktörlerini iyileştirmek için yalnızca yüzey modifikasyonu yeterlidir, ancak PET'in iç yapı bloğunun bozulması lif yapıyı zayıflatır ve elverişsizdir. *Candida antarctica* (Vertommen vd., 2005), *Thermomyces lanuginosus* (Eberl vd., 2009), *Burkholderia spp.* (Lee ve Chung, 2009) ve *Triticum aestivum* (Nechwatal vd., 2006); mantarlarından olan kütinazlardır, *Aspergillus oryzae*, *Humicola insolens* (Ronqvist vd., 2009), *Penicillium citrinum* (Liebminger vd., 2007) ve *Fusarium solani* (Alisch-Mark vd., 2006; O'Neill vd., 2007); ve aktinomisetlerden olan kütinazlardır, *T. fusca* (Brueckner vd., 2008), *Thermobifida cellulosilytica* (Herrero Acero vd., 2011), *Thermobifida alba* (Ribitsch vd., 2012b), *Saccharomonospora viridis* (Kawai vd., 2017); olan esterazlar (*Thermobifida halotolerans*, Ribitsch vd., 2012a); ve karboksilesterazlardır (Billig vd., 2010). Bir proteaz olan papain bile polyester

kumaşların hidrofilikliğini artırabilir (Kim ve Song, 2010). İster elyaf ister film olsun PET'in yüzeyinde, polimer zincirlerinin uçlarının uzantılar oluşturması beklenir veya polimer zincirinin bir kısmı birilmek oluşturabilir ve bunlar karboksilik asit ve hidroksil kalıntılarına hidrolize olur, böylece yüzey hidrofilikliğı artar . Herhangi bir PET tekstili veya filmi, yüzey hidrolize edilebilir bir polimer ucuna veya bir ilmeğe sahip olabilir (Kawai vd., 2017; Zimmermann ve Billig, 2011). Bazı araştırmacılar modifiye edici enzimleri PET hidrolazlar olarak adlandırdılar. Ancak, Müller ve ark. (2005) ilk olarak PET filmin iç bloğunun görünür bozunmasını bildirmiştir, burada bozunma oranı yüzey hidrolize edilebilir artıklarından çok daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu durumun anlaşılmasından sonra, PET yapısının iç yapı bloklarını bozunmaya uğratabilen birkaç kütinaz enzimi rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada ise bu enzimler iki gruba ayrılmıştır. Bunlar PET yüzey-modifiye enzimleri , sınırlı oranda yüzey bozunması sağlayabilen enzimler ve diğer grup ise PET hidrolazlar, belirli bir şekilde PET yapısının iç yapı bloklarını en az % 10 oranında bozulmaya uğratabilen enzimleridir ve bu bozunma SEM mikroskopunda gözlemlenebilir (Kawai vd., 2019).

### **2.6.2 PET Hidrolizinin Biyokimyasal Temelleri ve Katalitik Mekanizması**

PET filmlerin enzimatik hidrolizi ilk olarak Müller ve ark., (2005) poli(butilen tereftalat-ko-adipat) (BTA) hidrolize eden *T. fusca*'nın (kompostta öncelikli tür olarak bilinir) enziminin saflaştırılması sonrası raporlanmıştır. Müller ve ark. (2005), rekombinant olmayan ve de rekombinant hidrolazların iki tür PET filmi 55 °C'de 3 hafta içinde yaklaşık %40-50 oranında hidrolize ettiğini bildirmiştir, ancak DNA sekansına ilişkin ayrıntılı bilgi gösterilmemiştir.

p-Nitrofenol (p-NP) açıl ester üzerindeki aktivite ile ilgili olarak, esterazlar kısa zincirli asil esterler üzerinde, kütinazlar kısa-orta zincirli asil esterler (yaklaşık olarak C8–C10'a kadar) ve lipazlar orta-uzun zincirli asil esterler (C10'dan fazla). Kütinazların kesin bir tanımı, kütinin hidrolizine bağlıdır. Literatürde bazı poliesteraazların (örn., BTA-1 ve Tfu0883) kütinaz aktiviteleri doğrulanırken (Kleeberg vd., 2005; Chen vd., 2008), bazı poliesteraazların (örn. Cut190 ve Tha\_Cut1) kütinaz aktiviteleri analiz edilememiştir (Kawai vd., 2014; Ribitsch vd., 2012b). Kütin ve bileşenleri ticari olarak mevcut değildir ve kütin hidrolizinin belirlenmesi zahmetlidir. Bununla birlikte, bitki patojenleri için kütinaz aktiviteleri önemli olmasına rağmen, kütin bozunması poliesteraazlar için çok önemli değildir

(Kollattukudy, 1981; Heredia, 2003). Ek olarak, PET hidrolazların ve homolog enzimlerin X-ışını kristalografisi kökenlerine bakılmaksızın yapılarının hemen hemen aynı olduğunu literatürde açıkça ortaya konulduğu ifade edilmiştir (Kawai, 2019). Bu nedenle, hepsini kütinaz üyeleri olarak kategorize etmek bir noktada mantıklı hale gelmektedir.

PETaz'ın bir PET hidrolaz olarak sınıflandırılması konusunda birtakım şüpheler olduğu literatürde Kawai ve ark. (2019) tarafından rapor edilmiştir. Bir filmin fiziksel özellikleri, polimer zincirlerinin kristallığı, yönelimi ve yüzey topolojisi, enzim etkinliği ve bunun sonucunda ortaya çıkan bozunabilirliğini ciddi şekilde etkilemektedir.

Özetle, tüm etkili PET hidrolazlarının ve hatta PBAT'ı parçalayan enzimlerin kütinazlar ve homolog enzimler olduğuna şüphe yoktur. Kütinazların benzersiz özellikleri, enzim aktif bölgesini çevreleyen bir çeşit kapak yapıdan yoksun olan protein yapılarına bağlıdır, ancak kapak yapının lipazlarda ara-yüzey aktivasyonuna neden olduğu bulunmuştur. Kütinazlar genellikle çözücü ve substrat ile etkileşimde olabileceği açık aktif bölgelere sahiptir. Bu durum lipaz, esteraz ve kütinazların PET'in yüzey modifikasyonunu yapmasına rağmen, PET hidrolazlarının neden kütinazlarla sınırlı olduğunu açıklayabilir. Esterazlar, p-NP'nin kısa zincirli açıl esterleri üzerinde daha yüksek aktivite sergilemeleri ile tanımlanırlar (Bornscheuer, 2002), bu da hidrofobik PET' i tanımayacaklarını düşündürür. Ancak kütinazlar, esterazlara göre daha uzun p-NP açıl esterler ve hidrofobik kütinler üzerinde etki gösterir (Chen vd., 2013). Daha önce de belirtildiği gibi kütinazlar ilk olarak patojenik mantarlardan, tipik olarak bitkilerin kütiküler tabakasını istila eden *F. solani pisi*'den incelenmiştir (Kollattukudy, 1981; Heredia, 2003). *P. citrinum* (Liebminger vd., 2007) ve *H. insolens* (Ronqvist vd., 2009) gibi patojenik olmayan mantarlar da kütinaz üretir. HiC dışında, bugüne kadar hiçbir mantar PET hidrolaz belgelenmemiştir.

Kütinazlar, fitopatojenik ve fitopatojenik olmayan mantarlardan olanlar da dahil olmak üzere mantar kütinazları ve aktinomisetlerden ve diğerleri dahil bakteriyel kütinazlar olarak gruplandırılmıştır. Bakteriyel kütinazların filogenetik ağacı, PETaz'ın termofilik olmayan bakterilerden hidrolazlarla bir grup oluşturduğunu ve aktinomiset kütinazların ayrı bir grup oluşturduğunu Kawai vd., (2019) tarafından rapor edilmiştir.

## **2.6.2. Kütinazlar ile Poliester Yapıların Yıkımı**

Polyesterlerin ve plastiklerin kütinaz enzimi aracılığı ile yıkımının gerçekleştirilebilmesi güncel bir konudur. Artan poliester ve plastik kullanımı ile Dünya yüzeyinde giderek artan ve tüm ekosisteme zara veren bir atık ürün kirliliği baş göstermektedir. Kütinaz enzimleri geniş oranda ticari poliesterler (polietilen terafitalat, PET), polilaktik asit (PLA), sentetik polimerler, polikaprolakton (PCL) yıkımı gerçekleşebilen poliesterler olmalarına rağmen yüksek hidrofobiklik ve kristallenme isteği gibi nedenler yüzünden bu işlem çok yavaş gerçekleşmektedir (Liang & Zou, 2022). Bazı organizmalardan gelen kütinaz enzimleri PCL'nin hidrofobik bariyerini aşarak yıkımını sağlar. PET yapısının doğada yıkımı çok zor gerçekleşebilmektedir. Ancak PET'ler termo-mekanik yöntemler ile geri dönüşümü olan termal-dönüşümlü yeni tür PET'ler üretilmektedir ve azaltılmış mekanik özelliklere sahiptirler (Liang & Zou, 2022)

Ümit vaat eden bir geri dönüşüm yöntemi ise PETaz temelli PET atıkların monomerlerine kadar parçalandığı çalışma stratejileridir. Hem bakteriyel hem de mantar kaynaklı kütinaz enzimlerinin PETaz aktivitesi gösterenleri vardır. Yüksek ortam sıcaklıklarında (~ 65°C) bu tip enzimler PET yapısının hidrolizini başlatabilir ya da tetikleyebilir (Liang & Zou, 2022). Termofilik Kütinazlar mezofilik kütinazlara göre pratik anlamında daha üstündür. Örneğin yaprak özütü (leaf compost) kütinazları yüksek sıcaklıklarda en iyi aktiviteyi gösterirler. Böyle doğal kaynaklı kütinazların PET yapısı yıkımında kullanılması dışında daha verimli yıkım reaksiyonlarının gerçekleşmesi için biyolojik mühendislik yöntemleri ile geliştirilmiş kütinaz enzimleri mevcuttur ve popüler bir çalışma konusudur. Örneğin, güncel bir çalışma sonucuna göre PET yapısını on saat içinde %90 oranında monomerlerine kadar parçalayabilen kararlı bir kütinaz enzimi geliştirilmiştir (Liang & Zou, 2022). Bu ve benzeri çalışmalar bize PET gibi parçalanması zor yapıların doğadan zararsız bir şekilde uzaklaştırılıp dönüştürülmesinin avantajlarını ve önemini göstermektedir.

Kütinazlar ayrıca fosfino-karboksilikasit (PCA) yapısını da yıkıma uğratabilir (Liang & Zou, 2022). PCA yapay poliester bir yapıdır ve yenilenebilir laktik asitten yapılmıştır. PCA biyolojik olarak yıkıma uğratılabilse de reaksiyonu normal koşullarda yavaş gerçekleşmektedir (Liang & Zou, 2022). Güncel bir çalışma sonuçlarına göre bakteriyel bir kütinaz olan, *Thermobifida alba* AHK 119 PCA yapısını verimli bir şekilde parçaladığı gösterilmiştir (Kitadokoro et al., 2019). PCA'ya benzer bir şekilde polihidroksi-bütil sükkinat (PBS) yapay ve biyolojik türetilmiş bir poliesterdir. PCA'dan normal koşullarda daha dayanıklıdır. Bir başka bakteriyel kütinaz olan

*Amycolatopsis mediterare*i PBS ve PCL' yi yıkıma uğrattırırken, PCA ve PET yapısına etki edemez (Tan et al., 2021). Fonksiyonel poliester ürünlerin biyo-yıkımı gerçekleşirken spesifik kütinaz enzimleri ile muamele gerçekleşen süreç için kullanışlı ve verimli olabilmektedir (Liang & Zou, 2022).

## 2.7 Metagenomik

Mikroorganizmaların klasik genomik çalışma ve geleneksel tarama teknikleri kullanılarak yapılan araştırmalarda mevcut mikrobiyal kaynakların %99'u kadarı gözden kaçabilir. Öte yandan, doğal ortamından çıkarılan DNA'nın genomik analizini içeren kültürden bağımsız metagenomik yaklaşım, tüm mikrobiyal genetik bilgiyi korumak için geleneksel kültürleme temelli yaklaşımlara kıyasla mikrobiyal genetik rezervuarlara erişmek için daha kapsayıcı bir stratejidir (Handelsman vd., 1998). Biyoprospektif metagenomlar, enzimler gibi potansiyel yeni biyoürünleri keşfetmek için çekici ve uygulama olarak karmaşık olmayan bir yoldur. Tarama stratejisine bağlı olarak, metagenomik, temelde bir habitattan mevcut olan tüm mikroorganizmaların metagenomik kütüphanelerini başlangıçta inşa edilmesi yöntemi ile dizileme ve fonksiyonel metagenomik olarak ikiye ayrılır (Benbelgacem vd., 2018).

Metagenomik DNA kütüphanesi istenen enzimatik aktiviteyi gösteren genlerin taranması olasılığını artırmak için, isteğe bağlı kütüphane hazırlama aşamasında DNA ekstraksiyonu uygulanabilir; bu yöntem özel enzimatik aktiviteye sahip mikroorganizmaların taranmasını olumlu yönde arttırmak için kullanılan seçici bir çeşit zenginleştirme yöntemidir. Metagenomik yöntemlerin anlaşılmasında ve uygulanmasında,

1. Zenginleştirme stratejileriyle biyoprospeksiyon yapan enzimleri geliştirme,
2. Metagenomik DNA'yı bir habitattan elde etme ve zenginleştirme uygulamaları,
3. Enzim taraması için metagenomik kütüphane oluşturma adımlarının anlaşılması ve uygulanması gereklidir.

### 2.7.1 Bilimsel Çalışmalarda Metagenomik Yaklaşım

Çevresel genomik, eko genomik, topluluk genomu veya metagenomik, karmaşık ekosistemlerde bulunan mikrobiyal toplulukların ekimden bağımsız değerlendirilmesi ve kullanılmasının yolunu açarak mikrobiyolojide kültürden bağımsız yeni bir strateji olmuştur (Carola ve Rolf, 2011). Metagenomik basit bir tanımını vermek gerekirse, geleneksel, kültüre alma yöntemlerinden bağımsız doğal

ortamlarından izole edilen mikroorganizma DNA'sının genomik analizidir. Tarama türüne bağlı olarak, iki metagenomik yaklaşım ayırt edilebilir:

1. Fonksiyona dayalı metagenomik (fonksiyonel metagenomik olarak da bilinir), bakteriyel metagenomik DNA içindeki genlerin ifadesinden kaynaklanan fonksiyonel aktiviteler için kütüphane taramasını içerir. Bu yaklaşımın en önemli avantajlarından biri, bu stratejinin, diziye dayalı bilgi gerektirmeden, bilinen ya da aslında yeni işlevleri kodlayan tamamen yeni gen sınıflarını belirleme potansiyeline sahip olmasıdır (Kennedy vd., 2011).

2. Hedeflenen genler için polimer zincir reaksiyonu (PZR) primerlerinin veya hibridizasyonun tasarlanması ve kullanılmasını içeren yöntemdir. Enzimler için genellikle iyi karakterize edilmiş protein ailelerinin korunmuş bölgelerine dayanan bir biyoinformatik analiz ile bu yöntem verimli bir şekilde kullanılabilir.

Bu tezin konusu olan çalışma için ise burada açıklanan fonksiyonel metagenomik yöntem ve aynı zamanda fonksiyonel seçilimi takip eden PZR, dizileme çalışmaları ve biyoinformatik analizler çalışmanın devamını oluşturmuştur.

Fonksiyonel metagenomik yaklaşımda kullanılan vektör, hücre konakçısında yüksek dönüşüm verimliliğine ve kendi kendini idame etme kapasitesine sahip olmalı ve ihtiyaç duyulan geni veya gen kümesini barındırmak için büyük DNA dizileri yerleştirilebilmelidir. Vektör, konak ekspresyon mekanizmasıyla uyumlu bir promotör ve uygun şekilde yerleştirilmiş bir ribozom bağlama bölgesi (rbs) gerektirir. Uygun transkripsiyon faktörleri, indükleyiciler, öncüler, şaperonlar, kofaktörler, translasyon sonrası etki eden faktörler ve sekresyon mekanizmalarının konakçı hücre tarafından sağlanması gerekir.

Metagenomik kütüphane oluştururken dikkat edilmesi gereken belirli parametreler vardır. Bunlar ; eklenecek genin boyutu, klon yapılacak vektör ve özellikleri, klon sayısı ve birtakım zenginleştirme stratejileridir.

## **2.8 Kütinaz Enzimi Önemi ve Metagenomik Yöntemler ile Tez Çalışmasına Konu Olması**

Gelişen teknoloji ve mevcut tüketim alışkanlıklarımız neticesinde dünya çapında plastik üretimi ve tüketimi giderek artmaktadır. Gerek üretimleri gerekse de kullanımları sonrasında çok sayıda plastik doğrudan ya da dolaylı olarak çevreye dağılmaktadır. Bunun sonucunda hem kara yüzeylerinde birçok plastik oluşumları hem de denizlerde %80 ila 85'inin makro ve mikro-plastiklerin kapladığı

bilinmektedir. Bu durumun çevre ve sağlık açısından önemli bir tehdit olduğu yapılan çalışmalarca güncel olarak rapor edilmiştir (Wright et al., 2020). Plastik kirliliğinin azaltılması için yapılan ilk çalışmalar günlük yaşamda kullanılan sentetik plastikleri, doğal polimer bazlı ya da biyolojik olarak daha kolay parçalanabilen biyo-plastiklerle değiştirmek olmuştur. Bu yeni tip plastiklerin sentetik plastiklerin sahip oldukları direnç, esneklik, kolay işlenebilirlik ve düşük maliyet gibi özellikleriyle rekabet edemeyişleri sentetik plastik kullanımını arzu edildiği doğrultuda azaltamamıştır. Olayın bu yönünden bakıldığında aslında günümüze kadar enzimlerin ilk fark edilip tanımlandığı yıllardan bu yana lipaz, esteraz, kütinaz enzimlerinin mantar, bakteri ve bitkisel organizmalardan çeşitli fonksiyon ve özellikte farklı birçok ezim tanımlanmıştır. eşitliliği fazla olan bu enzimlerden kütinaz ester bağı oluşumu ve yıkımı reaksiyonlarını çeşitli substratları üzerinden sağlayabilmektedir. Bazı durumlarda ise Kütinazlar lipazlara göre daha kullanışlı olabilmektedir. Örneğin, dayanıklı polietilen terafitalat (PET) polimer yapısının biyo-yıkımı, ester içerikli kimyasal yapıların yapısal seilimli sentezini (stereoselective) gerçekleştirebilir. Günümüze kadar yapılan tüm bu ve bunu gibi çalışmalar kütinazların sentetik biyoloji, endüstriyel biyoteknoloji, biyoyenilenme gibi alanlarda uygulanabilirliği yüksek, güçlü bir araç olduğu gösterilmiştir. Bundan dolayı, araştırmacılar bir süredir sentetik plastikler üzerinde parçalayıcı etki sergileyen mikroorganizmaların (zellikle bakterilerin) izolasyonuna ve plastiklerin yıkımında rol alan enzimlerin üretimine yoğunlaşmışlardır (Montazer et al., 2019). Bu yöntem her ne kadar güncelliğini korumakta olsa da doğada bulunan birçok mikroorganizmanın laboratuvar ortamında kültüre edilememeleri neticesinde birçok bakteriden ve genomlarındaki bilgidен yararlanılamadığı bilinmektedir. Belirli bir alanda kültüre edilemeyen bakterilerin genomlarındaki fonksiyonel bilgiye erişebilmemizi sağlayan alternatiflerden biri metagenomik yöntemlerdir.

Fonksiyonel bir amaç doğrultusunda evresel DNA'ların elde edileceği bölge ya da materyalin seçimi metagenomik çalışmaların en kritik basamaklarından biridir. Mevcut mikrobiyal çeşitlilik göz önünde bulundurulduğuunda, herhangi bir bölgeden izole edilen DNA'larla kurulacak bir metagenomik kütüphanedeki plastik üzerine etkili kütinolitik enzimlere ait genlerin oranının çok düşük olması oldukça muhtemeldir. Ancak, belirli bir karbon kaynağını etkin şekilde kullanabilen bakterilerin ilgili karbon kaynağının yoğun miktarda bulunduğu yerlerde diğer bakterilere oranla daha fazla olabileceği uzun süredir bilinen bir olgudur. Bununla

birlikte, plastik yüzeylerinde kütinaz, PETaz ve lipaz gibi sentetik polimerler üzerinde de katalitik etki gösteren enzimleri üretebilen bakterilerin varlığına ilişkin bir kısım çalışma yakın zamanda rapor edilmiştir (Adıgüzel, 2020; Akçaözoğlu et al., 2021; Puglisi et al., 2019; Roager & Sonnenschein, 2019; Xu et al., 2021). Plastik yüzeylerinin çok sayıda bakteriye ve bunlara ait DNA'lara ev sahipliği yaptığı yönündeki raporlardan hareketle bu tezinde konusu olan denizel ortamlardan toplanan plastik örnekler aracılığı ile elde edilen bakteriyel genomik materyali yani çevresel DNA ile metagenomik kütüphane oluşturularak potansiyel esteraz, lipaz, kütinaz gibi enzimlerin taranması amaçlanmıştır. Bu amaçla kısaca olarak özetlemek gerekirse Türkiye'nin farklı denizel kıyı koşullarında mevcut olan mikropplastik örnekler toplanmış, çevresel DNA izolasyonu yapılarak bu örneklerin 40-10kbp büyüklüğündeki gen parçaları ile metagenomik kütüphane oluşturulmuş ve bu oluşturulan kütüphane üzerinden fonksiyonel metagenomik yöntemler kullanılarak hedef enzim olan kütinaz enziminin taraması, seçilimi ve biyokimyasal yönden tanımlamasının yapılmasına yönelik çalışılmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

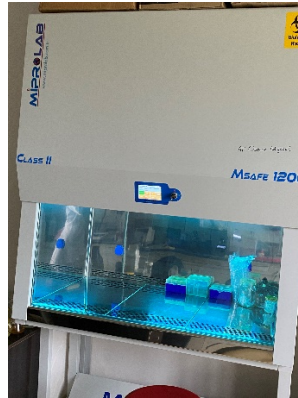
#### 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Buz Makinası: Metagenomik kütüphanelerin hazırlanması, polimeraz zincir reaksiyonu, enzim aktivitelerinin analizi ve enzim saflaştırma işlemleri kullanılan enzimlerin ve biyolojik diğer moleküllerin denatürasyonun engellenmesi için deneyler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada kullanılan buz Scotsman marka ve AF 206 modelinde buz makinası (Ipswich, Birleşik Krallık) kullanılarak elde edilmiştir.

Çalkalamalı inkübatör: Bakteri kültürlerinin geliştirilmesi, enzim üretimi ve çözeltilerin karıştırılması için Miprolab MCI 120 (Ankara, Türkiye) marka ve modelinde soğutmalı çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

Etüv: Katı bakteri kültürlerinin geliştirilmesi ve çözeltilerin sabit sıcaklıkta inkübasyonu amacıyla Miprolab MLI 55 (Ankara, Türkiye) marka ve modelinde etüv kullanılmıştır.

Laminar Kabin: DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi, metagenomik kütüphanelerin inşa edilmesi, PZR reaksiyon karışımlarının hazırlanması, rekombinant DNA çalışmaları ve bakteri kültürlerinin yapımının steril koşullar altında gerçekleştirilmesi için Miprolab Msafe 1200 (Ankara, Türkiye) Sınıf II laminar kabin kullanılmıştır, Şekil 3.1.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan laminar kabin.

Buzdolabı ve derin dondurucu: Kimyasalların, metagenomik kütüphanelerin, bakteri hücrelerinin, DNA'ların, fosmid ve plazmidlerin saklanması ve muhafazası için Vestel BZP-XL3402 XE (Manisa, Türkiye) buzdolabı ve Angelottini Platilab 500 V 4-STD marka ve modelindeki -80 °C'lik derin dondurucu kullanılmıştır.

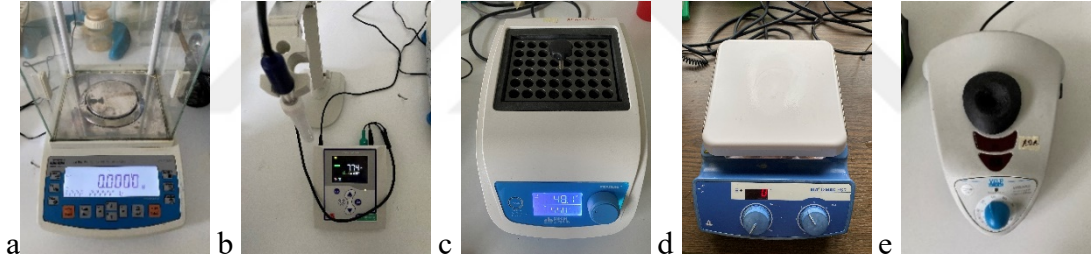
Hassas Terazı: Kimyasalların tartımı için Radwag AS 220.R2 (Radom, polonya) marka ve modelinde hassas terazı kullanılmıştır şekil 3.2a.

pH metre: Hazırlanan çözeltiler, besiyerleri ve tamponların pH'larının ayarlanmasında XS Instruments pH 50 VioLab (Meccanica, İtalya) Marka ve modelinde pH metre kullanılmıştır şekil 3.2b.

Isı bloğu: Enzim aktivitelerinin analizi ve sıcaklığın heterolog olarak ifade edilen enzimin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi çalışmalarında Daihan Scientific MaxTable™ (Güney Kore) ısı blokları kullanılmıştır şekil 3.2c.

Manyetik karıştırıcı: Çözeltilerin ve besiyerlerinin hazırlanması aşamasında karıştırılması ve homojenizasyonları WiseStir MSH-20D (İstanbul, Türkiye) ve IKA C-MAG HS 7 PACKAGE (Staufen / Almanya) marka ve model karıştırıcı kullanılarak gerçekteşirilmıştır şekil 3.2d.

Vorteks: Ependorf ve falkon tüplerdeki çözeltilerin karıştırılması için VELP Scientifica Srl Vizard (MB, İtalya) vorteks kullanılmıştır şekil 3.2e.



şekil 3.2. Çalışmada kullanılan hassas terazı (a), pH metre (b), ısı bloğu (c), manyetik karıştırıcı (d) ve vorteks (e)

Jel görüntüleme cihazı: Agaroż jel elektroforezi ve SDS-PAGE analizleri sonrasında jellerin görüntülenmesi için Bio-Rad ChemiDoc MP (Hercules, CA, ABD) jel görüntüleme sistemleri kullanılmıştır.

Otoklav: Çözeltilerin ve kimyasalların sterilizasyonu amacıyla Nüve Marka otoklav kullanılmıştır. Tüm otoklavlama işlemleri 1 atm basınçta 121 °C'de 15 dakika olacak şekilde gerçekteşirilmıştır.

Ultrasonik banyo (sonikatör): Tributirin içeren besiyerlerinin yazırılmasında Kudos LHC paslanmaz çelik sonikatör kullanılmıştır.

Santrifüj: DNA izolasyonu, plazmid izolasyonu, fosmid izolasyonu, DNA'ların jelden geri alması ve ham enzim geri kazanımı çalışmalarında Nüve NF 800R

(Ankara, Türkiye) ve WEIGHTLAB WN-CM15 (İstanbul, Türkiye) marka ve modellerindeki soğutmalı santrifüjler ve Kuboto 3300 (Türkiye) soğutmasız santrifüjler kullanılmıştır (Şekil 3.3).

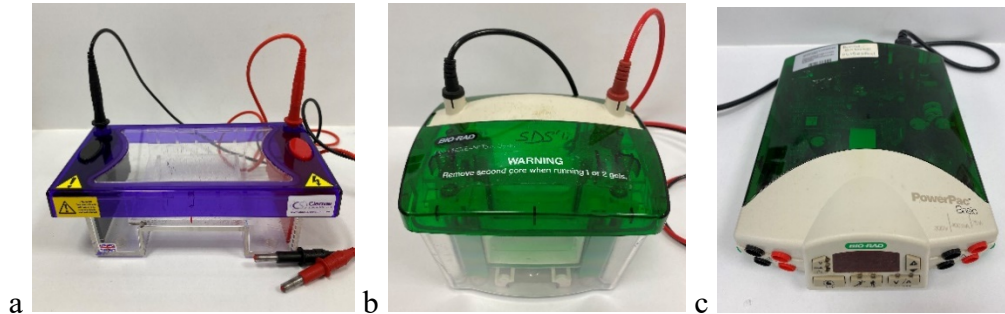


Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan santrifüjler.

Yatay Elektroforez: DNA'ların agaroz jellerde elektriksel akım altında ayrıştırılması için Cleaver Scientific Wide Midi (Rugby, Birleşmiş Devletler) ve Bio-Rad Sub-Cell Model 192 (Hercules, CA, USA) ve yatay elektroforez sistemleri kullanılmıştır (Şekil 3.4a).

Dikey elektroforez: Proteinlerin poliakrilamid jelde elektriksel akım altında denatüre edici koşullarda ayrıştırılması için Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell ve Atto AE-6050 (Tokyo, Japonya) dikey elektroforez sistemleri kullanılmıştır (Şekil 3.4b).

Güç kaynağı: Elektroforez deneylerinin gerçekleştirilmesi sırasında elektrik akımı sağlanması amacıyla Bio-Rad marka ve PowerPac™ HC High-Current Power Supply modelinde güç kaynağı kullanılmıştır (Şekil 3.4c).



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan yatay elektroforez sistemi (a), dikey elektroforez sistemi (b) ve güç kaynağı (c)

### 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Luria Bertani (LB) Broth: Bakterilerin geliştirilmesi ve enzim üretiminde kullanılması amacıyla Tablo 3.1’da sunulan bileşenler ve oranlar kullanılarak distile suda hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri otoklavlandıktan sonra 1 hafta içinde kullanılmıştır.

Tablo 3.1. LB Broth besiyerinin bileşenleri ve oranları

| Bileşen    | Miktar |
|------------|--------|
| Trypton    | 10 g/L |
| Maya özütü | 5 g/L  |
| NaCl       | 10 g/L |

Luria Bertani (LB) Agar: Bakterilerin katı agar yüzeyinde geliştirilmesi amacıyla Tablo 3.2’da sunulan bileşenler ve oranlar kullanılarak distile suda hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri otoklavlandıktan sonra 1 hafta içinde kullanılmıştır.

Tablo 3.2. LB agar besiyerinin bileşenleri ve oranları

| Bileşen    | Miktar |
|------------|--------|
| Trypton    | 10 g/L |
| Maya özütü | 5 g/L  |
| NaCl       | 10 g/L |
| Agar       | 15 g/L |

Tributirin Luria-Bertani (TrLB) agar besiyeri: Otoklavlanmış LB besiyeri 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra besiyerindeki konsantrasyonu %1 olacak şekilde tributirin ilave edilmiştir. Besiyeri şiddetli şekilde karıştırıldıktan sonra ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilerek homojenize edilmiş ve petrilere dökülmüştür.

Polikaprolakton Luria-Bertani (PcLB) agar besiyeri: LB besiyeri 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra besiyerindeki konsantrasyonu %0.1 oranında asetonda çözündürülmüş (50 °C, 2-3 saat) PCL kullanılmıştır. PCL’nin besiyerindeki homojenizasyonu ise nazıkçe karıştırma ile gerçekleştirilmiştir.

SOC besiyeri: Önce; %2 tripton, %0.5 maya özütü, %0.05 g NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> içeren 100 mL SOB besiyeri hazırlanarak otoklavlanmıştır. Besiyeri soğutulduktan sonra, içerisine filtre ile sterilize edilmiş 1 M’lık glukoz çözeltisinden 2 mL ilave edilmiştir.

Tris-HCl tamponu (100 mM, pH 8): 12.14 g Trizma-base 800 mL distile suda çözündürüldükten sonra pH'8 oluncaya kadar 1M'lık HCl çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra çözeltinin üzerine son hacmi 1L oluncaya dek distile su eklenmiştir.

Liziz çözeltisi: Mikroplastik yüzeylerinden DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Çözelti 100 mM'lık Tris HCl tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan liziz çözeltisinin bileşenleri ve yoğunlukları Tablo 3.3'te gösterilmektedir.

Tablo 3.3. Liziz çözeltisi bileşenleri ve yoğunlukları

| Bileşen              | Miktar |
|----------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> EDTA | 25 mM  |
| SDS                  | % 1    |
| NaCl                 | 100 mM |
| Agar                 | 15 g/L |

Liziz tamponu: İntraselüler ham enzim çözeltilerinin hazırlanması için kullanılmıştır. Tablo 3.4'te gösterilen bileşenleri yine aynı tabloda gösterilen yoğunluklarda içerecek şekilde hazırlanmıştır. Tampon pH'sı 1M HCl kullanılarak ayarlanmıştır.

Tablo 3.4. Liziz tamponunun hazırlanması sırasında kullanılan bileşenler

| Bileşen                   | Yoğunluk |
|---------------------------|----------|
| Tris                      | 20 mM    |
| NaCl                      | 100 mM   |
| EDTA                      | 1 mM     |
| Triton X-100              | %0.1     |
| CHAPS                     | 5 mM     |
| Proteaz inhibitör tableti | 1/ 50 mL |

Proteinaz K çözeltisi: Mikroplastik yüzeylerinden DNA izolasyonunda kullanılmak amacıyla son konsantrasyonu 100 U/ $\mu$ L olacak şekilde 100 mM'lık Tris HCl tamponu içerisinde hazırlanmıştır.

Fenol-kloroform-izoamil alkol çözeltisi (25:24:1): Çözelti 25 mL fenol, 24 mL kloroform ve 1 mL izoamil alkol çözeltisinin karıştırılması ile hazırlanmıştır.

Tris-EDTA (TE) tamponu: Mikroplastik yüzeylerinden izolasyonu sırasında yoğunlaştırılan DNA'nı çözündürülmesi için kullanılmıştır. TE tamponu; 1 mL Tris-

HCl tamponunu (1 M, pH 8.0), 0.2 mL 0.5M EDTA (pH 8.0) çözeltisi ve 98.8 distile suyun karıştırılması ile hazırlanmıştır.

Etüdyum bromür (EtBr) stok çözeltisi: Son konsantrasyonu 12,5 mg/mL olacak şekilde distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu: Agaroz jel elektroforezi uygulamalarında kullanılmıştır. Tablo 3.5'te miktarları belirtilen bileşenler ilk olarak 200 mL'lik distile suda çözündürüldükten sonra üzerine 14,25 mL glasiyal asetik asit eklenmiştir. Çözelti pH'sının 8-8.5 arasında olup olmadığı kontrol edildikten sonra son hacim 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Çözelti çalışma sırasında uygun oranda seyreltilerek kullanılmıştır.

Tablo 3.5. TA tamponunun hazırlanması sırasında kullanılan bileşenler

| Bileşen | Miktar  |
|---------|---------|
| Tris    | 60.5 gr |
| EDTA    | 3.65 gr |

Primer çözeltilerinin hazırlanması: Primerler BM Labosis'ten temin edilmiştir. İlk olarak, tedarikçi firmanın önerdiği gibi nükleazsız steril su kullanarak primerlerin 100 µM'lık stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra stok çözeltinin 10 µL'si üzerine 90 µL nükleazsız steril su eklenmesiyle 10 µM'luk primer çözeltisi elde edilmiştir.

Şahit DNA (DNA ladder) çözeltisinin hazırlanması: Bunun için; 40 µL nükleazsız su, 10 µL ticari firmadan temin edilen şahit DNA çözeltisi (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) ve 10 µL6X yükleme boyası (Thermo Scientific) karıştırılmıştır. Şahit DNA'lar +4 °C'de saklanmıştır.

Kloramfenikol stok çözeltisi: Kloramfenikol, %95'lik etanol içerisinde yoğunluğu 12 mg/mL olacak şekilde çözündürülmüş ve 0.45 µm'lik filtre ile steril edilmiştir.

Stet çözeltisi: Fosmid izolasyonunda kullanılmıştır. Distile su ile 50 mM Tris, %8 sukroz, %5 Triton X-100 ve 50 mM EDTA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'sı HCl ile 8.0'a ayarlanmıştır.

Nötralizasyon çözeltisi: Fosmid izolasyonunda kullanılmıştır. 29,5 g potasyum asetat üzerine 88,5 mL su ve 11,5 glasiyal asetik asit eklenerek hazırlanmıştır.

Bradford çözeltisi: Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan çözelti 100 mg Coomassive Blue G250, 50 mL %95'lik etanol, 100 mL %85'lik fosforik asit ve 850 mL distile su ile hazırlanmıştır. Çözelti Whatman No 1 filtre kağıdından süzildükten sonra kullanılmıştır.

Nötralizasyon tamponu: pUC19 vektörünün izolasyonunda kullanılmıştır. Tampon 50 mM glukoz, 25 mM Trisma-base, 10 mM EDTA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Tampon pH'sı HCl ile pH 8.0'a ayarlanmıştır.

Resüspanسیون tamponu: pUC19 vektörünün izolasyonunda kullanılmıştır. Tampon 3 M potasyum asetat ve 2 M glasiyal asetik asit içerecek şekilde distile su ile hazırlanmıştır.

IPTG stok çözeltisi: Son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde distile su ile hazırlanmış ve filtre ile sterilize edilmiştir.

Akrilamid-bis akrilamid (30/0.8%) çözeltisi: SDS-PAGE analizlerinde kullanılmak için hazırlanmıştır. Bunun için; 30 g akrilamid ve 0.8 g bis akrilamid son hacim 100 mL olacak şekilde suda çözündürülmüştür. Tamamen çözündükten sonra Whatman No 1 filtre kağıdından süzölmüştür.

Ayırma jeli tamponu (4x): SDS-PAGE analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 18,16 g Trizma-base üzerine 80 mL distile su ilave edilmiş ve çözeltinin pH'sı HCl ile 8.8'e ayarlanmıştır. Çözelti, toplam hacim 100 mL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır.

Yükleme jeli tamponu (4x): SDS-PAGE analizlerinde yükleme jelinin hazırlanması için kullanılmıştır. Tamponun hazırlanması için 6,08 g Trizma-base üzerine 80 mL distile su ve 4,8 mL %37'lik HCl ilave edilmiştir. Daha sonra, toplam hacim 100 mL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır.

Örnek yükleme tamponu (2x): SDS-PAGE analizlerinde proteinlerin jele yüklenmesi için kullanılmıştır. 3.75 mL 0.5 M'lık Tris-HCl (pH 6.8), 15 mL %50'lik gliserol, 0.3 mL, %1'lik bromofenol mavisi, 6 mL %10'luk SDS karıştırıldıktan sonra toplam hacim 30 mL olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Kullanılmadan hemen önce her 950 µL'sine 50 µL β-merkaptotanol eklenmiştir.

Tank tamponu (5x): 0,025 M Trizma (pH 8.3), 0,192 M glisin ve %1 SDS içerecek şekilde su ile hazırlanmıştır.

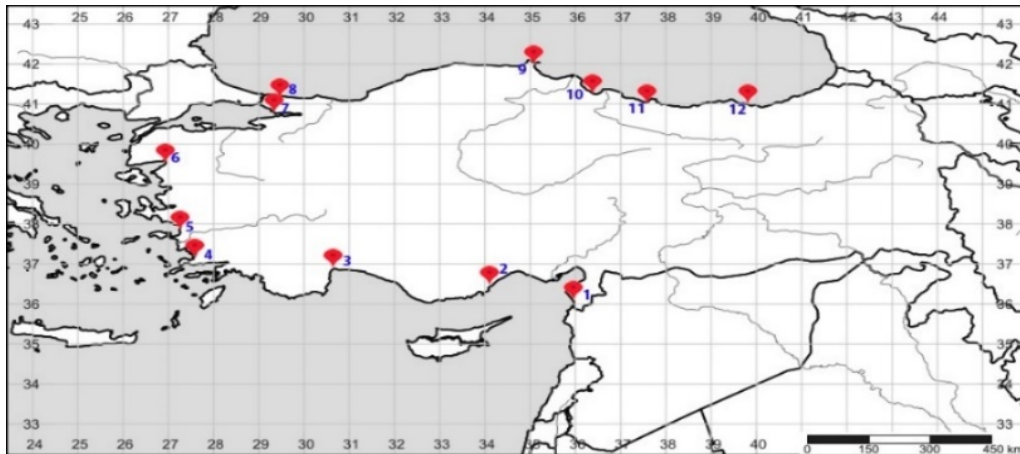
Amonyum persülfat (APS): 0.1 g APS 1 mL suda çözündürülmüştür. Çalışma sırasında taze olarak kullanılmıştır. Akrilamidin polimerleşmesinin sağlamaktadır.

Boyama çözeltisi: Hazırlanması için 1 g Coomassie Blue (Brilliant Blue R), 500 mL metanol, 100 mL glasiyel asetik asit ve 400 mL distile su içinde çözündürülmüştür. Poliakrilamid jellerdeki proteinlerin boyanması için kullanılmıştır.

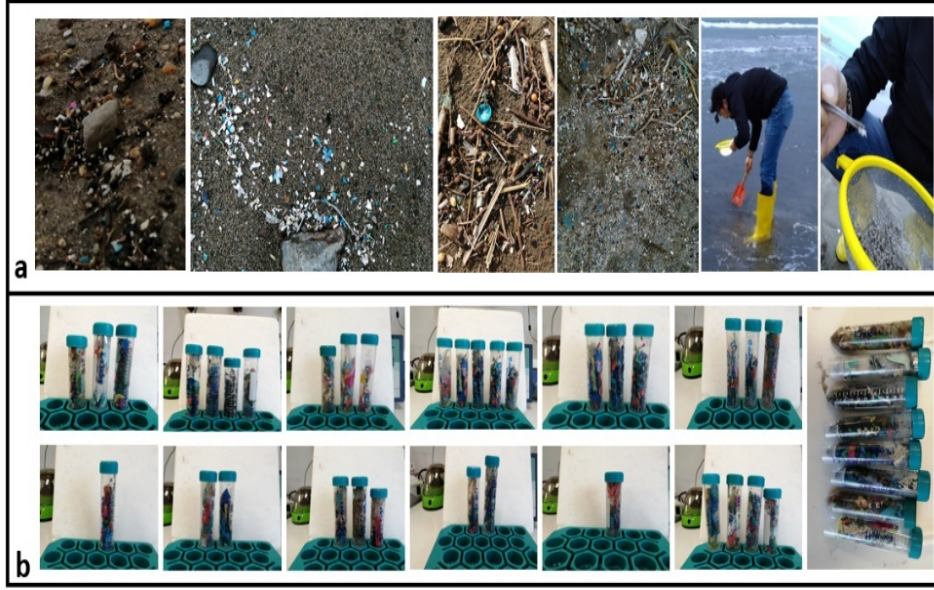
Yıkama çözeltisi: 50 mL etanol, 850 mL distile su ve 100 mL glasiyel asetik asit karıştırılarak hazırlanmıştır. Poliakrilamid jellerdeki proteinlere bağlanmayan boyaların jelden uzaklaştırılması için kullanılmıştır.

### 3.3. Mikroplastik Plastik Örneklerin Toplanması

Plastik parçalarının toplanması 18.01.2021-01.02.2021 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Plastik parçaları Şekil 3.5'teki Türkiye haritasında konumları işaretlenen 12 kumsalın her birinden birbirine eşit uzaklıktaki 10 noktadan toplanarak 50 ml'lik falkon tüplerde buz aküleri ile desteklenmiş soğuk zincir ile laboratuvara getirilmiştir. Plastik parçalar DNA izolasyonuna kadar +4 °C'ye ayarlanmış buz dolabında saklanmıştır. DNA izolasyonu öncesinde tüplerdeki büyük plastik parçaları steril şartlar altında ayrıştırılmış ve her bir kumsaldan 40 adet mikroplastik parçası seçilerek steril falkon tüpler içerisine aktarılmıştır. Arazi çalışması sırasında çekilen fotoğraflar ve toplanan plastik parçaları Şekil 3.6'da gösterilmektedir.



Şekil 3. 5. Plastik parçalarının toplandığı kumsalların Türkiye haritası üzerindeki konumları. Hatay-Samandağı-Çevlik Kumsalı (1), Mersin-Erdemli-Kız Kalesi Kumsalı (2), Antalya-Konyaaltı Kumsalı (3), Muğla-Bodrum-Gümbet Kumsalı (4), Aydın-Kuşadası-Kadınlar Kumsalı (5), Balıkesir-Edremit-Altinkum Kumsalı (6), Gebze-Darica-Bayramoğlu Ada Kumsalı (7), İstanbul-Şile-Halk Kumsalı (8), Sinop-Aklıman-Aklıman Kumsalı (9), Samsun-Atakum-Halk kumsalı (10), Ordu-Fatsa-Bolaman Kalesi Kumsalı (11) ve Trabzon-Kaşüstü Kumsalı (12).



Şekil 3. 6. Örnek toplama sırasında çekilen fotoğraflar (a) ve plastik parçalardan (b) örnekler.

### 2.3. Plastik Örneklerinden Çevresel DNA İzolasyonu

DNA'ların mikroplastikler üzerinden izolasyonu Debeljak ve ark.'nın (2017) tariflediği gibi standart fenol-kloroform metodu ile gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu sırasında;

- i. Mikroplastik parçalarının bulunduğu 50 mL'lik falkon tüplere 5 mL liziz (bk. Bölüm 3.2) ve 50  $\mu$ L proteinaz K (bk. Bölüm 3.2) çözeltileri ilave edildikten sonra tüpler 50 °C'de 30 dakika bekletilmiştir.
- ii. Tüpler oda sıcaklığında soğutulduktan sonra içerisine 100  $\mu$ L lizozim çözeltilisi (bk. Bölüm 3.2) ilave edilerek 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- iii. Her tüpe 2'şer g zirkonyum bilye eklendikten sonra tüpler 10 dakika süresince vortekslenmiştir.
- iv. Tüplere 5 mL fenol dökülerek hafifçe karıştırıldıktan sonra 4 °C'de santrifüjlenmiştir (4500 x g, 10 dk).
- v. Üst faz yeni steril bir tüpe aktarılmıştır.
- vi. Üst faza 5 mL fenol-kloroform-izoamil alkol çözeltilisi eklenerek karışım oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir (4500 x g, 10 dakika).
- vii. Üst faz tekrar yeni bir steril tüpe aktarılmıştır. Ardından, hacminin 2 katı kadar soğuk etanol ve 5M NaCl ile nazikçe karıştırılmıştır. Karışım 1 gece boyunca -20 °C'de bekletilmiştir.

- viii. Karışım +4 °C’de 20 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlenerek yoğunlaşan DNA’nın çökmesi sağlanmıştır.
- ix. Tüplerdeki etanol uzaklaştırıldıktan sonra DNA’lar 700 µl’lik etanol ile yıkanmış ve tekrar bir önceki basamaktaki gibi santrifüjlenerek çöktürülmüştür.
- x. Tüplerdeki etanol uzaklaştırılmış ve sonra DNA’lar 40 µL 1X’lik TE tamponunda çözündürülmüştür.

Elde edilen DNA’lar agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

### **3.5.DNA yoğunluğu ve kalitesinin belirlenmesi**

DNA çözeltilerinin yoğunlukları mikropilaka okuyucuya bütünleştirilmiş µDrop pilaka yardımıyla (Thermo Scientific, Multiskan GO, Waltham, MA, USA) belirlenmiştir.

### **3.6 Agaroz Jel Elektroforezi**

İzole edilen çevresel DNA’ların, fosmidlerin, plazmidlerin, DNA parçalarının rutin görüntülenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bunun için, ilk olarak %1’lik agaroz çözeltisi 1X TAE tamponu (bk. Bölüm 3.2) kullanılarak hazırlanmış ve mikrodalga fırında kaynatılarak çözündürülmüştür. Agaroz çözeltisinin sıcaklığı 50-60 °C’ye geldiğinde EtBr stok çözeltisinden 4 µL eklenmiştir ve çözelti jel tepsisine dökülmüştür. Jel, oda sıcaklığında dondurulduktan sonra daha öncesinde yerleştirilmiş tarak çıkartılarak örnek yükleme kuyucukları açılmıştır. Elektroforez tankı içine yeteri kadar 1X’lik TAE tamponu ilave edilmiştir. DNA örnekleri (3 µL) 2 µL 6X DNA yükleme çözeltisi (loading dye; Thermo Scientific Technology) ile karıştırıldıktan sonra kuyucuklara yüklenmiş ve 100 V elektriksel akım altında agaroz jelde yürütülmüştür. Yürütülen DNA’ların büyüklüğünün tahmin edilebilmesi için şahit DNA karışımı (DNA ladder; Thermo Scientific Technology) kullanılmıştır.

### **3.7. 16S rRNA Genlerinin Çoğaltılması için Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Hedef genlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması için 27F (AGA GTT TGA TCA TCA TGG CTC AG) ileri ve 1492R (TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T) geri primerleri kullanılmıştır. PZR reaksiyon karışımında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.6’de gösterilmektedir. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve Taq polimeraz enzimi Thermo Scientific firmasından temin edilmiştir. Kalıp DNA olarak plastiklerden elde edilmiş DNA karışımı kullanılmıştır.

Hedef genler termal dönüleyicinin (i) 94 °C-300 saniye ön denatürasyon, (ii) 94°C-45 saniye denatürasyon, 51°C-60 saniye primer bağlanma, 72 °C-60 saniye uzama ve 72 °C-600 saniye son uzama olarak ayarlandığı koşullarda 35 döngüde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA'lar agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir.

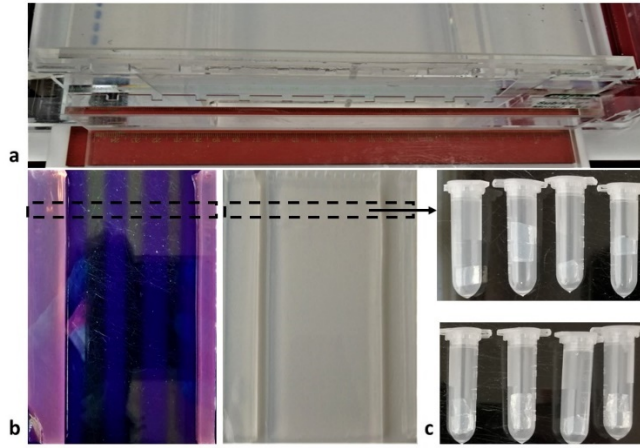
Tablo 3.6. PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve miktarları

| Bileşen                             | Miktar |
|-------------------------------------|--------|
| Nükleazsız su                       | 17 µL  |
| 10 X Taq DNA polimeraz tamponu      | 3 µL   |
| 25 mM'lık MgCl <sub>2</sub>         | 2,6 µL |
| dNTP karışımı                       | 0,8 µL |
| 10 µM'lık 27F primer                | 1,5 µL |
| 10 µM'lık 1492R primer              | 1,5 µL |
| 5 U/µL'likTaq DNA polimeraz tamponu | 0.6 µL |
| Kalıp DNA                           | 3 µl   |

### 3.8. Çevresel DNA'ların fragmentasyonu ve geri kazanımı

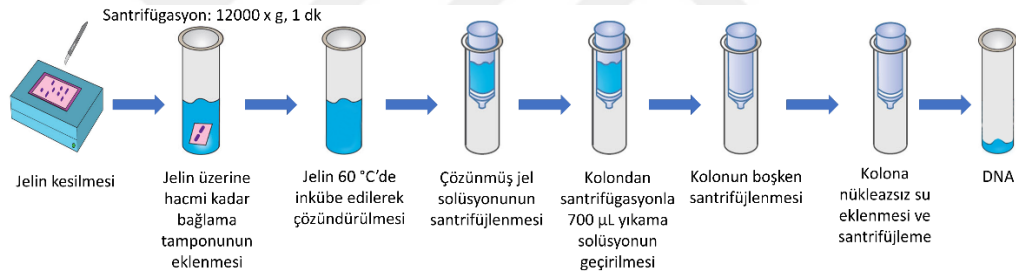
DNA parçaları metagenomik kütüphanelerin oluşturulmasında kullanılmak üzere fragmente edilmiştir. DNA'lar şiddetli pipetajlama yapılarak rastgele parçalanmıştır ve parçalanma verimliliği %0,8'lik agaroz jel üzerinde kontrol edilmiştir.

Fragmente edilmiş DNA örnekleri Sub-Cell Model 192 yatay elektroforez sistemi kullanılarak 30 V'luk elektrik akım altında EtBr'siz agaroz jelde gece boyunca yürütülmüşlerdir. Jel, her iki ucuna şahit DNA'lar orta kısmına ise fragmente edilmiş DNA örnekleri gelecek şekilde düşük erime sıcaklığına sahip agaroz kullanılarak hazırlanmıştır. Elektroforez tamamlandıktan sonra şahit DNA'ların bulunduğu hatlar kesilerek EtBr çözeltisi dolu küvet içinde bekletilmişlerdir. Daha sonra, 30-40 kb'lık DNA parçalarının konumlandığı bölgeler jel görüntüleyici yardımı ile işaretlenmiştir ve bu bölge kesilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Fragmentasyon sonrasında DNA'ların yürütüldüğü agaroz jel (a), agaroz jelin kesimi ve şahit DNA'ların görüntülenerek jel üzerindeki hedef aralığın tespiti (c), tespit edilen aralıktaki jellerin kesilerek geri kazanılması (c).

Jel parçalarındaki DNA'lar GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) kiti kullanılarak geri kazanılmıştır. Uygulanan protokol Şekil 3.8'de özetlenmektedir.

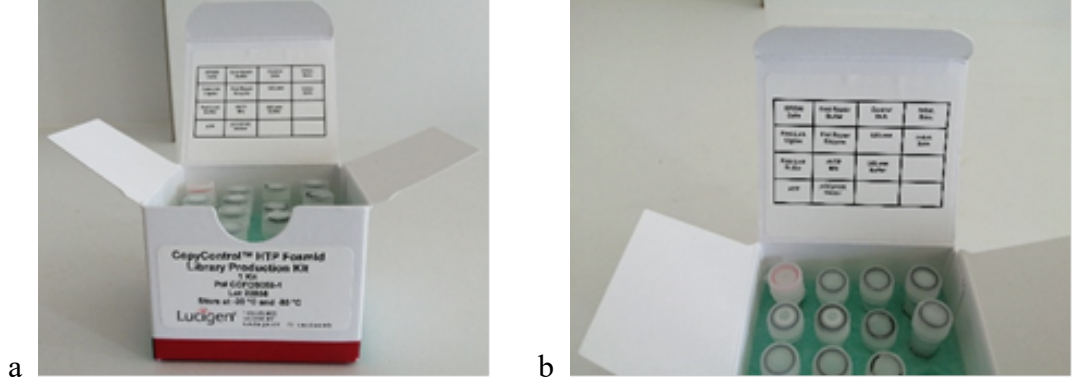


Şekil 3.8. Jelden ekstraksiyon için kullanılan protokolün grafiksel özeti.

### 3.9. Metagenomik kütüphanelerin oluşturulması

Metagenomik kütüphaleler pCC2FOS™ vektörü içeren Fosmid kütüphane (CopyControl™ Fosmid Library Production Kit) kiti kullanılarak oluşturulmuştur. (Şekil 3.9). Fosmid kütüphanelerinin oluşturulması;

- insört dna'ların uç-modifikasyonları
- ligasyon
- fosmid paketlenmesi
- konak hücrenin hazırlanması ve
- transdüksiyon olmak üzere 5 basamakta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. CopyControl™ Fosmid Library Production (Lucigen) kiti (a) ve içeriği (b).

**İnsört DNA'ların uç-modifikasyonları:** İnsert DNA olarak geri kazanılan 30-40 kb uzunluğundaki DNA parçalarının karışımı kullanılmıştır. Bu amaç için kullanılacak kimyasallar fosmid kütüphanesi oluşturma kiti içerisinde tedarik edilmiştir. Üretici firmanın tavsiye ettiği gibi hazırlanan DNA solüsyonunun her 50  $\mu\text{L}$ 'si üzerine 8  $\mu\text{L}$  10X'lik uç-modifikasyon tamponu (end-repair buffer) (10X), 8.5  $\mu\text{L}$  2.5 mM dNTP karışımı, 8  $\mu\text{L}$  10 mM ATP, 4  $\mu\text{L}$  uç modifikasyon enzimi (end-repair enzyme) ilave edilmiştir. Daha sonra karışım su ile 80  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Karışım 2 saat oda şartlarında inkübe edilmiştir. Modifiye DNA'lar DNA saflaştırma kiti ile geri kazanılmıştır (Sree vd., 2019; Wu vd., 2019).

**Ligasyon:** Ligasyon, kit içindeki kimyasallar kullanılarak üretici firma talimatına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre, reaksiyon karışımı yaklaşık her 600 ng modifiye edilmiş DNA üzerine 1  $\mu\text{L}$  10X'lik ligasyon tamponu, 1  $\mu\text{L}$  10 mM'lık ATP çözeltisi, 1  $\mu\text{L}$  fosmid (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  DNA ligaz (2 U/ $\mu\text{L}$ ) ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımına, hacmi her 600 ng DNA için 10  $\mu\text{L}$  olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı ligasyon için gece boyunca 16 °C'de bekletildikten sonra reaksiyon, 70 °C'de 10 dakika inkübasyonla durdurulmuştur.

**Fosmid paketlenmesi:** Her 10  $\mu\text{L}$ 'lik ligasyon karışımı üzerine 25  $\mu\text{L}$  faj paketlenme ekstraktı (MaxPlax Lambda Packaging Extract, Lucigen, , Middleton, WI, USA) ilave edilerek karışım 2 saat 30 °C'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında, karışım üzerine tekrar 25  $\mu\text{L}$  faj paketlenme ekstraktı eklenerek karışım aynı sıcaklıkta 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışımın su ile seyreltilmesiyle faj süspansiyonları elde edilmiştir.

Konak hücrenin hazırlanması: Metagenomik kütüphanelerin hazırlanmasında konak olarak E.coli EPI300-T1 hücreleri (Şekil 2.5) kullanılmıştır. Konak metagenomik kütüphane kiti içerisinde tedarik edilmiştir. Konak hücreler, transdüksiyonun hemen öncesinde 10 mM MgSO<sub>4</sub> içeren LB besiyerinde optik yoğunluğu 0.8-1.0 oluncaya kadar 37 °C’de 150 rpm kuvvetinde çalkalanarak geliştirilmiştir.

Transdüksiyon: Taze hazırlanan ve OD ‘si 0.8-1.0 olan kültür, 100’er µL olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır ve üzerine bir önceki basamakta elde edilen faj süspansiyonlarından farklı hacimlerde (10-50 µL) ilave edilmiştir. Tüpler 45 dk 37 °C’de inkübe edilmiş ve daha sonra 12,5 µg/mL kloramfenikol içeren LB agar besiyerleri yüzeylerine yayılmıştır.

### **3.10. Metagenomik kütüphanelerdeki klonların katı besiyerinde enzim üretme kapasitelerinin taranması**

Her bir metagenomik kütüphaneye ait kolonilerin tributirin (TRB) ve polikaprolakton (PCL) parçalayabilme yetenekleri TrLB ve PcLB agar besiyerleri kullanılarak taranmıştır. Besiyerleri petrilere dökülmeden önce son konsantrasyonları 12,5 µg/mL ve 2 µL/mL olacak şekilde sırasıyla kloramfenikol ve oto-indüksiyon çözültisi (500X) ilave edilmiştir. Tarama deneyleri sırasında klonların LB besiyerindeki gelişiminin gözlemlenmesi için ise aynı oranda kloramfenikol içeren LB besiyeri (KLB) kontrol olarak kullanılmıştır.

Tarama deneylerinin gerçekleştirilmesi için metagenomik kütüphanelerdeki kolonilerin kurdan yardımıyla KLB, TrLB ve PcLB agar besiyerlerine nokta ekimi yapılmıştır. Daha sonra, petriler 37 °C’de gece boyu inkübe edilmiştir.

### **3.11. Fosmid izolasyonu**

Kloramfenikollü LB broth sıvı besiyerinde hazırlanan taze klon kültüründen 1.5 mL kültür sıvısı 14 000 rpm’de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet nazikçe 250 µL stet yıkanarak tekrar aynı şekilde santrifüjlenmiştir. Pelet 100 µL 50 mM EDTA ve %0,9 (w/v) oranında glukoz içeren soğuk 50 mM’lık Tris-HCl tamponunda (pH 8.0) süspanse edilmiştir. Süspanse hücreler üzerine 200 µL taze liziz çözültisi (8 g/L NaOH ve 10 g/L SDS) eklenmiş ve tüp nazikçe karıştırılmıştır. Üzerine soğuk nötralizasyon tamponu ilave edilmiş ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Karışım 14000 rpm’de 2 dk santrifüjlendikten sonra üst

faz temiz bir tüpe aktararak üzerine -20 °C’de soğutulmuş etanolden 2 hacim ilave edilerek 15 dakika soğukta bekletilmiştir. Karışım santrifüjlendikten (14000 rpm, 15 dakika) sonra geri kazanılan pelet %70’lik etanolle yıkanmıştır. Etanolün uzaklaştırılmasından sonra pelet suda çözündürülmüştür. Elde edilen fosmid DNA çözeltileri %1’lik agaroz jel de yürütülerek görüntülenmiştir.

### **3.12. Katı besiyerinde enzim üretme kapasitesi olan klonların sıvı besiyerinde enzim üretimlerinin taranması**

Katı besiyerinde enzim üretme kapasitesi olan koloniler sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra hücre içi ve hücre dışındaki toplam protein miktarları, p-nitrofenil bütirat (*p*NPB), p-nitrofenil asetat (*p*NPA), p-nitrofenil heksonat (*p*NPH), p-nitrofenil kaprilat (*p*NPK), p-nitrofenil laurat (*p*NPL), p-nitrofenil miristat (*p*NPM) ve p-nitrofenil palmitat (*p*NPP) karşısındaki aktiviteleri belirlenmiştir (Wang vd., 2019).

Aşı kültürünün hazırlanması için ilk olarak klonlar 12,5 µg/mL oranında kloramfenikol içeren LB agar besiyerinde bir gece boyunca 37 °C’de geliştirilmiştir. Bu kültürlerden bir öze dolusu koloni sıvı besiyerine aktarılmış ve 600 nm’deki absorbansı 0.5 oluncaya dek kültüre edilmişlerdir. Elde edilen kültürler aşı olarak kullanılmıştır ve enzim üretim besiyerlerine % 2 (v/v) oranında ilave edilmiştir.

Enzim üretimi için klonlar 12,5 µg/mL oranında kloramfenikol ve 100 µL oto-indüksiyon solüsyonu (500X) içeren 50 mL’lik LB besiyerlerinde 37 °C ve 250 rpm çalkalamalı koşullarda geliştirilmiştir.

### **3.13. Ekstraselüler ve İntraselüler Ham Enzim Çözeltisinin Hazırlanması**

Ekstraselüler ham enzim çözeltisi için klon kültürleri 10.000 x g’de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant ekstraselüler ham enzim olarak kullanılmıştır.

İntraselüler ham enzim için kültürler santrifüjlendikten (10.000 x g, 10 dakika) süpernatant atılmış ve pelet sonikasyonla liziz tamponu içerisinde liziz edilmiştir. Liziz sonrasında hücre artıkları santrifügasyonla (10.000 x g, 10 dakika) çöktürüldükten sonra süpernatant hücre içi ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır.

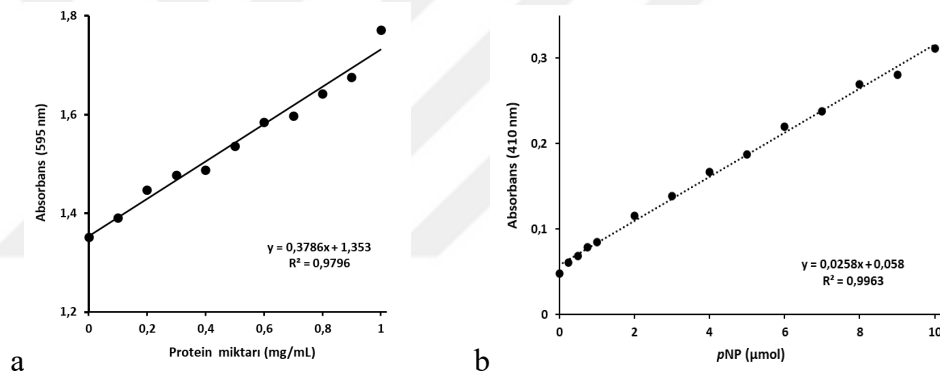
### **3.14. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi**

Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için 100 µL lik protein çözeltisi üzerine 1 mL Bradford çözeltisi eklenmiştir. Karışım vortekslenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 595 nm dalgaboyundaki absorbansı kaydedilmiştir.

Konsantrasyon dana serum albumin (BSA) ile çizilen standart grafiği eğim formülü yardımı ile hesaplanmıştır (Şekil 3.10a).

### 3.15. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi için reaksiyon karışımı 100 µL ham enzim, 870 µL 50 mM fosfat tamponu (pH 7.2), 10 µL %0,4'lük Triton X-100 ve 20 µL 20 mM substrat karışımı (isopropanol içerisinde çözündürülmüş) ile hazırlanarak 37 °C'de 1 dakika inkübe edilmiş. Reaksiyon karışımının 410 nm dalga boyundaki absorbans değişimi tespit edilmiştir. Enzimatik aktivite sonucunda salınan *p*NP miktarı *p*NP standart grafiği yardımı ile hesaplanmıştır (Şekil 3.10b). Bir ünite (U) enzim aktivitesi enzim çözeltisinin her 1 mL'si için pH 7.2 ve 37 °C'de her dakika için substrattan kopardığı *p*NP'nün µmol cinsinden miktarı olarak belirlenmiştir (Adıgüzel, 2020).



Şekil 3.10. Çizilen BSA (a) ve *p*NP (b) standart grafikleri

### 3.16. Alt klonların oluşturulması ve açık okuma çerçevelerinin tespit edilmesi

Alt klonların oluşturulması ve enzim üretiminden sorumlu genin belirlenmesi için enzim üreticisi klondan izole edilen fosmid DNA 2-6 kb büyüklüğünde parçalara ayrılmış ve pUC19 vektörüne (Şekil 3.11) klonlanarak *E. coli* DH5α' da ifade edilmiştir (Cheng vd., 2016; Park vd., 2020). Klonların enzim üretme yetenekleri TRB ve PCL içeren katı besiyerinde taranmıştır.



Ligasyon: DNA parçalarının pUC19'a ligasyonu için; 2 µL 10X ligaz tamponu, 100 mM DTT, 10 mM, 50 ng/µL hazırlanan vektör, 1 µL T4 DNA ligaz, 0,2 pmol hazırlanan fosmid DNA parçaları ve toplam hacim 20 µL olacak şekilde nükleazsız su içeren reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 25 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir.

Kompetan hücrelerin hazırlanması: *E. coli* DH5α LB besiyerinde 37 °C'de 170 rpm hızla çalkalanarak 24 saat geliştirilmiştir. Taze hazırlanmış kültürün 1 mL'si 50 mL'lik LB besiyerine aktarılmış ve taze kültür OD<sub>600</sub>'si 0.4 oluncaya kadar 37 °C'de 170 rpm'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, kültür santrifüjlenmiştir (+4 °C, 8000 x rpm, 2 dakika). Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 250 µL, CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde (60 mM CaCl<sub>2</sub>, %15 gliserol ve 10 mM PIPES) süspanse edilmiştir. Santrifüjleme ve süspanse etme işlemi tekrar edildikten sonra çöktürülen hücreler üzerine bu sefer 30-50 µL CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilerek hücreler -80 °C'de saklanmıştır.

Transformasyon ve klonların enzim üretimi bakımından taranması: Ligasyon reaksiyon karışımından 3.5 µL alınarak 100 µL kompetan hücre süspanسیونuna eklenmiştir. Hücre ve plazmit karışımı 30 dakika buz üzerinde tutulduktan sonra 45 saniye 42 °C'de ısı şokuna uğratılmıştır. Karışım, buz üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra üzerine 0.9 mL LB besiyeri eklenmiş ve 37 °C ve 225 rpm'de 1 saat inkübe edilmiştir. Kültürden 100 µL'si X-GAL ve amfisilin içeren LB besiyerine yayılarak mavi beyaz seçim gerçekleştirilmiştir. Alt klonların enzim üretme potansiyelleri tributirin ve PCL içeren LB agar besiyerleri kullanılarak nokta ekimle belirlenmiştir.

Enzim üretiminden sorumlu genin açık okuma çerçevesinin belirlenmesi: Enzim üretme yeteneğindeki klonlardan plazmid izolasyonu gerçekleştirilerek plazmidin M13 bölgelerinde kalan kısım dizilenmiştir. Dizileme hizmet alımı ile BM Labosis'te yaptırılmıştır. Elde edilen DNA dizileri ile 'ORF finder' kullanılarak açık okuma çerçevesi belirlenmiştir.

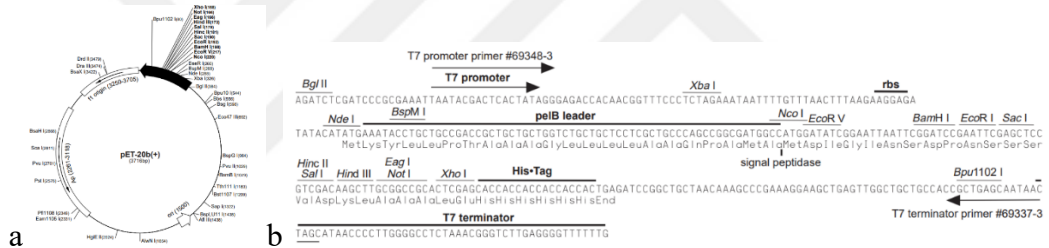
### **3.17. Biyoinformatik çalışmalar**

Enzimin biyoinformatik analizi için DNA dizileri için amino asit dizilerine dönüştürülmüştür. Enzimin en olası işlevi ve sınıflandırması, PFAM veri tabanı kullanılarak HMMER algoritmasına göre belirlenmiştir (Paysan-Lafosse vd., 2022). Enzimin amino asit dizileri ile fonksiyonel homologları arasındaki benzerlik, Blastp

(Altschul vd., 1990) kullanılarak belirlenmiştir. Proteinin fizikokimyasal özellikleri, Expassy ProtoParam aracı (<https://web.expasy.org/protparam/>) aracılığıyla hesaplanmıştır. Aminoasit dizileri MUSCLE algoritmasına göre Clustal W (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) kullanılarak hizalanmış ve ardından Jalview 2.11.2.0 (Waterhouse vd., 2009) kullanılarak görselleştirilmiştir. Enzim ve fonksiyonel homologları arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç MEGA X ile çizilmiştir (Kumar, 2018). Proteinin ikincil yapısı, "Sequence Annotated by Structure (SAS)" (Noby vd., 2020), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>) ve Phyre2 (Kelley vd., 2015) web siteleri üzerinden analiz edilmiştir. Proteinin üç boyutlu (3B) yapısı SWISS-MODEL web sitesi kullanılarak inşa edilmiştir (Waterhouse vd., 2018).

### 3.18. Enzim Kodlayan Genlerin Heterolog İfadesi

Hedef gen pET20b(+) vektörüne (Şekil 3.12) klonlanarak *E. coli* BL21(DE3)'te ifade edilmesi için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir.

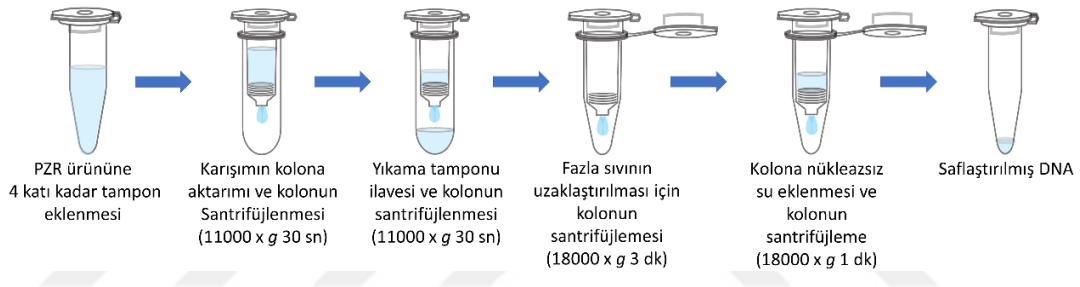


Şekil 3.12. a) pET20b(+) genel haritası. b) Vektörün T7 promotörü altındaki sinyal dizisi, restriksiyon kesim bölgeleri ve histidin etiketinin konumları.

**pET20b(+) plazmidinin izolasyonu:** Plazmid barındıran *E. coli* DH5α suşu Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde -80 °C'de muhafaza edilen bakteri kültür koleksiyonundan temin edilmiştir ve son konsantrasyonu 50 mg/mL olacak şekilde amifisilin içeren LB agar besiyerinde 37 °C'de geliştirilmiştir. Daha sonra, kolonilerden biri amfisisilinli LB broth besiyerine aktarılarak 37 °C'de 175 rpm'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültür her bir ependorf tüpte 1,5 mL olacak şekilde bölüştürüldükten sonra 14000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pelletlerden pET20b(+) izolasyonu fosmid izolasyonunda kullanılan metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Hedef genlerin çoğaltılması:** Hedef gen içindeki restriksiyon kesim bölgeleri NebCutter web aracı kullanılarak analiz edilmiş ve EcoRI kesim bölgesi içerecek

şekilde uygun primerler kullanılarak koloni PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Kalıp DNA olarak, inserti içeren pUC19'u barındıran klonun katı kültürde geliştirilmesi sonucunda oluşan kolonilerin sıcaklıkla patlatılması sonucu açığa çıkan özütü kullanılmıştır. PZR reaksiyon karışımı 10 µL 5X'lik Q5 tamponu (NEB), 1 µL 10 mM'lık dNTP'lerin karışımı, 2.5 µL 10 µM'lık ileri primer, 2.5 µL 10 µM'lık geri primer, 5 µL kalıp DNA, 0.5 µL Q5 DNA polimeraz (NEB) ve 28.5 µL nükleazsız su ile hazırlanmıştır. Termal döngüleyici koşulları ise i) 98 °C'de 30 saniye ön denatürasyon, ii) 98 °C'de 10 sn denatürasyon, iii) 65 °C' de 20 saniye bağlanma, iv) 72 °C 30 saniye uzama ve v) 72 °C 2 dakika son uzama şeklinde 30 döngü olarak ayarlanmıştır. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülendikten sonra Şekil 3.13'te özetlendiği gibi FavorPrep PCR Clean-Up (Favorgen) kiti ile saflaştırılmış ve restriksiyon kesimi için -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.13. PZR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan protokolün grafiksel özeti.

**Plazmid ve çoğaltılan genlerin restriksiyon kesimi:** Restriksiyon kesimi için reaksiyon karışımı 20 µL plazmid ya da PZR ile çoğaltılarak saflaştırılan DNA, 27 µL nükleazsız su, 3 µL 10X EcoRI tamponu (0.5 M Tris-HCl, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl, % 0,2 Triton X-100, 1 mg/mL BSA, pH 7.5) ve 3 µL XhoI (10 U/µL) içerecek şekilde hazırlanmış ve 37 °C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra, reaksiyon karışımı 80 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Kesim sonrasında DNA'lar agaroz jelde görüntülenmiş ve GeneJET Gel Extraction Kiti geri kazanılmıştır.

**Ligasyon:** 7 µL hedef gen 7 µL pET20b(+), 1 µL 10X'lik T4 DNA ligaz tamponu, 1 µL 10 U/µL'lik T4 DNA ligaz ile 1,5 mL'lik ependorf tüpte hazırlanan reaksiyon karışımının 25 °C'de bir gece inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

**Kompetan hücrelerin hazırlanması:** *E. coli* BL21(DE3) hücreleri Inove metodu ile kimyasal olarak alıcı hale getirilmiştir. LB agarda yüzeyindeki bir *E. coli* BL21(DE3) kolonisi LB broth besiyerine aktarılmış ve 8 saat 37 °C'de 200 rpm'de bekletilmiştir. Elde edilen sıvı kültür aşısı olarak kullanılmıştır. 25 mL LB broth

besiyerine 400 µL aşı aktarılarak bakteriler 18 °C ve 200 rpm çalkalamalı koşullarda kültürün OD<sub>600</sub>'ü 0.5 oluncaya kadar inkübe edilmiştir. Kültür 10 dakika buzda inkübe edilmiş ve ardından +4 °C'de 2500 x g kuvvetinde 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant tamamen uzaklaştırılmış ve pelet üzerine buzda soğutulmuş 8 mL transformasyon tamponu (10 mM PIPES, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6.7) eklenerek hücreler süspanse edilmiştir. Süspansiyon santrifüjlendikten (+4 °C, 2500 x g, 10 dakika) sonra pelet 2 mL transformasyon tamponu ve 150 µL DMSO eklenerek tekrar süspanse edilmiştir. Süspansiyon 10 dakika buzda bekletildikten sonra her 1,5 mL'lik ependorf tüpte 100 µL olacak şekilde bölüştürülmüştür. Tüpler transformasyona kadar -80 °C'de saklanmıştır. Alıcı hücre hazırlığı süresince yapılan tüm santrifüjlemelerde santrifüj iç sıcaklığı öncesinden +4 °C' düşürülmüş, tüm plastik malzemeler kullanılıncaya kadar buz dolabında muhafaza edilmiştir.

Transformasyon: 100 µL'lik alıcı hücre süspansiyonlarına 1.7'şer mL β-merkaptetanol ve her 2 dakikada nazikçe karıştırılarak buzda 10 dakika inkübe edilmiştir. Üzerine 5 µL ligasyon sonrası reaksiyon karışımı ilave edilmiştir. Tüpler 30 dakika buzda bekletildikten sonra 42 °C'de 45 saniye inkübe edilmiştir. Tüpler 2 dakika daha buzda bekletildikten sonra içerisine öncesinden sıcaklığı 42 °C'ye ayarlanmış SOC besiyeri ilave edilerek 1 saat 37 °C'de 220 rpm kuvvetinde çalkalanarak inkübe edilmiştir. Daha sonra, tüp içerisindeki karışım amfisilinli LB agar besiyerine yayılmıştır. Besiyerleri 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

İnsertli plazmidi barındıran klonun seçilimi: Amfisilinli LB agar besiyerinde gelişen kolonilerin replikası yapıldıktan sonra insert varlığı koloni PZR yöntemi ile belirlenmiştir. PZR bölüm 3.6'daki gibi gerçekleştirilmiştir. Ancak kalıp DNA yerine steril kürdan ucu ile besiyeri yüzeyinden alınan bir klon kolonisi kullanılmıştır.

Sıvı kültürde enzim üretimi: İnsert içeren plazmidi barındıran klon amfisilinli LB broth besiyerine aşılanarak 37 °C'de 200 rpm'lik çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiştir. Kültürün 600 nm'deki OD'si 0.6'ya ulaştığında son konsantrasyonu 0.125 mM olacak şekilde IPTG stok çözeltisi (filtre ile sterilize edilmiş 100 mM'lık stok çözeltisi) ilave edilmiştir.

Kısmi saflaştırma: Heterolog olarak ifade edilen enzim amonyum sülfat çökeltme yöntemi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Ham enzim çözeltisi olarak, enzimin heterolog olarak ifade edildiği kültür 10 000 x g'de 10 dakika +4 °C'de santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant kullanılmıştır. Süpernatanta %70'lik

doymunluk seviyesine gelinceye kadar amonyum sülfat eklenerek gece boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, proteinler 9 000 x g'de 30 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Çökelen proteinler hacminin 2 katı kadar tampon içerisinde çözündürülmüş ve aynı tampon karşısında diyaliz edilmiştir.

### 3.19. SDS-PAGE

SDS-PAGE için jel kasetinde önce ayırma jeli, sonrasında ise bunun üzerine yükleme jeli hazırlanmıştır. Jellerin hazırlanması Tablo 3.7'de gösterilmektedir. Örnekler örnek yükleme tamponu ile 1/2 oranında karıştırılmıştır. Karışım 97 °C'de 7 dakika inkübe edildikten sonra soğutulurak jeldeki kuyucuklara doldurulmuştur. Proteinlerin jelde yürütülmesi 200 V'luk sabit akım altında gerçekleştirilmiştir. Örnek yükleme tamponundaki boya jelin tabanına ulaştıktan sonra jel boyama çözeltisinde hafifçe çalkalanarak (50 rpm) 40 dakika bekletilmiştir. Jel, yıkama çözeltisi içinde 1 gece boyunca hafifçe çalkalanarak (50 rpm) bekletildikten sonra görüntülenmiştir.

Tablo 3.7. Ayırma ve yükleme jellerinin hazırlanışı

| Bileşen                 | Yükleme jelindeki miktarı | Ayırma jelindeki miktarı |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Akrilamid-bis akrilamid | 666 µL                    | 3330 µL                  |
| Yükleme jeli tamponu    | 1280 µL                   | -                        |
| Ayırma jeli tamponu     | -                         | 2500 µL                  |
| Distile su              | 3100 µL                   | 4100 µL                  |
| SDS (%10)               | 50 µL                     | 100 µL                   |
| APS                     | 25 µL                     | 15 µL                    |
| TEMED                   | 60 µL                     | 15 µL                    |

### 3.20. Enzimin optimum çalışma pH'sının belirlenmesi

Enzimin optimum çalışma pH'sının belirlenmesi için farklı pH'lardaki (pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) görece aktivitesi tespit edilecektir. Reaksiyon ortamları asetat tamponu (pH 4-6), fosfat tamponu (pH 6-7), Tris-HCl tamponu (pH 7-9) ve Glisin-NaOH tamponu (pH 8-10) ile hazırlanacaktır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'daki aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir (Zarafeta vd., 2016).

### 3.21. Enzimin farklı pH'lardaki kararlılığının belirlenmesi

Enzim farklı pH'lardaki reaksiyon karışımı içerisinde substrat eklenmeksizin 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Substrat ilave edilir edilmez enzim analizi gerçekleştirilmiştir. Enzimin başlangıçtaki aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.

### **3.22. Enzimin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi**

Enzimin optimum çalışma pH'sının belirlenmesi için aktivite ölçümleri sırasında reaksiyon ayrı ayrı farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C) gerçekleştirilecektir. Tespit edilen en yüksek aktivite %100 olarak kabul edilmiş ve bu sıcaklık enzimin optimum çalışma sıcaklığı olarak sunulmuştur.

### **3.23. Enzimin farklı sıcaklıklardaki kararlılığının belirlenmesi**

Enzim farklı sıcaklıklarda (30-60 °C) 300 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra aktivitesi standart yöntemle ölçülmüştür. Enzimin inkübe edilmeden önceki aktivitesi %100 kabul edilerek kalan aktivitesi % görece aktivite olarak sunulmuştur.

### **3.24. Enzimin NaCl varlığındaki aktivitesinin belirlenmesi**

Enzimin NaCl varlığındaki aktivitesinin belirlenmesi için aktivite ölçümleri farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren reaksiyon karışımlarında gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen en yüksek aktivite %100 olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Plastik Örneklerinin Toplanması ve Çevresel DNA'ların izolasyonu

Teknolojik gelişmeler ve hızlı nüfus artışı neticesinde dünya genelinde plastikler gibi sentetik materyallerin üretimi ve tüketimi giderek artmaktadır. Çok sayıda sentetik materyal hem üretim aşamasında hem de kullanımları sonrasında doğrudan ya da dolaylı olarak çevreye dağılmaktadır. Hatta, plastik atıklarla ilgili yapılan bir çalışma kapsamında denizlerdeki çöpün %80-85'inin makro ve mikro-plastiklerden oluştuğu ve bu durumun çevre ve sağlık açısından önemli bir tehdit olduğu rapor edilmiştir (Wright vd., 2020). Sentetik maddelerin ve zararlı kimyasalların çevreye etkilerinin azaltılması için birtakım önlemler alınmaktadır. Bunlardan biri hem günlük yaşamda hem de endüstride sentetiklerin kullanımının azaltılması ve gerektiği takdirde yerlerine biyolojik temelli muadillerinin tercih edilmesidir. Bu kapsamda gerek sivil toplum gerekse de kamu tarafından çok sayıda kampanya ve girişim gerçekleştirilmektedir. Ancak; hızlı ve çarpık kentleşme, plansız sanayileşme ve kuralsız tüketim alışkanlıklarında dolayı bu kampanya ve girişimler de sentetik maddelerin kullanımını ve ekosisteme girişini azaltamamaktadır. Ayrıca; doğal polimer bazlı biyolojik maddelerin mekanik ve kimyasal etkenlere karşı direncinin düşük olması, zor işlenebilir yapısı ve yüksek maliyeti sentetik maddelerle rekabetini zorlamaktadır. Bundan dolayı, araştırmacılar bir süredir sentetik materyallerin çevreye zararını azaltabilmek için kullanılacak arıtım ve dönüştürme teknolojileri üzerine yoğunlaşmışlardır. Hatta bu kapsamda fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal birtakım çözümler de üretebilmişlerdir. Ancak, ilave toksik yan ürünlerin açığa çıkması, yüksek kurulum ve işletme maliyetlerinin olması, işletme sırasında çalışanlar üzerinde oldukça ciddi risk ve tehditler ortaya çıkma potansiyelinin yüksekliği bu süreçlerin pratikte kullanımlarını sınırlamaktadır. Alternatif olarak ise, sentetik madde gideriminde mikroorganizmaların ya da enzimlerin kullanıldığı süreçler önerilmektedir (Montazer vd., 2018). Bu süreçler her ne kadar güncelliğini korumakta olsa da doğada bulunan birçok mikroorganizmanın laboratuvar ortamında kültüre edilememeleri neticesinde birçok bakteriden ve genomlarındaki bilgiden yararlanılamadığı bilinmektedir. Belirli bir alanda kültüre edilemeyen bakterilerin genomlarındaki fonksiyonel bilgiye erişebilmemizi ve bu bilgiyi biyoteknolojik süreçlerde kullanabilmemizi sağlayan alternatiflerden biri fonksiyonel metagenomiktir. Fonksiyonel metagenomik çalışmalarında çevresel DNA'ların elde

edileceği bölge ya da materyalin seçimi kritik basamaklardan biridir. Mevcut mikrobiyal çeşitlilik göz önünde bulundurulduğunda, herhangi bir bölgeden izole edilen DNA'larla kurulacak bir metagenomik kütüphanedeki plastik üzerine etkili kütinolitik enzimlere ait genlerin oranının çok düşük olması oldukça muhtemeldir. Ancak, belirli bir karbon kaynağını etkin şekilde kullanabilen bakterilerin ilgili karbon kaynağının yoğun miktarda bulunduğu yerlerde diğer bakterilere oranla daha fazla olabileceği uzun süredir bilinen bir olgudur. Bununla birlikte, plastik yüzeylerinde estera, kütinaz, PETaz ve lipaz gibi sentetik polimerler üzerinde de katalitik etki gösteren enzimleri üretebilen bakterilerin varlığına ilişkin bir kısım çalışma yakın zamanda rapor edilmiştir (Puglisi vd., 2019; Roager ve Sonnenschein 2019; Adiguzel 2020, Akçaözoğlu vd., 2021; Gao ve Sun 2021). Plastik yüzeylerinin çok sayıda bakteriye ve bunlara ait DNA'lara ev sahipliği yaptığı yönündeki raporlardan hareketle tez çalışmasının birinci basamağında metagenomik kütüphanelerin oluşturulmasında kullanılacak çevresel DNA'lar kumsalların gelgit düzlüklerinden toplanan plastik parçalarından izole edilmiştir.

Fonksiyonel metagenomik çalışmalardaki diğer önemli basamak DNA izolasyonudur. İzole edilen çevresel DNA, izolasyonun gerçekleştirildiği bölgedeki tüm hücreleri temsil edebilmeli, metagenomik kütüphanelerin hazırlanması için yeterli miktarda ve yüksek kalitede olmalıdır. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında DNA'ların mikroplastikler üzerinden izolasyonu için Debeljak ve ark.'nın (2017) önerdiği gibi standart fenol-kloroform metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Modifikasyon, izolasyon sırasında plastikler üzerinde olası biyofilm tabakasının dağılabilmesi için "zirkonyum bilyelerle vorteksleme" basamağı ilave edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonucunda elde edilen her bir örnekleme alanına ait DNA çözeltilerinin yoğunlukları Tablo 4.1'de gösterilmektedir. Çalışma neticesinde; en fazla DNA Kadınlar, en az DNA ise Gümbet kumsalından toplanan mikroplastiklerden geri kazanılmıştır. İzole edilen çevresel DNA'ların konsantrasyonu bölgelere bağlı olarak 370-1448 ng/μL arasında değişiklik göstermiştir. Geri kazanılan DNA miktarlarındaki farklılıklar rastgele seçilen plastik parçalarının Ogonowski ve ark.'nın (2018) belirttiği gibi farklı boyutlarda ve şekillerde olmasından kaynaklıdır. İzole edilen DNA çözeltilerinin kalitesi 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanslarının oranlarına göre değerlendirilmiştir (Tablo 4. 1). DNA çözeltilerinin  $A_{260}/A_{280}$  oranları 1.79-2.05 aralığında gözlemlenmiştir. DNA çözeltilerinin  $A_{260}/A_{280}$

oranları 1,7–2,0 aralığında olduğunda DNA'nın yeterli seviyede saf olduğu, bu oranın 1,8 olduğu koşullarda ise tatmin edici derecede saf kabul edilmektedir (Piskata vd., 2019). DNA'nın proteinlerle kontaminasyonu genellikle  $A_{260}/A_{280}$  oranını 1,7'den daha az değerlere düşüşüne neden olmaktadır (Cawthorn vd., 2011). İlave olarak, fenol veya etanol gibi DNA ekstraksiyon prosedüründen taşınan artık safsızlıkların da  $A_{260}/A_{280}$  oranını azalttığı çokça rapor edilmiştir (Wilfinger vd., 2006). Bu bilgiler ışığında tez kapsamında mikroplastiklerden izole edilen çevresel DNA'ların kalitesinin çalışma için yeterli seviyede olduğu değerlendirilmesi yapılmıştır.

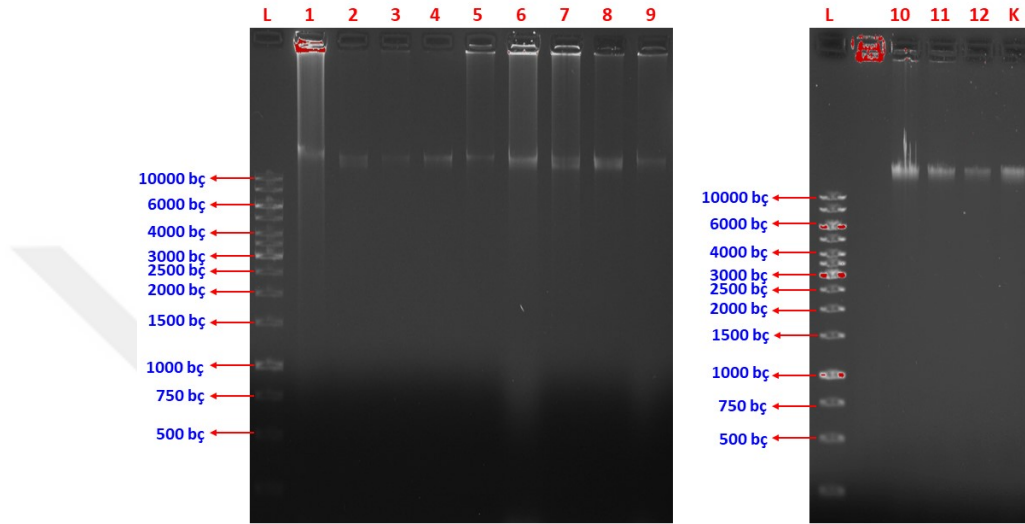
Tablo 4.1. Mikroplastiklerin yüzeyinden izole edilen DNA'ların yoğunlukları ve  $A_{260}/A_{280}$  değerleri

| DNA'ların izole edildiği plastiklerin toplandığı örnekleme alanı | DNA yoğunluğu<br>(ng/ $\mu$ L) | $A_{260}/A_{280}$ |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| Hatay-Samandağı-Çevlik Kumsalı                                   | 642                            | 1.89              |
| Mersin-Erdemli-Kız Kalesi Kumsalı                                | 685                            | 2.05              |
| Antalya-Konyaaltı Kumsalı                                        | 706                            | 1.96              |
| Muğla-Bodrum-Gümbet Kumsalı                                      | 370                            | 1.89              |
| Aydın-Kuşadası-Kadınlar Kumsalı                                  | 1448                           | 2.01              |
| Balıkesir-Edremit-Altinkum Kumsalı                               | 692                            | 1.85              |
| Gebze-Darica-Bayramoğlu Ada Kumsalı                              | 677                            | 1.92              |
| İstanbul-Şile-Halk Kumsalı                                       | 762                            | 1.85              |
| Sinop-Aklıman-Aklıman Kumsalı                                    | 489                            | 1.82              |
| Samsun-Atakum-Halk kumsalı                                       | 442                            | 1.92              |
| Ordu-Fatsa-Bolaman Kalesi Kumsalı                                | 903                            | 1.84              |
| Trabzon-Kaşüstü Kumsalı                                          | 1089                           | 1.79              |

Literatürde plastik yüzeylerinden çevresel DNA izolasyonu ile ilgili olarak sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Okyanusdan toplanan mikroplastiklerden DNA izolasyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada sunulan bu tezde kullanılan yöntemle her bir 1.5 mm'lik plastik parçalarından yaklaşık 1 ng/ $\mu$ L'lik DNA'nın izole edildiği rapor edilmiştir (Debeljak vd., 2017). Fenol-kloroform yöntemi uygulanarak plastik yüzeylerinden çevresel DNA izolasyonunun gerçekleştirilebileceği Oberbeckmann vd. (2016), Dussud vd. (2018a) ve Dussud vd. (2018b) tarafından yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir. De Tender vd., (2015) Kuzey Denizin Belçika tarafından toplanan plastik yüzeyinde kolonize olmuş bakterilere ait DNA'ları Powersoil DNA İzolasyon Kiti (MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA) ile izole

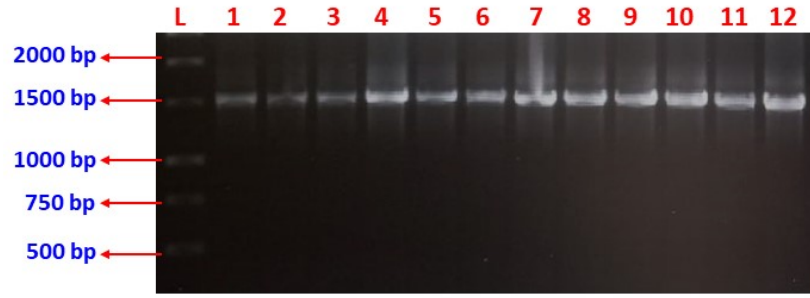
etmişlerdir. Sonuçta 5 ng/mL’de daha az yoğunlukta DNA elde edebilmişlerdir. Puglisi vd. (2019) ve Krause vd. (2020)’nin gerçekleştirdiği çalışmalarda ise 0.5 g’lık plastik parçalardan Fast DNA SPIN Kiti (Q-BIOgene, Heidelberg, Germany) kullanılarak 16S amplikon sekanslama için yeterli miktar DNA izole edilebilmiştir.

Tez kapsamında mikroplastiklerden izole edilen DNA’ların %1’lik agaroz jelde üzerindeki görüntüleri Şekil 4.1’de sunulmaktadır.



Şekil 4.1. Çevlik (1), Kız Kalesi (2), Konyaaltı (3), Gümbet (4), Kadınlar (5), Altınkum (6), Bayramoğlu (7), -Şile (8), Aklıman (9), Atakum (10), Bolaman (11) ve Kaşüstü (12) kumsalları örnekleme alanlarından izole edilen DNA’ların %1’lik agaroz jeldeki görüntüleri. Şahit DNA’nın yürütüldüğü hat L ile gösterilmiştir.

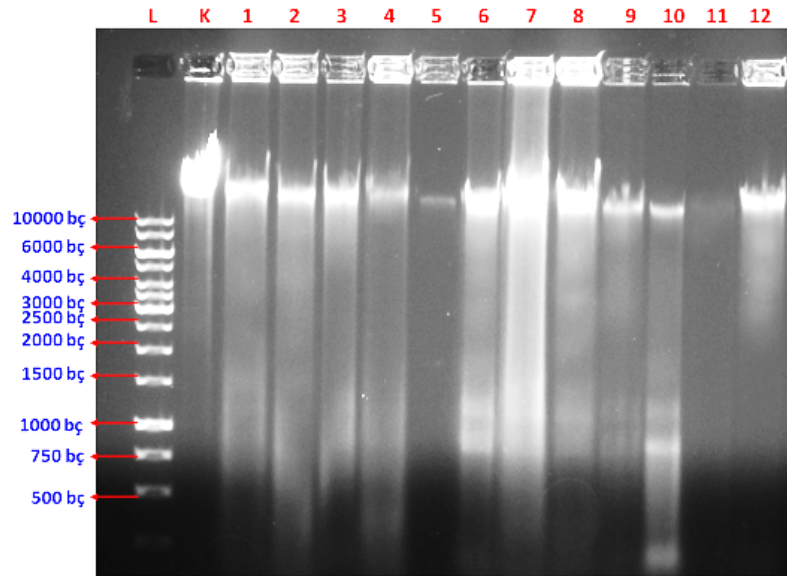
İzole edilen çevresel DNA içerisinde bakterilere ait genetik materyalin doğrulanması için bu DNA’lar kullanılarak hazırlanan PZR reaksiyonları ile 16S rRNA geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. 16s rRNA geni, bakterilerin birbiri arasındaki filogenetik ilişkisini anlamak için kullanılan moleküler belirteçlerden biridir ve yaklaşık 1500 bp’lik büyüklüktedir. Şekil 4.2’de gösterilen agaroz jel elektroforezi analizi neticesinde izole edilen tüm çevresel DNA örneklerinden 16S rRNA geninin PZR ile çoğaltılabildiği gözlemlenmiştir. Böylelikle çevresel DNA örneklerinin bakterilere ait DNA örneklerini içerdiği kanıtlanmıştır.



Şekil 4.2. Çevlik (1), Kız Kalesi (2), Konyaaltı (3), Gümbet (4), Kadınlar (5), Altinkum (6), Bayramoğlu (7), -Şile (8), Aklıman (9), Atakum (10), Bolaman (11) ve Kaşüstü (12) kumsalları örnekleme alanlarına ait izolasyon sonrası DNA çözeltilerinden çoğaltılan 16S rRNA genlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri. Şahit DNA'nın yürütüldüğü hat L ile gösterilmiştir.

#### 4.2. Çevresel DNA'ların fragmentasyonu

Fonksiyonel metagenomik çalışmalarında çevresel DNA'ların fragmentasyonu için enzimatik parçalama başta olmak üzere ventilatör ile parçalama, kimyasallarla parçalama gibi metotlar kullanılabilir (Xing vd., 2020). Ancak tez kapsamında şiddetli pipetajlama metodu tercih edilmiştir (Maruthamuthu vd., 2016; dos Santos Goncalves vd., 2020; Pabbathi vd., 2021; Lee vd., 2021). Şiddetli pipetajlama ile parçalanan DNA'lar %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.3). Agaroz jel üzerindeki görüntülerin daha önce yapılan benzer çalışmalardakilerle karşılaştırıldığında fragmentasyon veriminin yeterli seviyede olduğu görülmüştür (Couto vd., 2010; Devi vd., 2015).



Şekil 4.3. Çevlik (1), Kız Kalesi (2), Konyaaltı (3), Gümbet (4), Kadınlar (5), Altinkum (6), Bayramoğlu (7), -Şile (8), Aklıman (9), Atakum (10), Bolaman (11) ve Kaşüstü (12) kumsalları

örnekleme alanlarından izole edilen DNA'ların fragmentasyonu sonrasında %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri. Şahit DNA'nın yürütüldüğü hat L ile gösterilmiştir.

### 4.3. Metagenomik kütüphanelerin oluşturulması

Metagenomik kütüphane oluşturmak için kullanılan fosmid *E. coli* EPI300-T1 konağına kloramfenikol direnci sağlamaktadır. Bundan dolayı, transfeksiyon sonrasında 12,5 µg/mL kloramfenikol içeren LB agar besiyerlerinde koloni oluşumunun Şekil 4.4'teki gibi görülmesi kütüphanenin başarılı şekilde kurulabildiğini göstermektedir.

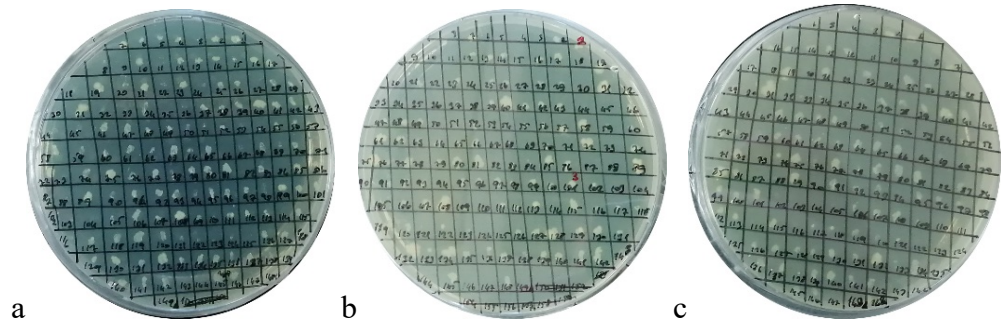


Şekil 4.4. Transfeksiyon sonrasında hücrelerin kloramfenikol içeren LB agar besiyerlerinde gelişimi

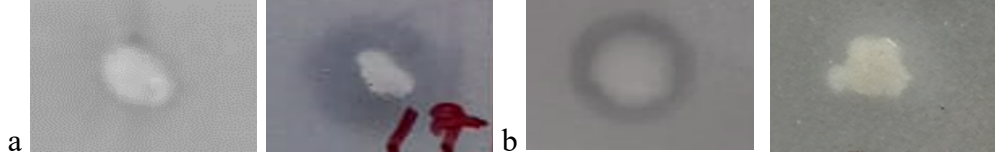
### 4.4. Metagenomik kütüphanelerdeki klonların katı besiyerinde enzim üretme kapasitelerinin taranması

Oluşturulan kütüphanelerdeki klonlar kütinolitik enzim kodlayan geni içeren DNA parçası bulunduran fosmid varlığı her bir klonun Şekil 4.5'te gösterildiği gibi aynı anda KiLB, TrLB ve PcLB agarlarda geliştirilmesi ve sonrasında TrLB ve PcLB agarlardaki TRB ve PCL parçalayıcı etkilerinin belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.6'deki örnekteki gibi TrLB ve PcLB besiyerinde gelişen koloniler etrafında şeffaf zon oluşumları kolonilerin sırasıyla tributirin ve polikaprolaktonu parçalayabildiği yönünde değerlendirilmiştir.



Şekil 4.5. Transfekte klonların kloroform ile desteklenmiş LB (a), TrLB (b) ve PcLB (c) agar besiyerlerinde nokta ekimi sonrasında geliştirilmesi.



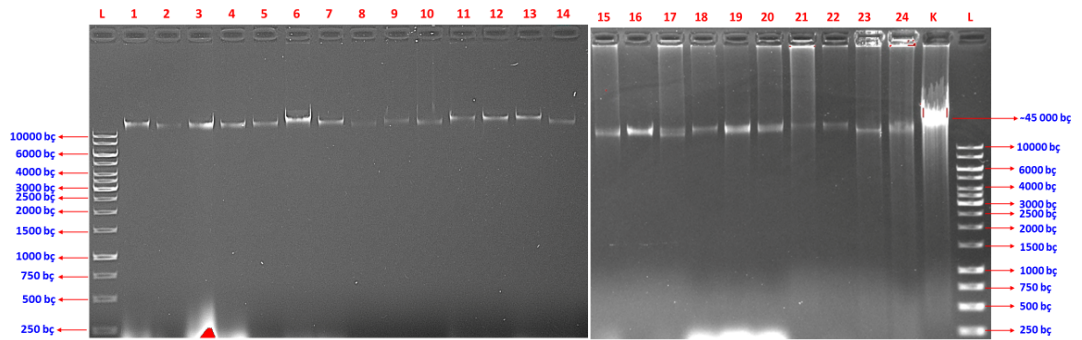
Şekil 4.6. TR (a) ve PCL (b) parçalayabilen klonlara ait kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zon örnekleri

Örnekleme alanlarına ait metagenomik kütüphanelerdeki klonların tarama deneyleri sonuçları Tablo 2’de gösterilmektedir. Tüm kütüphanelerdeki taramalar neticesinde kolonlardan 184 tanesinin TRB’yi, 30 tanesinin PCL’yi ve 24 tanesinin ise hem TRB’yi hem de PCL’yi parçaladığı belirlenmiştir. TRB ve PCL’yi parçalayabilenler (24 adet) kütinolitik aktivite sergileme yeteneğine sahip şeklinde değerlendirilmiştir. Bu klonlar içerdikleri DNA parçasının elde edildikleri örnekleme alanı ve sırasına göre isimlendirilmiştir. Örneğin; klon CEV01, Çevlik Kumsalı’ndan toplanan örneklerden izole edilmiş DNA ile hazırlanan metagenomik kütüphanenin taraması sonucunda hem TRB hem de PCL parçalayabilen birinci klon olarak ifade edilmiştir. Tüm taramalar neticesinde TRB, PCL ve ikisini birlikte parçalama yeteneğine sahip klon oranı sırasıyla yaklaşık  $\sim 1/3261$ ,  $1/20000$ , ve  $1/25000$  olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz oranların literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Yan vd. (2021b)’nin gerçekleştirdiği bir çalışmada topraktan çevresel DNA örnekleri izole edilerek oluşturulan metagenomik kütüphanelerde karboksilesteraz geni barındıran klonlar taranmıştır. Yaklaşık 60 000 klonun taranması neticesinde 9 klonun katı besiyerinde tributirini parçalayabildiğini tespit etmişlerdir. Qiu vd. (2020) lotus göleti çamuru DNA’larından kurdukları metagenomik kütüphanedeki 97000 klondan 14’ünün tributirinli agar besiyerinde zon oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Park vd. (2020), komposttan izole ettikleri çevresel DNA ile oluşturdukları metagenomik kütüphanedeki klonları esteraz aktivitesi sergileme açısından taramışlar ve neticede 13 000 klondan 11 tanesinin (Tablo 4.2) tributirin üzerinde hidrolitik etki sergileyebildiğini tespit etmişlerdir. Sulaiman vd. (2012)’nin polietilen tereftalatı (PET) üzerine gerçekleştirdiği çalışmada ise, kompostdan izole edilen DNA parçalarını içeren 6000 klonun yalnızca 19 tanesinin tributirini parçalayabildiği tespit edilmiştir. Literatürdeki fonksiyonel metagenomik çalışmalarında kütinolitik aktivite gösteren klonların taranması için doğrudan PCL’li agarların kullanıldığı bilginiz dahilinde herhangi bir çalışma bulunmadığı için buna yönelik bir kıyaslama yapılamamaktadır.

Tablo 4.2. Farklı örnekleme alanlarındaki DNA parçaları kullanılarak inşa edilen metagenomik kütüphanelerden taranan klonlar arasında TRB, PCL ve her ikisini katı besiyerinde parçalayabilen klonların sayıları

| Örnekleme alanı        | TRB pozitif klon sayısı | PCL pozitif klon sayısı | Hem TRB hem PCL pozitif klon sayısı |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Çevlik Kumsalı         | 22                      | 3                       | 2                                   |
| Kız Kalesi Kumsalı     | 5                       | 3                       | 2                                   |
| Konyaaltı Kumsalı      | 18                      | 3                       | 2                                   |
| Gümbet Kumsalı         | 16                      | 2                       | 1                                   |
| Kadınlar Kumsalı       | 17                      | 4                       | 4                                   |
| Altinkum Kumsalı       | 14                      | 2                       | 2                                   |
| Bayramoğlu Ada Kumsalı | 22                      | 2                       | 2                                   |
| Şile Halk Kumsalı      | 21                      | 2                       | 1                                   |
| Aklıman Kumsalı        | 12                      | 2                       | 2                                   |
| Atakum Halk kumsalı    | 15                      | 2                       | 1                                   |
| Bolaman Kalesi Kumsalı | 13                      | 2                       | 2                                   |
| Kaşüstü Kumsalı        | 9                       | 3                       | 3                                   |

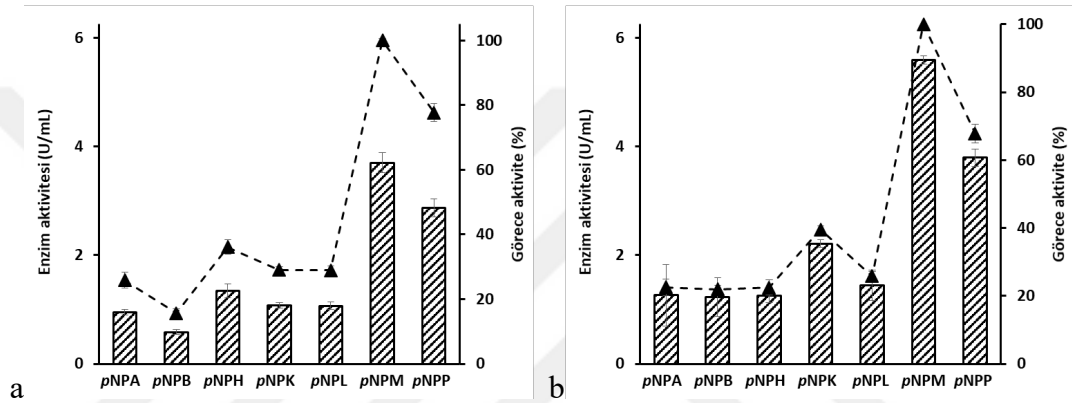
Hem TRB hem de PCL'yi katı besiyerinde parçalayabilen yani kütinolitik enzim kodlayan geni barındırma potansiyeline sahip klonlardan izole edilerek Şekil 4.7.'de gösterildiği üzere agaroz jel elektroforezi tekniği ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme neticesinde tüm pozitif klonlarda farklı büyüklükte fosmid olduğu görülmüştür. Bu durum, her bir parçasında farklı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 4.7. Kütinolitik aktivite gösteren CEV01 (1), CEV02 (2), KIZ01 (3), KIZ02 (4), KON01 (5), KON02 (7), GUM01 (7), KAD01 (8), KAD02 (9), KAD03 (10), KAD04 (11), ALT01 (12), ALT02 (13), BAY01 (14), BAY02 (15), SIL01 (16), AKL01 (17), AKL02 (18), ATA01 (19), BOL01 (20), BOL02 (21), KAS01 (22), KAS02 (23), KAS03 (24) kodlu klonlardan izole edilen fosmidler ve şahit DNA'nın (L) %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.

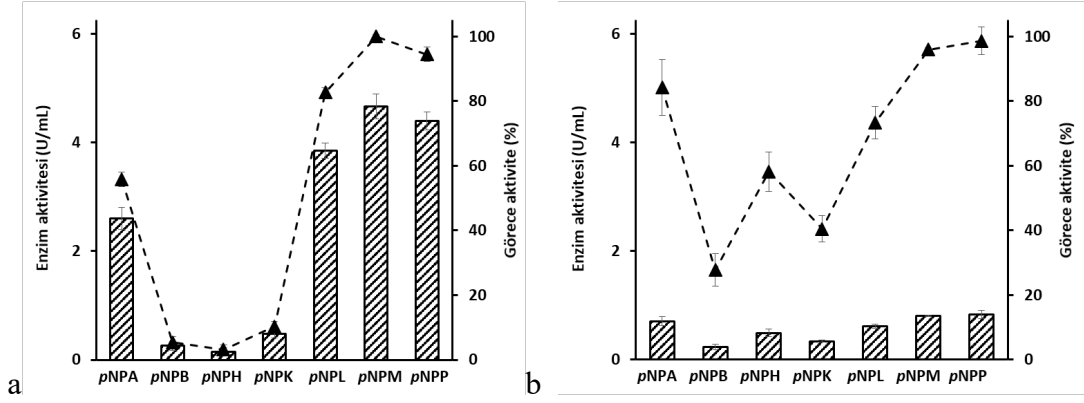
#### 4.5. Katı besiyerinde enzim üretme kapasitesi olan klonların sıvı besiyerinde enzim üretimlerinin taranması

CEV01 için hücre içi protein toplam protein miktarı  $24.54 \pm 0.26$  mg/mL olarak belirlenmiştir. Hücre içi protein çözeltisi en yüksek aktiviteyi  $3.70 \pm 0.3$  U/mL aktiviteyi ile *p*NPM karşısında en düşük aktiviteyi ise  $0.5 \pm 0.08$  U/mL ile *p*NPB karşısında kaydedilmiştir (Şekil 4.8a). CEV01 kültürünün hücre dışı protein miktarı ise 0.13 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Hücre dışı protein çözeltisi en yüksek hidrolitik etkiyi  $5.59 \pm 0.07$  U/mL ile *p*NPM, en düşüğü ise  $1.23 \pm 0.21$  U/mL ile *p*NPB karşısında sergilemiştir (Şekil 4.8b). Ayrıca enzimin *p*NPM karşısındaki aktivitesi %100 olarak kabul edildiğinde *p*NPP hariç diğerleri karşısındaki aktivitesinin %40'ın altında olduğu hesaplanmıştır.



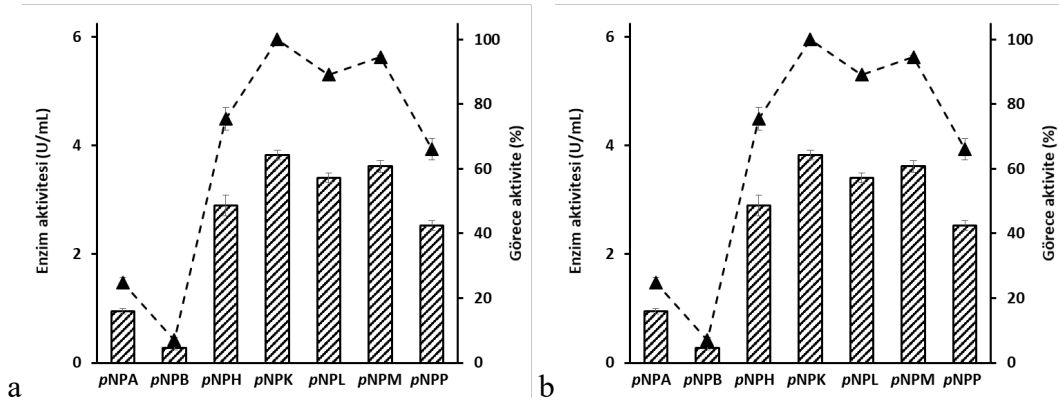
Şekil 4.8. CEV01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

CEV02 klonunun ise hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltisindeki protein konsantrasyonları sırasıyla  $24.41 \pm 0.58$  mg/mL ve  $0.13 \pm 0.01$  mg/mL olarak tespit edilmiştir. CEV02 klonu için hücre içi ham enzim çözeltisi *p*NPM ( $4.66 \pm 0.4$  U/mL), *p*NPP ( $4.40 \pm 0.29$  U/mL), *p*NPL ( $3.85 \pm 0.24$  U/mL) ve *p*NPA ( $2.60 \pm 0.20$  U/mL) karşısında yüksek aktivite gösterdiği diğer substratlar karşısındaki ilgisinin ise oldukça düşük olduğu ( $0.24$ - $0.35$  U/mL) kaydedilmiştir (Şekil 4.9a). Hücre dışı ham enzim çözeltisi ise maksimum hidrolitik aktiviteyi *p*NPP ( $0.80 \pm 0.01$  U/mL) üzerine sergilemiştir. Enzimin *p*NPP ve *p*NPA karşısındaki görece aktivitesinin sırasıyla  $95.7 \pm 4.00$  ve  $84.26 \pm 5.02$  olduğu görülmüştür (Şekil 4.9b). Hücre dışı ham enzimin en düşük hidrolitik aktivitesinin ise *p*NPB ( $0.23 \pm 0.02$  U/mL) üzerine olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. CEV02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

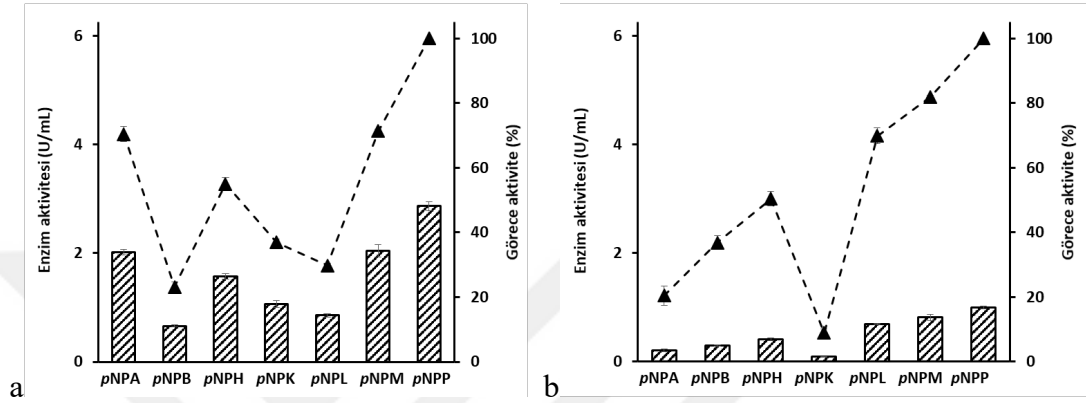
KIZ01 klonunun hücre içi ham enzim çözeltisindeki protein miktarı  $24.14 \pm 0.50$  mg/mL olarak tespit edilmişken hücre dışı ve hücre dışı ve  $0.28 \pm 0.02$  mg/mL olarak belirlenmiştir. KIZ01 klonu hücre içi ham enzim çözeltisinin pNPK, pNPM, pNPL, pNPP ve pNPH karşısındaki aktivitesi sırasıyla  $3.83 \pm 0.15$  U/mL,  $3.62 \pm 0.18$  U/mL,  $3.53 \pm 0.15$  U/mL,  $2.62 \pm 0.15$  U/mL ve  $2.89 \pm 0.33$  U/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10a). Ek olarak, pNPA ve pNPM karşısındaki aktivitesi ise sırasıyla  $0.95 \pm 0.09$  U/mL ve  $0.27 \pm 0.05$  U/mL olarak hesaplanmıştır. KIZ01 klonunun hücre dışı enzim çözeltisi ise en yüksek aktiviteyi ( $1.23 \pm 0.05$  U/mL) pNPM karşısında sergilemiştir. Bunu  $1.19 \pm 0.04$  U/mL ve  $1.02 \pm 0.03$  U/mL ile sırasıyla pNPP ve pNPL karşısında sergilediği aktiviteler takip etmiştir (Şekil 4.10b).



Şekil 4.10. KIZ01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

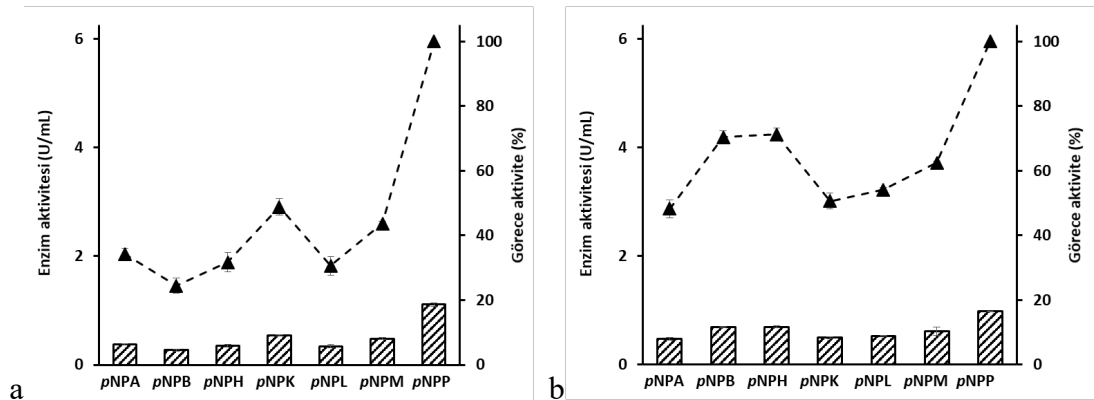
KIZ02 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltisindeki protein konsantrasyonları sırasıyla  $23.30 \pm 0.06$  mg/mL ve  $0.21 \pm 0.02$  mg/mL olarak tespit edilmiştir. KIZ02 kodlu klona ait hücre içi enzim çözeltisinin pNPP, pNPM ve pNPA

karşısındaki aktivitesi sırasıyla  $2.87 \pm 0.14$  U/mL,  $2.05 \pm 0.2$  U/mL ve  $2.02 \pm 0.1$  U/mL olarak tespit edilmiştir. En düşük aktivite ise  $0.66 \pm 0.03$  U/mL ile pNPB karşısında kaydedilmiştir (Şekil 4.11a). Benzer şekilde; hücre dışı enzim çözeltisi de en yüksek ve en düşük aktiviteyi sırasıyla pNPP ( $0.99 \pm 0.04$  U/mL) ve pNPA ( $0.20 \pm 0.04$  U/mL) karşısında sergilemiştir. Hücre dışı ham enzim çözeltisinin pNPB karışısındaki aktivitesi ise  $0.30 \pm 0.02$  U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11b).



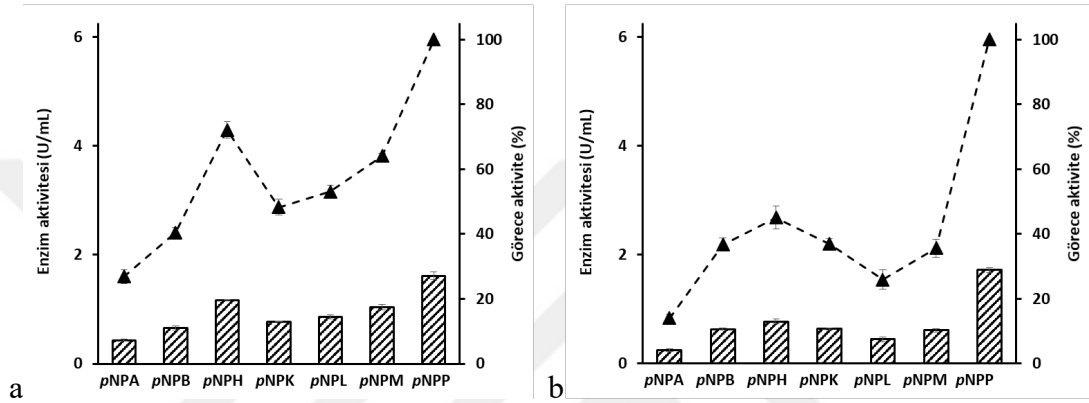
Şekil 4.11. KIZ02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

KON01 klonunun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltisindeki protein konsantrasyonları sırasıyla  $22.67 \pm 0.36$  mg/mL ve  $0.32 \pm 0.06$  mg/mL dir. KON01 klonundan elde edilen hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin pNP-esterleri üzerindeki hidrolitik aktivitelerini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.12a ve Şekil 4.12b’de sunulmuştur. Hücre içi ham enzim çözeltisinin en yüksek aktiviteyi pNPP ( $1.11 \pm 0.05$  U/mL) ile göstermiştir. Diğer substratlar üzerindeki görece aktivitesi %50’nin altındadır. Benzer şekilde hücre dışı ham enzim çözeltisi de en yüksek hidrolitik aktiviteyi  $0.98 \pm 0.02$  U/mL, pNPP ile göstermektedir. Buna karşılık, en düşük aktiviteyi ise  $0.47 \pm 0.05$  U/mL, pNPA ile gösterir.



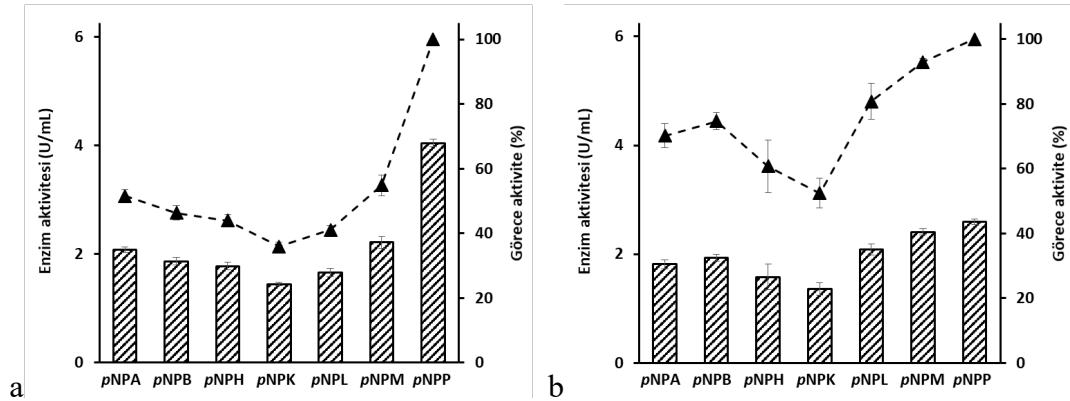
Şekil 4.12. KON01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

KON02 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilisinde protein konsantrasyonu sırası ile  $22.16 \pm 0.43$  ve  $0.25$  U/mL olarak belirlenmiştir. KON02 klonu hücre içi enzim çözeltisi en yüksek aktiviteyi  $1.61 \pm 0.12$  U/mL ile pNPP ve hücre dışında yine pNPP'e karşı ( $1.72 \pm 0.08$  U/mL) göstermiştir. En düşük aktivite ise hücre içi enzim için pNPA hücre dışı enzim için ( $0.24 \pm 0.04$  U/mL), pNPA ile göstermiştir. Bu değerler şekil 4.13a ve Şekil 4.13b ile gösterilmiştir.



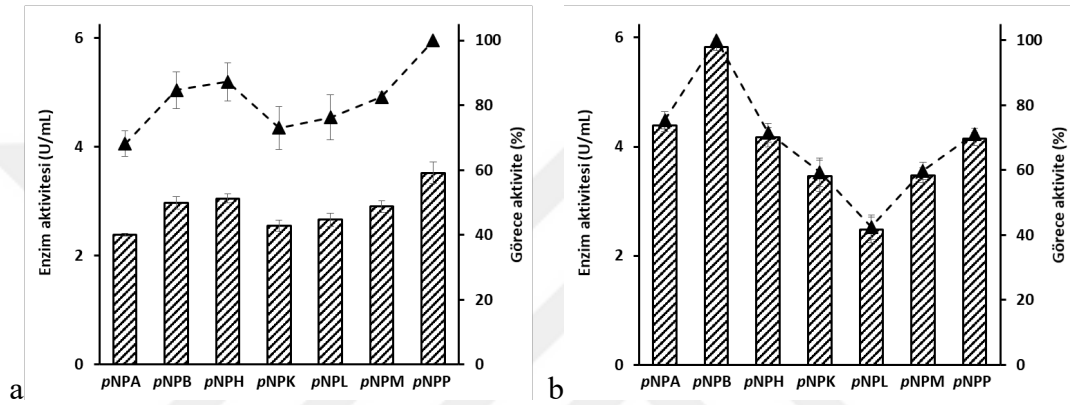
Şekil 4.13. KON02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

GUM01 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerindeki protein konsantrasyonları sırasıyla  $26.09 \pm 0.74$  U/mL ve  $0.34 \pm 0.02$  mg/mL olarak hesaplanmıştır. Hücre içi enzim çözeltisindeki en yüksek aktivite pNPP için ( $4.04 \pm 0.12$  U/mL) gözlemlenmiştir (Şekil 4.14a). Hücre dışı ham enzim çözeltisi pNP-esterler karşısındaki aktivitesinin  $1.35$ - $2.59$  U/mL arasında bulunmuştur (Şekil 4.14b). En yüksek aktivite pNPP ile kaydedilmiştir.



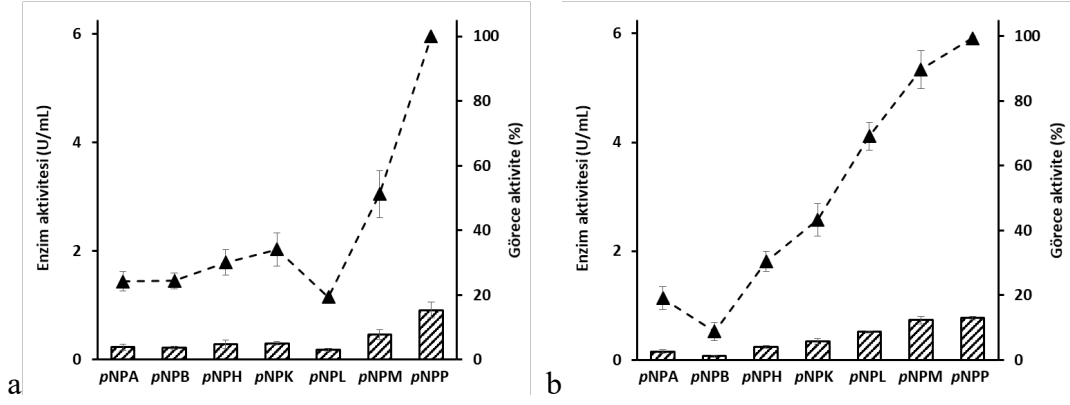
Şekil 4.14. GUM01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

KAD01 klonu için hücre içi ham enzim çözeltisi için toplam protein miktarı  $23.84 \pm 1.28$  mg/mL olarak hesaplanmıştır. Hücre dışı ham enzim çözeltisi protein konsantrasyonu ise  $0.26 \pm 0.07$  mg/mL'dir. Hücre içi enzim çözeltisinin pNPP, pNPH ve pNPB karşısında sergilediği hidrolitik aktivitenin  $3.52 \pm 0.33$  U/mL,  $3.05 \pm 0.15$  U/mL ve  $2.97 \pm 0.2$  olduğu tespit edilmiştir. En yüksek hücre dışı enzim aktivitesi  $5.82 \pm 0.11$  U/mL ile pNPB karşısında kaydedilmiştir (Şekil 4.15b). Bu değeri  $4.38 \pm 0.18$  U/mL ve  $4.17 \pm 0.31$  U/mL'lik aktiviteler ile sırasıyla pNPA ve pNPH takip etmiştir. En düşük enzim aktivitesi ise pNPL ( $2.47 \pm 0.23$  U/mL) karşısında kaydedilmiştir.



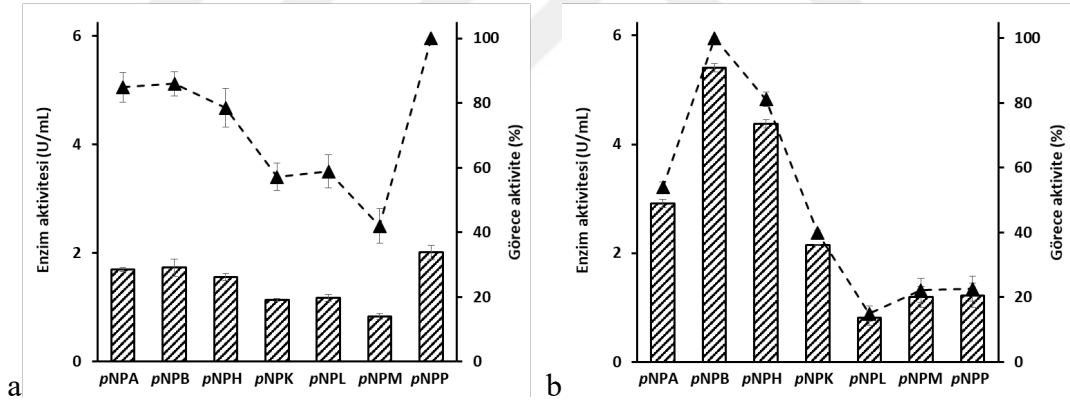
Şekil 4.15. KAD01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

KAD02 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin toplam protein miktarları sırasıyla  $22.64 \pm 0.64$  mg/mL ve  $0.33 \pm 0.12$  mg/mL olarak bulunmuştur. Gerek hücre içi gerekse de hücre dışı ham enzim çözeltilerinin pNP-esterler karşısındaki aktivitelerinin  $0.91$  U/mL'yi geçmediği saptanmış olup her ikisi için de en yüksek aktivitenin pNPP'ye karşı sergilendiği belirlenmiştir (Şekil 4.16). Hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin ilgisinin en düşük olduğu substratlar ise sırasıyla pNPL ( $0.18 \pm 0.05$  U/mL) ve pNPB ( $0.07 \pm 0.03$  U/mL) olarak tespit edilmiştir.



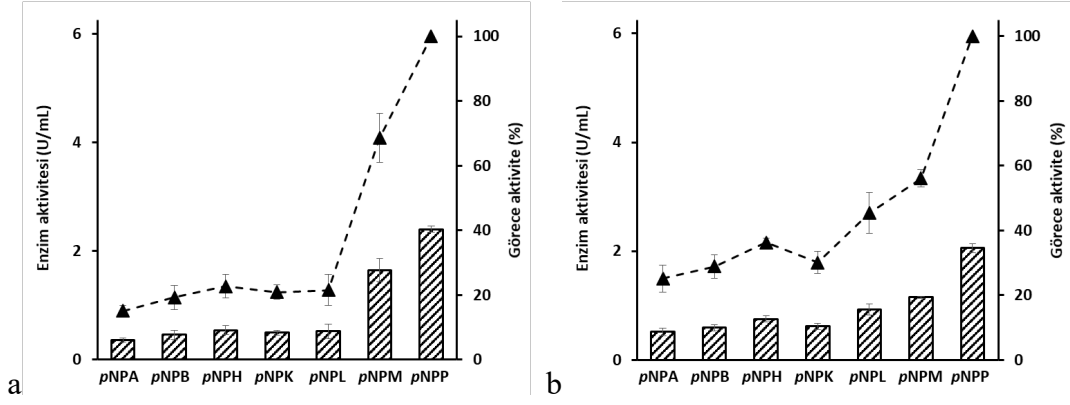
Şekil 4.16. KAD02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

KAD03 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin toplam protein konsantrasyonları sırasıyla  $23.94 \pm 0.73$  mg/mL ve  $0.33 \pm 0.09$  mg/mL olarak ölçülmüştür. Hücre içi ham enzim çözeltisi en yüksek hidrolitik aktiviteyi pNPP'ye ( $2.01 \pm 0.23$  U/mL) karşı göstermiştir (Şekil 4.17). En yüksek aktiviteyi pNPB ( $5.41 \pm 0.13$  U/mL) karşısında sergilemiş, bunu  $4.38 \pm 0.14$  U/mL ve  $2.91 \pm 0.14$  U/mL'lik aktivitelerle pNPH ve pNPA takip etmiştir.



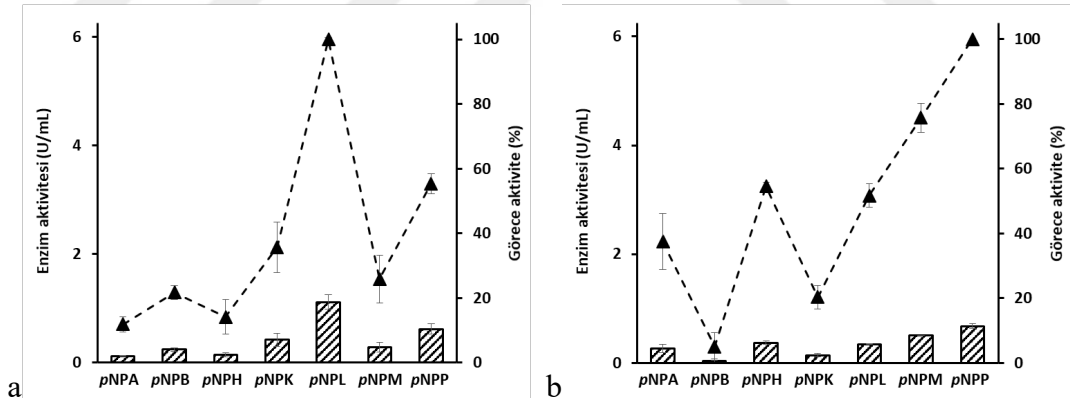
Şekil 4.17. KAD03 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

Hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin toplam protein miktarları KAD04 klonu için sırasıyla  $23.80 \pm 0.73$  mg/mL ve  $0.37 \pm 0.02$  mg/mL olarak belirlenmiştir. Hem hücre içi hem de hücre dışı ham enzim çözeltilerinin en yüksek ( $1.98$ - $2.5$  U/mL) hidrolitik etki gösterdiği substratın pNPP olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).



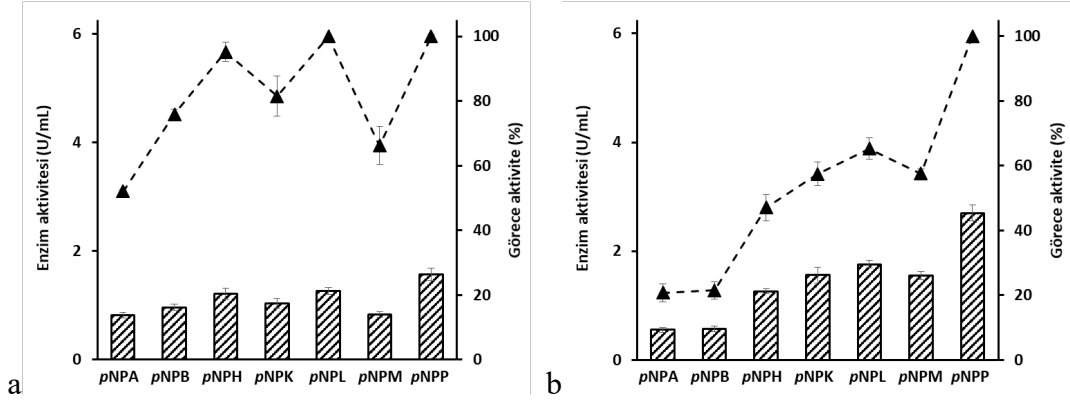
Şekil 4.18. KAD04 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

ALT01 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerindeki protein konsantrasyonları sırasıyla  $19.78 \pm 0.31$  mg/mL ve  $0.36 \pm 0.06$  mg/mL olarak belirlenmiştir. Hücre içi ham enzim çözeltisi maksimum aktiviteyi pNPL ( $1.11 \pm 0.23$  U/mL), en düşük aktiviteyi ise pNPB ( $0.24 \pm 0.06$  U/mL) karşısında sergilemiştir (Şekil 4.19a). Hücre dışı ham enzim çözeltisi ise en yüksek aktiviteyi  $0.67 \pm 0.08$  U/ml ile pNPP üzerine göstermiştir (Şekil 4.19b). Enzim çözeltisinin pNPB üzerindeki hidrolitik etkisinin ise önemsiz sayılabilecek düzeyde olduğu belirlenmiştir.



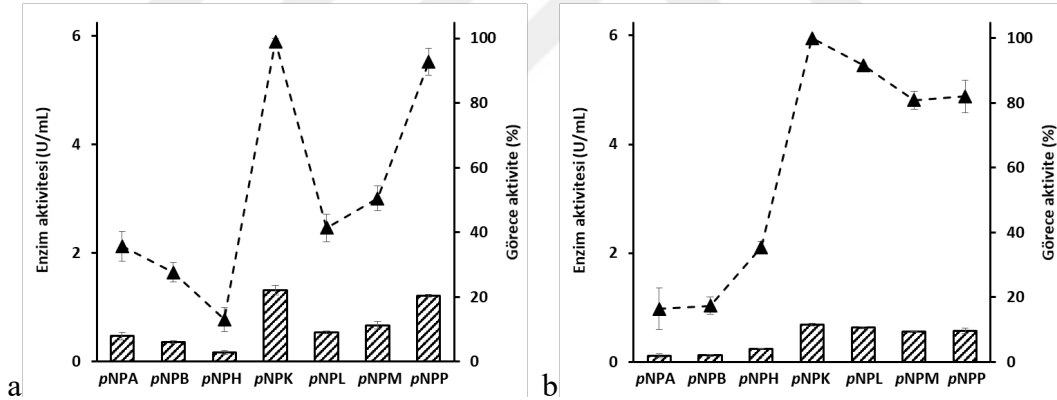
Şekil 4.19. ALT01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

ALT02 klonu hücre içi ve hücre dışı protein çözeltileri için hesaplanan protein konsantrasyonları sırasıyla  $25.20 \pm 0.63$  mg/mL ve  $0.37 \pm 0.01$  mg/mL olarak belirlenmiştir. Hücre içi ve hücre dışı protein çözeltilerinin pNP-esterleri üzerindeki hidrolitik aktiviteleri Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Buna göre; hücre içi ve dışı protein çözeltisi için en yüksek aktivite pNPP karşısında ( $1.57 \pm 0.20$  U/mL ve  $2.70 \pm 0.25$  U/mL) kaydedilmiştir.



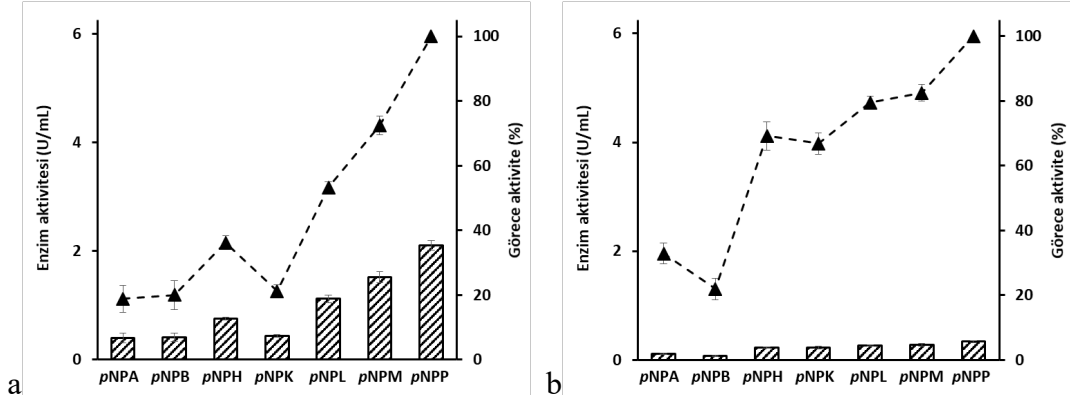
Şekil 4.20. ALT02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

BAY01 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin protein yoğunlukları sırasıyla  $17.87 \pm 0.54$  mg/mL ve  $0.37 \pm 0.05$  mg/mL olarak tespit edilmiştir. Hücre içi ham enzim çözeltisi en yüksek hidrolitik aktiviteyi pNPK ( $1.31 \pm 0.15$  U/mL) üzerine gösterirken en düşük aktiviteyi ise pNPH'ye ( $0.36 \pm 0.05$  U/mL) karşı göstermiştir (Şekil 4.21). Hücre dışı ham enzim çözeltisinin de en yüksek aktivite gösterdiği substratın pNPK ( $0.68 \pm 0.04$  U/mL) olduğu tespit edilmiştir.



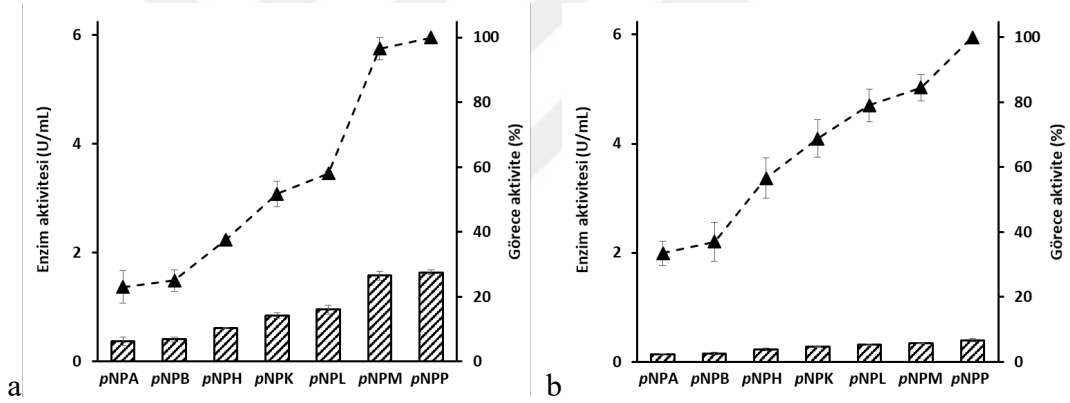
Şekil 4.21. BAY01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

BAY02 klonu hücre içi ham enzim çözeltisinin protein konsantrasyonu  $20.84 \pm 1.52$  olarak belirlenmiştir ve en yüksek aktiviteyi ise  $2.10 \pm 0.15$  U/mL ile pNPP karşısında sergilemiştir. BAY02 klonu hücre dışı ham enzim çözeltisinin protein konsantrasyonu ise  $0.16 \pm 0.02$  mg/mL olarak tespit edilmiştir. Hücre dışı ham enzim çözeltisinin pNP-esterleri üzerinde genel olarak önemli bir hidrolitik etki göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.22).



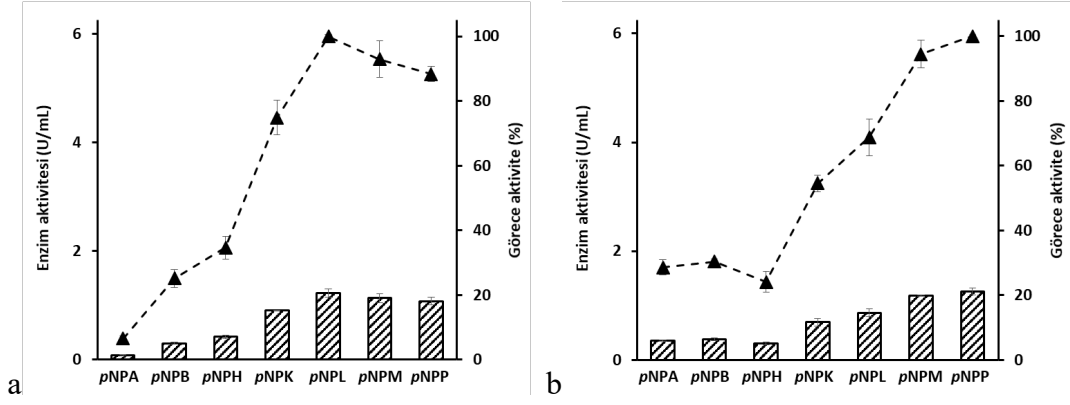
Şekil 4.22. BAY02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

SIL01 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin protein konsantrasyonları sırasıyla  $26.44 \pm 1.16$  mg/mL ve  $0.18 \pm 0.05$  mg/mL olarak belirlenmiştir. Hem hücre içi hem hücre dışı ham enzim çözeltisinin pNP-esterleri üzerindeki etkisi zincir uzunluğu ile doğru orantılı şekilde artmıştır (Şekil 4.23).



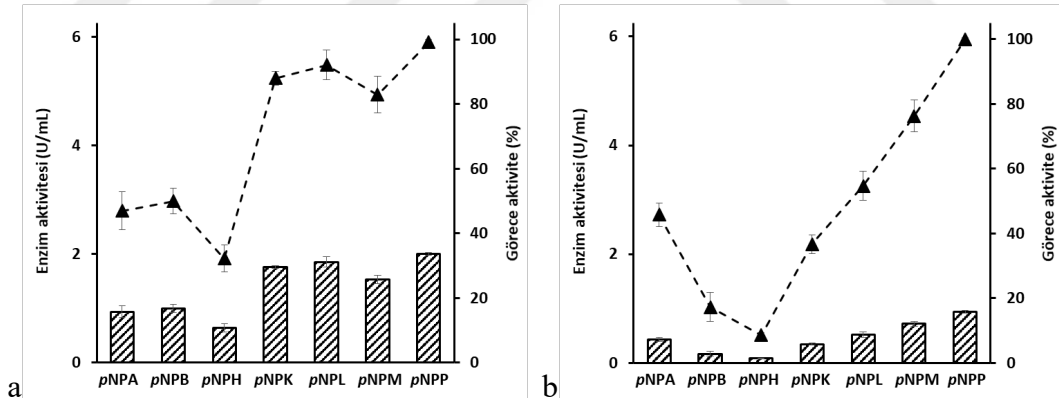
Şekil 4.23. SIL01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

AKL01 kodlu klonun hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin protein konsantrasyonu sırasıyla  $21.89 \pm 0.92$  mg/mL ve  $0.26 \pm 0.13$  mg/mL olarak hesaplanmıştır. Hücre içi ham enzim çözeltisi en yüksek aktiviteyi pNPL ( $1.22 \pm 0.13$  U/mL) karşısında gösterirken hücre dışı ham enzim çözeltisi ise pNPP ( $1.26 \pm 0.11$  U/mL) karşısında göstermiştir (Şekil 4.24).



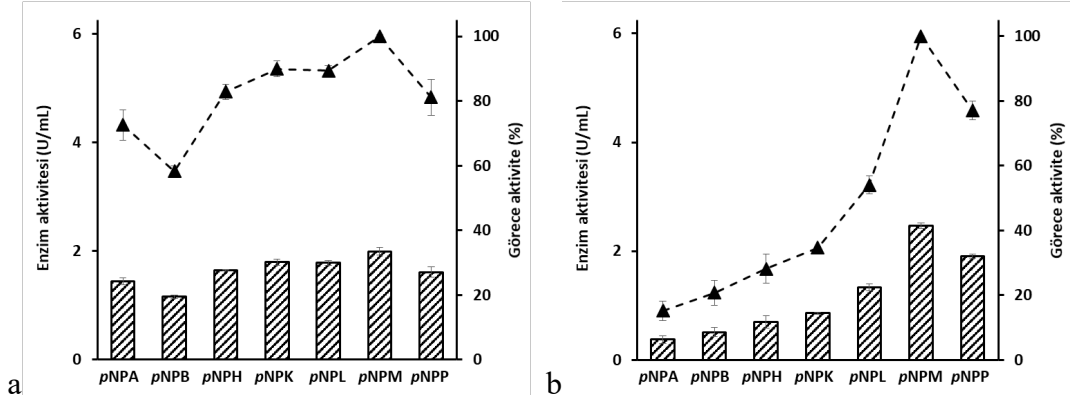
Şekil 4.24. AKL01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

AKL02 hücre içi ham enzim çözeltisinin protein yoğunluğu  $25.78 \pm 1.38$  mg/mL olarak tespit edilmiştir. Hücre içi ham enzim uzun karbon zincirli olan çözeltisi pNPP ( $2.00 \pm 0.06$  U/mL), pNPL ( $1.86 \pm 0.16$  U/mL), pNPK ( $1.76 \pm 0.05$  U/mL) ve pNPM ( $1.53 \pm 0.12$  U/mL) üzerinde görece yüksek katalitik aktivite sergilemiştir (Şekil 4.25a). Hücre dışı ham enzim çözeltisinin protein yoğunluğu  $0.16 \pm 0.01$  mg/mL olarak tespit edilmiştir ve pNPP ve pNPM karşısında sırasıyla  $0.94 \pm 0.04$  U/mL ve  $0.72 \pm 0.08$  U/mL'lik aktivite sergilemiştir (Şekil 4.25b).



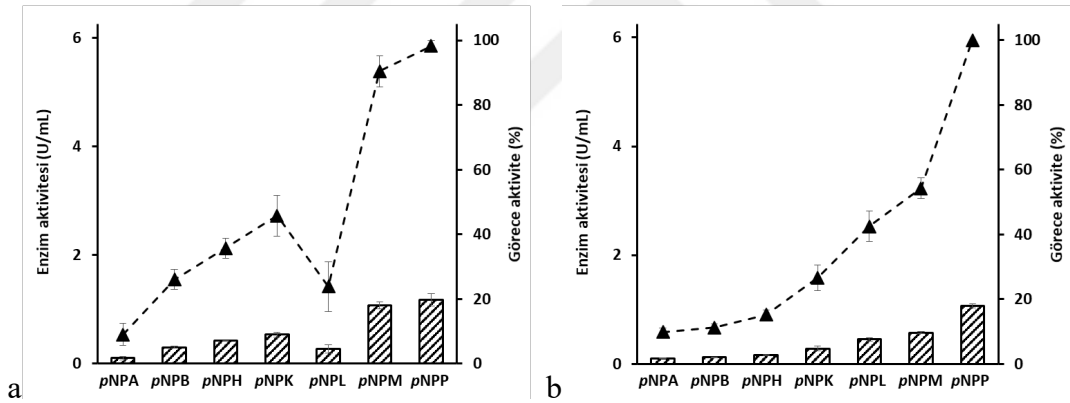
Şekil 4.25. AKL02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

ATA01 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin protein konsantrasyonları sırasıyla  $26.47 \pm 0.33$  mg/mL ve  $0.29 \pm 0.14$  mg/mL olarak tespit edilmiştir. Hücre içi enzim çözeltisi en yüksek hidrolitik etkiyi  $2.00 \pm 0.13$  U/mL'lik aktivite ile pNPM üzerine göstermiştir (Şekil 4.26a). Hücre dışı enzim çözeltisi de en yüksek aktiviteyi pNPM ( $2.47 \pm 0.09$  U/mL) karşısında sergilemiştir. En düşük hidrolitik aktivitenin ise pNPA ( $0.37 \pm 0.13$  U/mL) ile gözlenmiştir (Şekil 4.26b).



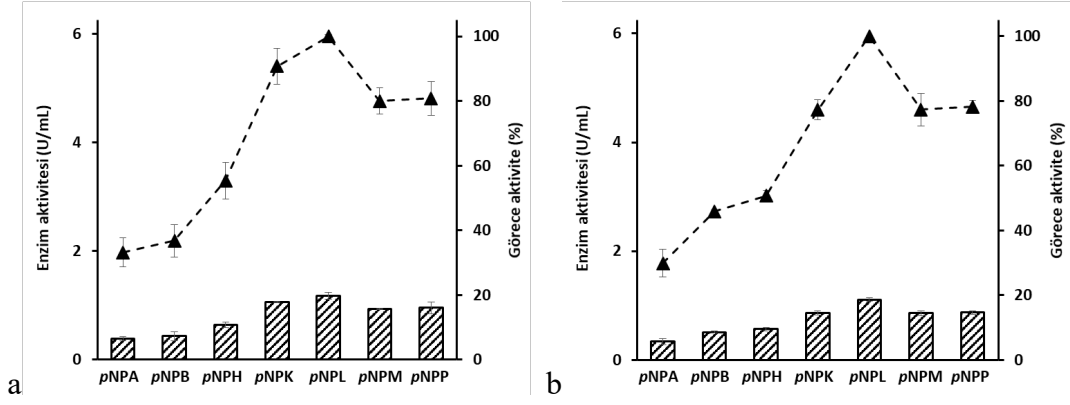
Şekil 4.26. ATA01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

BOL01 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin protein konsantrasyonları ölçüm ve analiz sonrası sırasıyla  $18.69 \pm 1.59$  mg/mL ve  $0.20 \pm 0.01$  mg/mL olarak belirlenmiştir. Hücre içi ham enzim çözeltisi için en yüksek ve en düşük enzim aktiviteleri substrat olarak sırasıyla pNPP ( $1.17 \pm 0.2$  U/mL) ve pNPA'nın ( $0.1 \pm 0.05$  U/mL) kullanıldığı koşullarda kaydedilmiştir (Şekil 3.27).



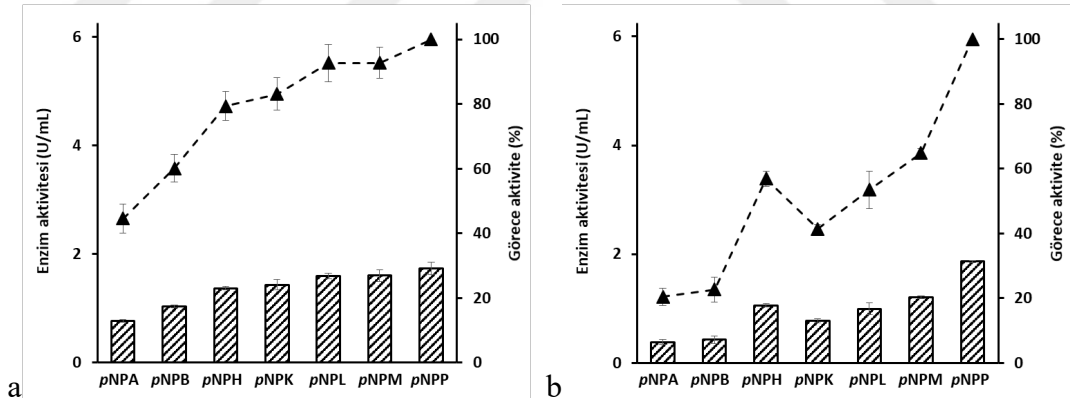
Şekil 4.27. BOL01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

BOL02 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin protein konsantrasyonları sırasıyla  $20.19 \pm 1.50$  mg/mL ve  $0.27 \pm 0.04$  mg/mL olarak tespit edilmiştir. Hem hücre içi hem de hücre dışı enzim çözeltisi pNP-esterleri karşısında benzer aktivite profili göstermişlerdir. Buna göre en yüksek enzim aktivitesi pNPL (hücre içi:  $0.95 \pm 0.20$  U/mL; hücre dışı:  $0.87 \pm 0.06$  U/mL) ile, en düşük enzim aktiviteyi ise pNPA (hücre içi:  $0.38 \pm 0.07$  U/mL; hücre dışı:  $0.33 \pm 0.09$  U/mL) substratı ile sergilemiştir (Şekil 4.28).



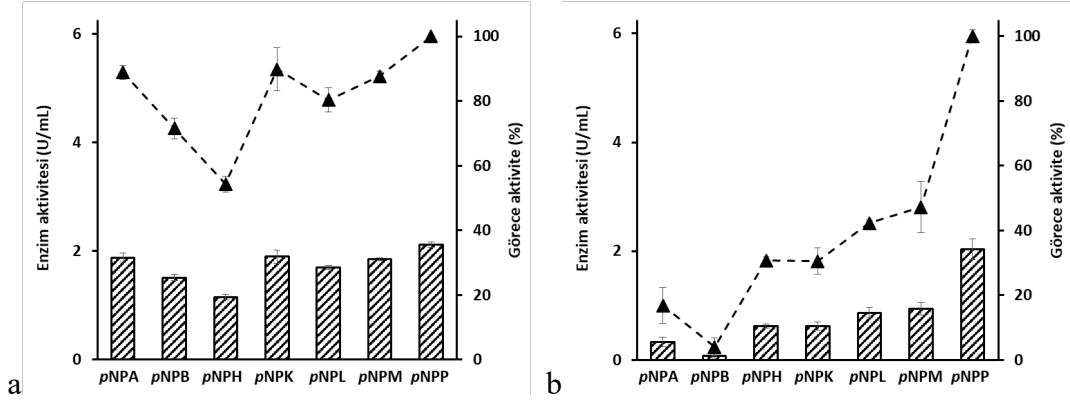
Şekil 4.28. BOL01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

KAS01 klonu hücre içi ham enzim çözeltisindeki protein yoğunluğunun  $25.93 \pm 0.99$  mg/mL, hücre dışı ham enzim çözeltisindeki protein yoğunluğunun ise  $0.15 \pm 0.01$  mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Hücre içi ham enzim çözeltisinin pNP-esterleri üzerindeki katalitik etkisinin zincir uzunluğu ile doğru orantılı şekilde artarak en yüksek  $1.73 \pm 0.19$  U/mL'ye ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.29a). KAS01, hücre dışı ham enzim en yüksek katalitik etkiyi  $1.86 \pm 0.03$  U/mL'lik aktivite ile pNPP karşısında sergilemiştir (Şekil 4.29b).



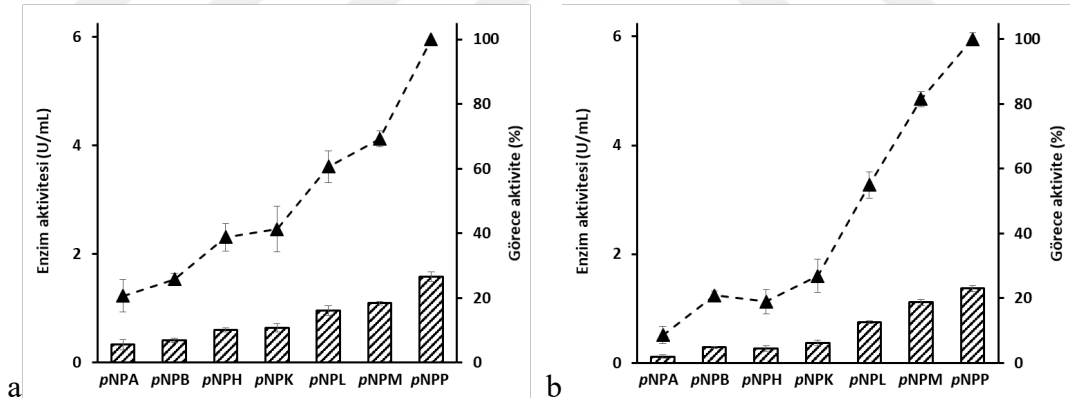
Şekil 4.29. KAS01 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

KAS02 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerindeki toplam protein miktarları sırasıyla  $27.47 \pm 0.3$  mg/mL ve  $0.32 \pm 0.1$  mg/mL olarak belirlenmiştir. Hücre içi ham enzim çözeltisi en yüksek aktiviteyi  $2.11 \pm 0.09$  U/mL ile pNPP ile sergilemiştir (Şekil 4.30a). Hücre dışı ham enzim çözeltisi için de en yüksek aktivite pNPP'nin ( $2.03 \pm 0.33$  U/mL) substrat olarak kullanıldığı koşullarda kaydedilmiştir (Şekil 4.30b).



Şekil 4.30. KAS02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

KAS03 klonu hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerindeki toplam protein miktarları sırasıyla  $22.65 \pm 0.29$  mg/mL ve  $0.34 \pm 0.09$  mg/mL olarak gözlenmiştir. Hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltilerinin Şekil 4.31’de gösterildiği üzere pNPP, pNPM ve pNPL gibi görece uzun zincirli pNP-esterleri üzerinde daha yüksek katalitik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Hücre içi ve hücre dışı ham enzim çözeltileri en yüksek aktiviteyi ise sırasıyla  $1.58 \pm 0.15$  U/mL ve  $1.37 \pm 0.11$  U/mL ile pNPP ile sergilemişlerdir.



Şekil 4.31. KAS02 klonunun hücre içi (a) ve hücre dışı (b) ham enzim çözeltilerinin farklı substratlar karşısında sergiledikleri enzim aktiviteleri (bar) ve görece aktiviteleri (üçgen işaretleyici)

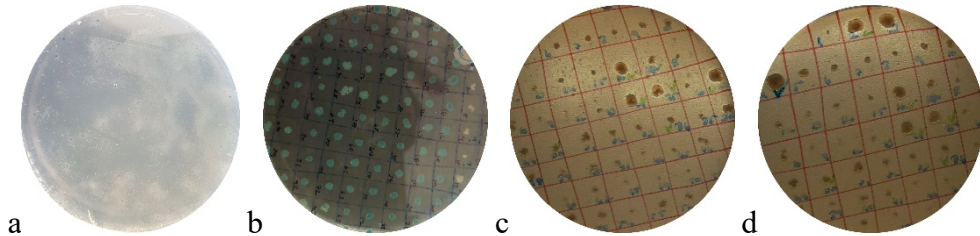
Literatürdeki pNP-esterleri ile yapılan substrat özgünlüğü çalışmaları incelendiğinde esteraz, lipaz, kütinaz enzimleri arasındaki en temel farklardan birinin “kütinazların çoğunlukla 4 karbon zincir uzunluğunda ya da biraz daha uzun pNP-esterlerini (C5-C6) tercih ederken esterazlar ise daha kısa zincirli karbon yapıları tercih ettiği görülmektedir (Nikolaivits vd., 2018; Bornscheuer 2002; Chen vd., 2013). Tan ve ark.’nın *Amycolatopsis mediterranei* kütinazının pNP-esterleri arasından en yüksek

hidrolitik etkiyi pNPB substratına karşı gösterdiğini belirlemişlerdir (Tan vd., 2021). *Fusarium solani* ve *Pseudomonas mendocina* kütinazlarının pNP-esterleri üzerindeki katalitik aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada enzimlerin en yüksek aktiviteyi pNPB'ye en düşük aktiviteyi ise pNPP'ye karşı sergiledikleri rapor edilmiştir (Kim vd., 2003). Yang ve ark.'nın gerçekleştirdiği çalışmada *Myceliophthora thermophila* kütinazının farklı uzunluklardaki pNP-esterleri katalizleyebildiklerini ancak en yüksek özgülüğü pNPB'ye karşı gösterdikleri belirlenmiştir (Yang vd., 2018). Duan ve ark *Thielavia terrestris* kütinazının test edilen pNP-esterleri arasından en yüksek aktiviteyi pNPB'ye karşı gösterdiğini rapor etmişlerdir (Duan vd., 2019). Dimarogona ve ark. (2015) *Fusarium oxysporum* kütinazının da pNPB üzerinde daha iyi hidrolitik aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, *Bacillus* sp. KY0701 (Adıgüzel ve Tunçer, 2017), *Thermobifida fusca* (Chen vd., 2010), *Malbranchea cinnamomea* 'den (Duan vd., 2017) elde edilen kütinazlar da en yüksek ilgiyi pNPB'ye karşı göstermişlerdir.

Elde edilen sonuçlar ve yukarıda sunulan literatür bilgisi göz önünde bulundurulduğunda KAD01 ve KAD03 olarak kodlanmış klonların kütinolitik etki gösteren enzim salgılayabileceği görülmüştür. KAD01 klonu pNPB karşısında KAD03'ten daha yüksek aktivite sergilediği için çalışma bu klon ile devam edilmiştir.

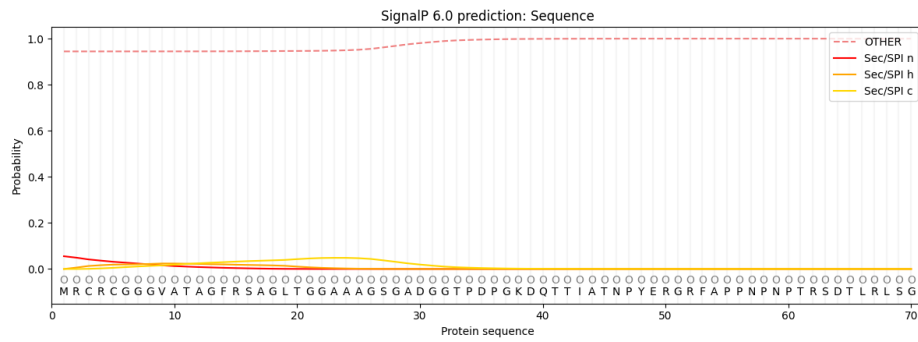
#### 4.6. Alt klonların oluşturulması ve açık okuma çerçevelerinin tespit edilmesi

KAD01'den izole edilen fosmid ve pUC19 plazmidi *Sma*I restriksiyon enzimi ile kesilmiş materyal yöntem bölümünde anlatıldığı gibi alt klonlar elde edilmiştir. Alt klonlar arasından insert içeren plazmidi barındıranlar Şekil 4.32b'de örneklendiği gibi mavi-beyaz seçilim ile belirlenmiştir. Ayrıca, alt klonlar arasından hem tribütirinli hem de PCL yi parçalayabilenler Şekil 4.32c-d'de örneklendiği gibi tespit edilmiştir.



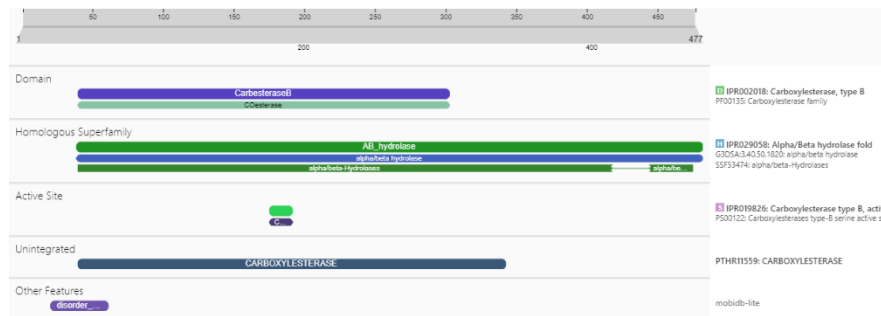
Şekil 4.32. Transformasyon sonrası mavi beyaz seçilim (a), nokta ekim ile kontrolü (b), seçilen alt-klonların tributirinli LB besiyerinde (c) ve PCL'li LB besiyerinde (d) taranmaları.

Enzim aktivitesinin gözlemlendiği alt klonlardan birinden plazmid izolasyonu yapılmış, hizmet alımı yapılarak plazmidin M13 bölgeleri arası DNA dizisi ve olası açık okuma çerçevesi belirlenmiş ve aminoasit dizisine dönüştürülmüştür. Sonuçta 1477 nükleotitlik DNA'nın 475 amino asitlik bir protein yapısı kodladığı ortaya çıkarılmıştır. Signal P analizi neticesinde proteinin herhangi bir sinyal dizisi kodlamadığı belirlenmiştir (Şekil 4.33). Expasy ProtParam aracı ile gerçekleştirilen analize göre proteinin teorik pI değeri, alifatik indeks ve GRAVY değerleri sırasıyla 5.15, 68.68 ve -0,189 olarak hesaplanmıştır. Expasy ProtParam ile belirlenen 35.15'lik kararsızlık indeksi, proteinin kararlı bir yapıda olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.33. Signal P analiz sonucu

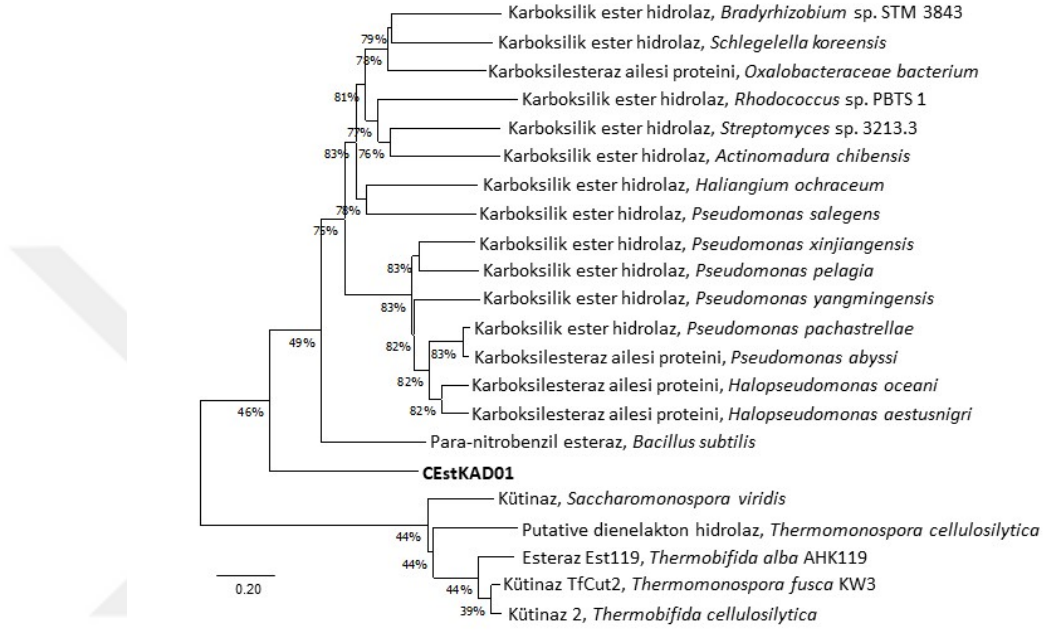
Pfam analizi neticesinde enzimin, plastikler ve diğer birçok sentetik esterlere etki eden hidrolitik birçok enzim gibi alfa/beta hidrolaz süper ailesi ve karboksilesteraz ailesi (EC 3.1.1.X) ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Bu özelliğinden dolayı açık okuma çerçevesine ait protein CEstKAD01 (CEst: karboksilesteraz) olarak kodlanmıştır.



Şekil 4.34. Pfam analizi sonucu

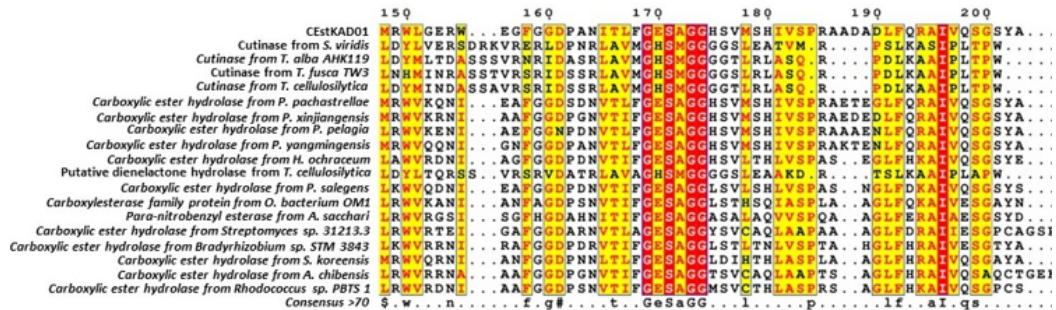
Blastp analizi, enzimin aminoasit dizisinin *Bacillus subtilis* (QHM13991.1) karboksilesterazı ile %55.94 oranında benzer olduğunu göstermiştir. Ayrıca, enzimin

*Halopseudomonas oceani* karboksilesterazı (WP\_104737618.1), *Halopseudomonas aestusnigri* karboksilik ester hidrolazı (WP\_160003159.1) ile %51.24 ve %46.19 amino asit dizi özdeşliğine sahip olduğu görülmüştür. Enzimin literatürdeki farklı plastikler üzerine etkili ve ayrıca blast analizi (Şekil 4.34) sonucunda amino asit dizi benzerliği belirlenen diğer enzimlerle olan filogenetik pozisyonu Şekil 4.35'te gösterilmektedir.



Şekil 4.35. CEStKAD01'in filogenetik ağaçtaki pozisyonu

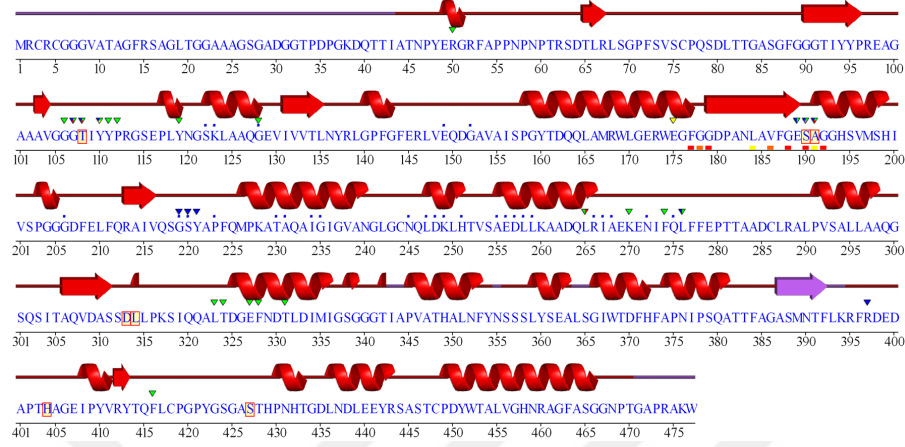
Dizi hizalamaları neticesinde enzimin daha önce tanımlanmış kütinaz ve karboksilesteraz enzimleri ile aynı şekilde katalitik üçlüdeki S amino asidinin yer aldığı GXSSXG korunmuş amino asit motifi içerdiği görülmüştür.



Şekil 4.36. Dizi hizalama, CEStKAD01'in GXSSXG korunmuş amino asit motifi

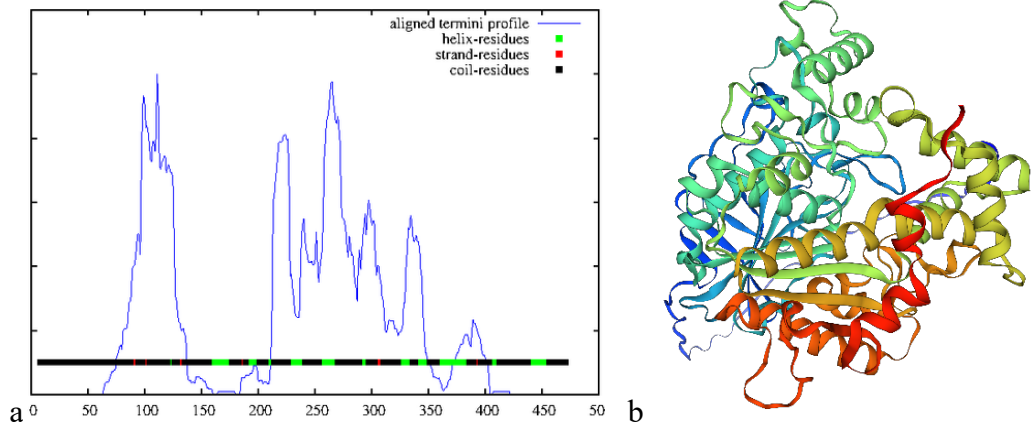
Şekil 4.36'da gösterildiği gibi, enzimin ikincil yapısı üzerinde SAS web aracı üzerinden yapılan analizler, enzimin beta yaprağından daha fazla alfa sarmalı

içerdiğini göstermiştir. İkincil yapı analizi Phyre2 web aracı ile desteklenmiştir. Ayrıca, Phyre2 analizine göre enzimin beta sarmalında ve alfa sarmalındaki amino asit kalıntılarının sırasıyla %10 ve %32 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.37. Phyre2, CEstKAD01'in GX SXG korunmuş amino asit motifi

Enzimin PSIPRED web aracı kullanılarak gerçekleştirilen analizinde sınırları 111. ve 265. amino asitlerde bulunan üç alan içerdiğini gözlemlenmiştir (Şekil 4.37). Enzimin üç-boyutlu yapısı SWISS-MODEL (Şekil 4.38b) kullanılarak Protein Veri Bankasından (PDB) alınan bir şablon (A0A2D5N0C7.1.A, *Pseudomonadales sp.*'den Karboksilik ester hidrolaz) ile oluşturulmuştur. Boşluklar dikkate alınmadan hesaplanan enzim-hedef dizi benzerliği ve özdeşlik değerleri sırasıyla %0,56 ve %82,40 olarak hesaplanmıştır. Oluşturulan model için Küresel Model Kalite Tahmini (GMQE) değeri 0.91 olarak bulunmuştur. Oluşturulan üç-boyutlu yapıdan enzimin bir monomer olduğu görülmüştür. İkincil yapı analiziyle uyumlu olarak, enzimin yapısının üç  $\alpha/\beta$  alanından oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, modelin çözücü ile erişilebilen yüzey alanı ve hacmi sırasıyla 2555,265 Å<sup>2</sup> ve 12670,570 Å<sup>3</sup> olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 4.38. (a) PSIPREP web aracı tarafından çizilmiş enzimin domainlerini gösteren grafik. (b) SWISS-MODEL ile çizilmiş enzimin üç-boyutlu yapısı

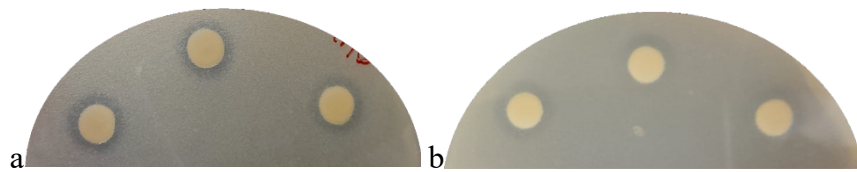
#### 4.7. Enzimi Kodlayan Genlerin Heterolog İfadesi

Materyal yöntem kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirilen klonlama işlemi sonrasında hedef geni içeren pET20b(+) plazmidini içeren klon koloni PCR ile belirlenmiştir (Şekil 4.39).



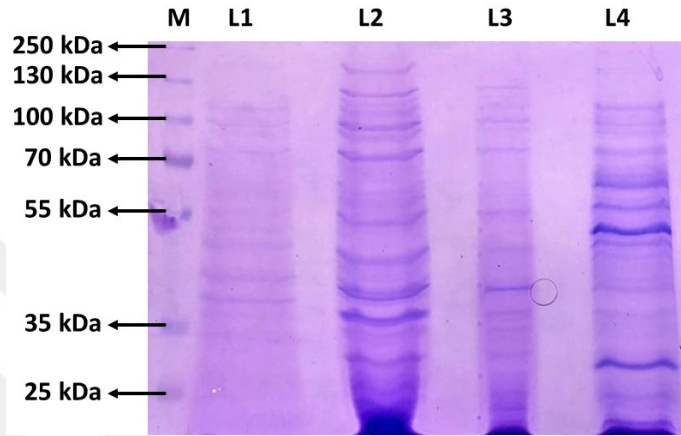
Şekil 4.39. Koloni PCR ile klonların taranması

Koloni PCR ile tarama sonrasında, seçilen klon ile rekombinant enzim üretimi TrLB ve PcLB katı besiyeri üzerinde gösterilmiştir. Hedef gensiz pET20b(+) barındıran *E. coli* BL21(DE3) kolonisi TRB ve PCL degradasyonuna ait bir zon görülmezken hedef geni içeren pET20b(+) barındıran klonunun kolonileri etrafında degradasyon zonu oluşumu görülmüştür (Şekil 4.40)



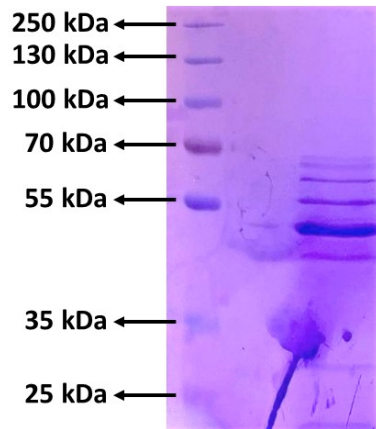
Şekil 4.40. Hedef geni içeren pET20b(+) barındıran klonun ekstraselüler enzim aktivitesinin (a) TrLB ve PcLB besiyerlerinde zon oluşumlarının gösterilmesi

Protein, IPTG ile indüklenmiş, hücre dışına salgılatılmış ve elde edilen süpernatant olarak adlandırılan hücre dışı besiyeri sıvısı ham enzim olarak kullanılmış ve p-nitrofenil bütirat (pNPB) karşısındaki aktivitesi, toplam protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Sonuçta; ham enzimin aktivitesi  $21.32 \text{ U/mL} \pm 1.01$ , toplam protein konsantrasyonu  $0.395 \pm 0.03 \text{ mg/mL}$  ve özgül aktivitesi  $53.53 \pm 1.39 \text{ (U/mg protein)}$  olarak tespit edilmiştir. Heterolog ifade sonrasında hedef geni içeren pET20b(+) barındıran *E. coli*'nin ekstraselüler protein profili Şekil 4.41'de gösterilmektedir.



Şekil 4.41. SDS-PAGE analizi. L1: IPTG yokluğunda pET20b(+) içeren *E. coli*, L2: IPTG (L2) yokluğunda hedef geni içeren pET20b(+) barındıran *E. coli*, L3: IPTG varlığında pET20b(+) içeren *E. coli*, hücre dışı protein profilini gösterir. L4: IPTG varlığında hedef geni içeren pET20b(+) barındıran *E. coli*, M: şahit proteinler (Protein marker)

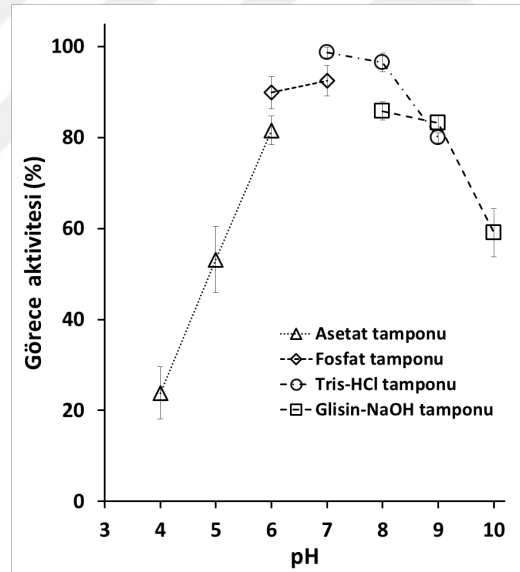
Enzim, biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları geçmeden önce %70'lik amonyum sülfat ile kısmen saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sonrasında Şekil 4.42'de de görüldüğü gibi enzim hem yoğunlaştırılmış hem de diğer proteinlerin bir kısmı enzim çözeltisinden uzaklaştırılmıştır.



Şekil 4.42. Kısmi saf enzimin SDS-PAGE analizi

#### 4.8. Enzimin optimum çalışma pH'sının belirlenmesi

Elde edilen yarı saflaştırılmış enzimin optimal aktivitede çalışabildiği şartları anlamak için biyokimyasal testlerden biri enzimin optimum pH değerini belirlemek için yapılmıştır. Farklı pH değerlerine sahip çeşitli solüsyonlar ile aktivitesine bakılmıştır ve Şekil 4.43'te gösterildiği gibi asetat 6-7 pH değerlerine sahip tampon solüsyonu ile en yüksek görece aktivite % 80 civarında olduğu bulunmuştur. Görece aktivite hesaplanırken en yüksek aktivitenin alındığı değer %100 olarak kabul edilmiştir. Asetat tamponun daha asidik değerlerinde görece aktivite %20' lere kadar düşmektedir. Fosfat pH 6 ve 7 tamponu ise %90 civarlarında görece aktivite vermektedir. Bunun yanında Glisin tamponu pH 8 ve 9 civarında %85 civarında görece aktivite verirken Tris-HCl tamponu pH 8 değerinde %95 oranına yakın görece aktivite verir. Bu değer bakımından Glisin-NaOH tamponuna göre aktivite Tris tamponda bu pH için daha optimuma yakındır. Tris-HCl tamponunda pH 9 ve 10 değerlerinde yine görece aktivite % 60 oranlarına kadar düşebilmektedir.

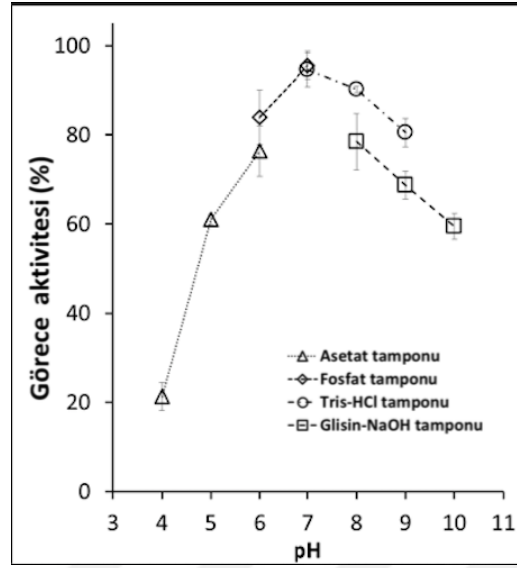


Şekil 4.43. CEStKAD01 enziminin farklı pH aralıklarına sahip tamponlar ile optimum pH ortamının belirlenmesi.

#### 4.9. Enzimin farklı pH'lardaki kararlılığının belirlenmesi

Enzimin farklı pH değerlerine sahip tamponlar ile kararlılığının belirlenmesinde enzimin başlangıçtaki aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. Şekil 4.44'te verildiği gibi asetat, fosfat, Tris-HCl ve Glisin-NaOH bufferları kullanılmıştır ve kararlılık en iyi Tris-HCl ve fosfat tamponda vermiştir. Bu tampon çözeltilerde ise en iyi pH değeri 7 olmuştur ve bu değerde %95 düzeylerinde gözlenmiştir. Asetat ve glisin içerikli

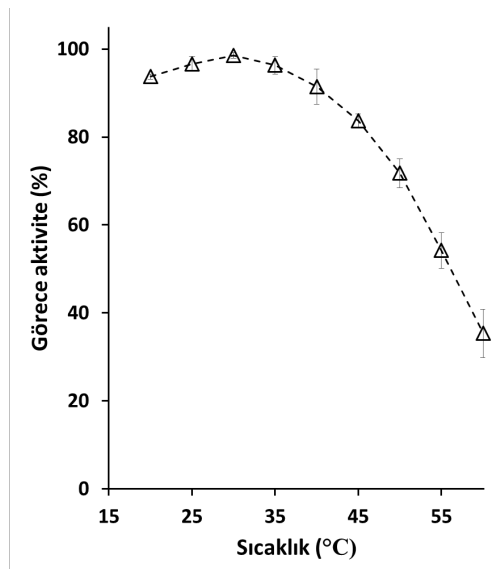
tamponlarda ise fosfat için pH 6’ da glisin için pH 8’ de %80’ e yakın en yüksek görece aktivitesini gösterebilmiştir.



Şekil 4.44. CEstKAD01 enziminin farklı pH aralıklarına sahip tamponlar ile optimum pH ortamında kararlılığın belirlenmesi.

#### 4.10. Enzimin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi

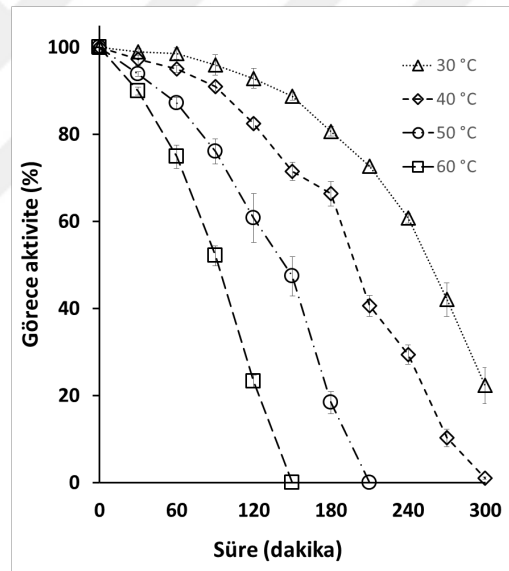
CEstKAD01 enziminin ideal çalışma sıcaklığını belirlemek için farklı sıcaklıklarda görece aktivitesi belirlenmiştir. Tespit edilen en yüksek aktivite %100 olarak kabul edilmiş ve bu sıcaklık enzimin optimum çalışma sıcaklığı olarak alınmıştır (Şekil 4.45). Buna göre enzim en yüksek görece aktivitesini 30 derece civarlarında sergilemiştir. Yaklaşık 15° C’ den 35° C’ye kadar gözlemlenen görece aktivite %90-95’in altında değildir. 55° C civarlarına gelindiğinde ise enzimin aktivitesi azalan trendin Şekil 4.45’ de en düşük değerini içerir ve görece aktivite %40’ın altındadır.



Şekil 4.45 CEstKAD01 enziminin farklı sıcaklıklarda aktivite değişiminin belirlenmesi.

#### 4.11. Enzimin farklı sıcaklıklardaki kararlılığının belirlenmesi

Enzimin farklı sıcaklıklarda kararlılığın belirlenmesinde diğer bir biyokimyasal özellik belirleme adımı olmuştur. Bu adımda enzimin inkübe edilmeden önceki aktivitesi %100 kabul edilerek kalan aktivitesi % görece aktivite olarak sunulmuştur. Enzim 60°C’da 0 dakikasından itibaren azalan bir trend izlemektedir ve yaklaşık iki buçuk saat içinde tüm görece aktivitesini kaybetmektedir (Şekil 4.46). Aynı şekilde 40°C ve 50°C sıcaklıklarında da başlangıçtan itibaren görece aktivite azalan bir trend izlemektedir ve sırası ile 300 dakika ve yaklaşık 200 dakika olmak üzere bu iki sıcaklık değerinde azalan trend sıfır görece aktivite değerine ulaşmaktadır. 30°C ise ilk iki saat içerisinde neredeyse % 100 görece aktivite trendinde sabitken ikinci saatin sonrasında azalan trend görülmeye başlamıştır ve 300 dakika içinde enzimin yalnızca %20’ lik bir görece aktivitesinin kaldığı gözlenmiştir.

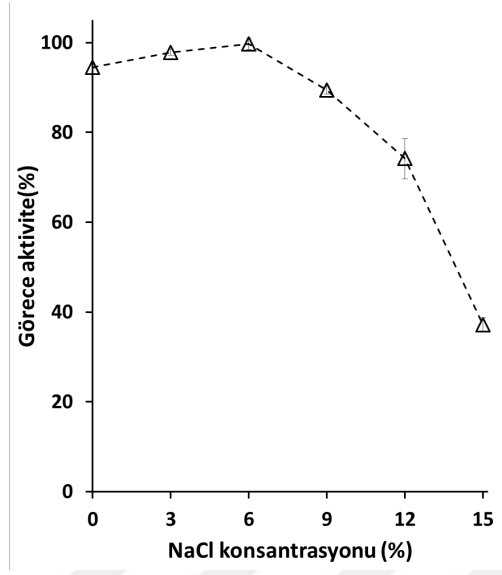


Şekil 4.46 CEstKAD01 enziminin farklı sıcaklıklarda kararlılığının belirlenmesi.

#### 4.12. Enzimin NaCl varlığındaki aktivitesinin belirlenmesi

CEstKAD01 enziminin çeşitli tuz konsantrasyonlarında (% cinsinden) gösterdiği görece aktivite hesaplanırken tespit edilen en yüksek aktivite %100 olarak kabul edilmiştir. En yüksek aktivitesini %6’ lık tuz değeri içeren çözeltide vermiştir ve yine %0-%6 arası olan değerlerde görece aktivite %90 değerinin altına düşmemiştir (Şekil 4.47). Bu bilgi denizel ortamlardan elde edilen çevresel DNA örneklerinin taranması ile elde edilen hedef enzimimiz için önemli bir biyokimyasal özelliktir. Yine tuz konsantrasyonunun tamponda %6’ dan fazla olduğu durumlarda aktivite azalma

trendine girmiştir ve en yüksek %15 oranın da tuz konsantrasyonu kullanılmış ve bu değerde görece aktivite %40'ın altındadır.



Şekil 4.47 CEstKAD01 enziminin % cinsinden farklı tuz konsantrasyonlarında aktivite değişiminin belirlenmesi.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genel olarak kısa bir özet ile tez çalışmasının konusu olan proje kapsamında Türkiye'nin on iki farklı bölgesinin deniz kıyısından alınan plastik örneklemeleri ile on iki farklı kütüphane oluşturulup binlerce klon taranmıştır. Bu sayede ülke kıyılarında mevcut bakteriyel esteraz, kütinaz geni taraması yapılabilmektedir. Yaklaşık 400 tributirin veya polikaprolakton veya her ikisinin yıkımını sağlayabilen klon belirlenmiştir. Bu klonlar üzerinden mavi-beyaz seçim yardımı ile taranan birçok alt klon sonucunda hedef substratı parçalayabilen iki gen üzerine yoğunlaştıktan sonra bu genlerin dizilenmesi, klonlanması, amino asit dizisinin belirlenmesi ve protein sentezinin uyarılması ve birtakım biyokimyasal değerlerin belirlenmesi tez süreci içerisinde tamamlanabilmektedir. Daha ayrıntılı bir şekilde elde edilen bulguları için araştırma konusunun ilk aşamasından yola çıkarsak elde edilen çevresel DNA örneklerinin DNA yoğunluğu en yüksek olarak Kadınlar plajı bölgesinden elde edilen mikropplastiklerden elde edilmiştir yine tezde elde edilen tributirin ve polikaprolakton parçalama aktivitesi gösteren enzim de yine bu bölge örnekleri ile hazırlanan metagenomik kütüphaneden taranmıştır. Çevresel DNA yoğunluğu kullanılan örneğe göre farklılık gösterse de genel olarak iyi bir verimlilikte gerçekleştirilebilmiştir bu sonuç kullanılan yöntemin de verimliliğini göstermektedir.

Bulgular kısmında bahsedildiği gibi metagenomik kütüphane inşası sonrası bu örneklerden 60000 klonun hedef enzim açısından taraması gerçekleştirilmiş ve bu tarama deneyleri literatürde daha önce benzer konularda yapılan çalışmalar göz önüne alınarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçların aynı şekilde literatürde yapılan benzer çalışmaların sonuçlarıyla da tutarlılık göstermesi beklenmiştir.

Fonksiyonel taramalar sonrası tanımlanan ve potansiyel kütinaz enzim üreticisi olan klonlar alt klon taraması yapılmadan önce hücre dışı ve içi enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve kütinaz enzimi habercisi olacak olan çeşitli substratlar ile aktivite olup olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre Antalya-Kadınlar plajı bölgesinden alınan örneklerden gelen klon kütinolitik aktivite işaretçisi olan pNPB substratı ile KAD01 örneğinde en yüksek hücre dışı ham enzim ( $0,26 \pm 0,09$  mg/ml) aktivitesinin  $5,82 \pm 0,11$  U/mL olduğu görülmüştür. Yine bu bölge örneği olan KAD03 de diğer bir yüksek pNPB aktivitesi ( $5,41 \pm 0,13$  U/mL) gösteren klon olmuş ve bu nedenle çalışmanın devamında bu iki örnek ile devam edilmiştir. Bunun yanında diğer

hücre dışı ve hücre için protein üretimi yapılan ve aynı substratlara karşı denen klonlar için pNPB aktivitesi 2 U/mL' i geçmemiştir. Substratlara karşı en hem hücre içi hem de hücre dışı elde edilen protein miktarı en yüksek aktivite gösteren KAD01 ile yakın olmasına rağmen bu örneğin (KAD02) en düşük aktiviteyi ( $< 1$  U/mL), Antalya-Kadınlar plajından gelen örneklerden hazırlanan kütüphane klonu, verdiği tespit edilmiştir.

Hücre dışı ve içi ham enzimin çeşitli karbon uzunluğundaki substrata etkisi ve biyoinformatik analizlerin yanında yapı ile ilgili daha kesin bilgi edinebilmek için 'circular dichroism, CD' ile alfa helix-katlanma ve beta- katlanma yapıları ile ilgili ileri bilgiler elde edilebilir. Enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde ideal pH aralığı, tampon çözeltisi, çalışma sıcaklığı ve tuz varlığındaki aktivitesine bakılmıştır. Bu çalışmalar sonucu CEstKAD01 enziminin en iyi aktiviteyi gösterebildiği pH değeri 7-7,5 civarındır, en iyi aktivitesini yine en iyi 25-35° C arasında gösterebilmektedir. Enzim en iyi 30°C de 2 saatten fazla karalılık göstermektedir. Tuz oranı olarak en iyi aktiviteyi yine %6 - %10 tuz bulunduran ortamlarda verebilmektedir. Örneklerin elde edildiği bölge koşulları düşünüldüğünde bu enzim sıcaklık ve pH olarak elde edildiği bölge koşullarında en iyi aktivitenin gözlemlendiği değerlere yakındır. Tuzlu ortamda mevcut en iyi aktivite için ise denizel ortamlar için Türkiye'de Marmara, Ege ve Akdeniz %28-%36 arasında olabilmektedir Karadeniz için ise bu oran %18 civarlarında olabilmektedir. Aynı şekilde literatürde yapılan benzer çalışmalarda (Ding vd., 2022) ise tanımlanan yeni bir esteraz enziminin 1M tuzluluk içeren ortamda aktivitesinin %91'i 2M tuzluluk oranında ise enzimin %86 kadar aktivitesini gösterebildiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızın hedeflerinden bir tanesinin biyoremediasyon olduğunu göz önüne aldığımızda ve ülkemiz ve Dünya okyanus ve denizel ortamlarının da tuzluluk oranını düşünürsek çalışmamızda tanımlanan enzim esteraz ve alifatik plastik yapıları içeren plastik yapılarının yüzey bozunmasının sağlanması ve benzer çalışmalar için çevresel alanlarda kullanımının deneyimlenmesi yapılabilir. Aynı zamanda enzimin en iyi aktiviteye sahip olduğu durumlarda ortam pH değeri 7 ve sıcaklık 30°C olarak bulunmuştur bu durumda bu hedef enzimin endüstriyel anlamda yüksek sıcaklık ve yüksek pH değerlerine çok yakın bir özellik göstermemesi nedeni ile bu alanda kullanımının çok uygun olmayacağı yorumu yapılabilir.

Çalışmada tanımlanan enzimin fosmid klon içerisinde ham enzim üretimi sonrası farklı karbon uzunluğuna sahip substratlarına karşı aktivite ölçümünün yapıldığı deneyler sonrası pNPB'a karşı en yüksek hücre dışı aktiviteyi gösteren bu klon için diğer substratlara karşıda diğer klonlardan farklı yüksek bir aktivite görülmüştür. Bahsedilen fosmid klondan ifadesi edilen kütinolitikesteraz enzimimizin ise biyoinformatik çalışmalar sonrası elde edilen yapısında ise enzim aktif bölgesi olarak düşünülen alanın oldukça esnek bir yapıya sahip olduğu hatta ucu serbest olan bir kuyruk uzantı gözlemlenmiştir. Buradan hareketle bu enzimin yapısının tanımlanabilmesi üzerine çalışmalar yapılması substrat özgüllüğünü görebilmek açısından önemli olabilir ve serbest uç kısmının enzim aktivitesine katkısının olup olmadığı bölgesel veya yönlendirilmiş nokta mutasyonu gibi yöntemler ile ilk olarak bakılabilir. Ek olarak biyoinformatik olarak elde ettiğimiz enzim yapısal ve substrat spesifik bölgesinin özelliklerine göre endüstriyel alanda kullanımını geliştirmek amaçlı protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılabilir. Böylece eğer enzimin substrat aralığı geniş ise ve farklı substratlar üzerine iyi denilebilecek aktivite gösterebiliyorsa pH ve çalışma sıcaklığı gibi değerlerin geliştirilmesi hedeflenebilir.

## KAYNAKLAR

- Abagyan, R., Frishman, D., & Argos, P. (1994). Recognition of distantly related proteins through energy calculations. *Proteins*, 19(2), 132-140. <https://doi.org/10.1002/prot.340190206>
- Adıgüzel, A. O. (2020). Production and characterization of thermo-, halo-and solvent-stable esterase from *Bacillus mojavensis* TH309. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(3), 210-226.
- Adıgüzel, A. O., & Tunçer, M. (2017). Purification and characterization of cutinase from *Bacillus* sp. KY0701 isolated from plastic wastes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(9), 925-933.
- Akçaözoğlu, S., Adıgüzel, A. O., Akçaözoğlu, K., Deveci, E. Ü., & Gönen, Ç. (2021). Investigation of the bacterial modified waste PET aggregate VIA *Bacillus safensis* to enhance the strength properties of mortars. *Construction and Building Materials*, 270, 121828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121828>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Armen, R. S., DeMarco, M. L., Alonso, D. O., & Daggett, V. (2004). Pauling and Corey's alpha-pleated sheet structure may define the prefibrillar amyloidogenic intermediate in amyloid disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(32), 11622-11627. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401781101>
- Armstrong, E. F. (1933). Enzymes: A Discovery and its Consequences. *Nature*, 131(3311), 535-537. <https://doi.org/10.1038/131535a0>
- Arnling Bååth, J., Novy, V., Carneiro, L. V., Guebitz, G. M., Olsson, L., Westh, P., & Ribitsch, D. (2022). Structure-function analysis of two closely related cutinases from *Thermobifida cellulositica*. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(2), 470-481.
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., & El Omari, K. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19), E4350-E4357.
- Azzolina, O., & Collina, S. (1995). Chiral Recognition of Alkyl 2-Aryloxypropionates by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 18(1), 81-92.
- Baker, P. J., Poultney, C., Liu, Z., Gross, R., & Montclare, J. K. (2012). Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 229-240.
- Benbelgacem, F. F., Salleh, H. M., & Noorbatcha, I. A. (2018). Construction of Metagenomic DNA Libraries and Enrichment Strategies. In A. Amid, S. Sulaiman, D. N. Jimat, & N. F. M. Azmin (Eds.), *Multifaceted Protocol in Biotechnology* (pp. 23-42). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2257-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2257-0_3)
- Benner, S. A., Chamberlin, S. G., Liberles, D. A., Govindarajan, S., & Knecht, L. (2000). Functional inferences from reconstructed evolutionary biology involving rectified databases--an evolutionarily grounded approach to functional genomics. *Res Microbiol*, 151(2), 97-106. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)00123-6](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)00123-6)
- Bermúdez-García, E., Peña-Montes, C., Martins, I., Pais, J., Pereira, C. S., Sánchez, S., & Farrés, A. (2019). Regulation of the cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 3863-3874.

- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., & Sarma, V. R. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature*, 206(4986), 757-761. <https://doi.org/10.1038/206757a0>
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Betlach, M. C., & Boyer, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. I. *Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9*. *Gene*, 2(2), 75-93. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(77\)90074-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(77)90074-9)
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 73-81. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environ Sci Technol*, 45(21), 9175-9179. <https://doi.org/10.1021/es201811s>
- Buchner, E. (1907). Cell-free fermentation. *Nobel Lecture*, 103-120.
- Cai, C. Z., Han, L. Y., Ji, Z. L., & Chen, Y. Z. (2004). Enzyme family classification by support vector machines. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(1), 66-76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prot.20045>
- Carvalho, C. M. L., Aires-Barros, M. R., & Cabral, J. M. S. (2001). A continuous membrane bioreactor for ester synthesis in organic media: I. Operational characterization and stability. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(2), 127-135. doi:10.1002/1097-0290(20010120)72:2
- Cawthorn, D.-M., Steinman, H., & Witthuhn, C. (2011). Comparative study of different methods for the extraction of DNA from fish species commercially available in South Africa. *Food Control*, 22, 231-244. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.003>
- Chen, S., Su, L., Billig, S., Zimmermann, W., Chen, J., & Wu, J. (2010). Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(3-4), 121-127.
- Chen, S., Tong, X., Woodard, R. W., Du, G., Wu, J., & Chen, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *J Biol Chem*, 283(38), 25854-25862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800848200>
- Chuzel, L., Fossa, S. L., Boisvert, M. L., Cajic, S., Hennig, R., Ganatra, M. B., Reichl, U., Rapp, E., & Taron, C. H. (2021). Combining functional metagenomics and glycoanalytics to identify enzymes that facilitate structural characterization of sulfated N-glycans. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 162.
- Clinton, B., Warden, A. C., Haboury, S., Easton, C. J., Kotsonis, S., Taylor, M. C., Oakeshott, J. G., Russell, R. J., & Scott, C. (2011). Bacterial degradation of strobilurin fungicides: a role for a promiscuous methyl esterase activity of the subtilisin proteases? *Biocatalysis and Biotransformation*, 29(4), 119-129.
- Couto, G., Glogauer, A., Faoro, H., Chubatsu, L., Souza, E., & Pedrosa, F. (2010). Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. *Genet Mol Res*, 9(1), 514-523.
- Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N., & Thornton, J. M. (2015). The classification and evolution of enzyme function. *Biophysical journal*, 109(6), 1082-1086.
- De Tender, C. A., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., & Dawyndt, P. (2015). Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environmental science & technology*, 49(16), 9629-9638.

- Debeljak, P., Pinto, M., Proietti, M., Reisser, J., Ferrari, F. F., Abbas, B., van Loosdrecht, M. C. M., Slat, B., & Herndl, G. J. (2017). Extracting DNA from ocean microplastics: a method comparison study [10.1039/C6AY03119F]. *Analytical Methods*, 9(9), 1521-1526. <https://doi.org/10.1039/C6AY03119F>
- Devi, S. G., Fathima, A. A., Radha, S., Arunraj, R., Curtis, W. R., & Ramya, M. (2015). A Rapid and Economical Method for Efficient DNA Extraction from Diverse Soils Suitable for Metagenomic Applications. *PLoS One*, 10(7), e0132441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132441>
- Dimarogona, M., Nikolaivits, E., Kanelli, M., Christakopoulos, P., Sandgren, M., & Topakas, E. (2015). Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(11), 2308-2317.
- Ding, Y., Nie, L., Yang, X.-C., Li, Y., Huo, Y.-Y., Li, Z., Gao, Y., Cui, H.-L., Li, J., & Xu, X.-W. (2022). Mechanism and Structural Insights Into a Novel Esterase, E53, Isolated From *Erythrobacter longus*. *Front. Microbiol.* 12:798194. doi: 10.3389/fmicb.2021.798194.
- dos Santos Goncalves, A. C., Rezende, R. P., Marques, E. d. L. S., Soares, M. R., Dias, J. C. T., Romano, C. C., Costa, M. S., Dotivo, N. C., de Moura, S. R., & de Oliveira, I. S. (2020). Biotechnological potential of mangrove sediments: identification and functional attributes of thermostable and salinity-tolerant  $\beta$ -glucanase. *International journal of biological macromolecules*, 147, 521-526.
- Drent, M., Cobben, N. A., Henderson, R. F., Wouters, E. F., & van Diejen-Visser, M. (1996). Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J*, 9(8), 1736-1742. <https://doi.org/10.1183/09031936.96.09081736>
- Duan, X., Jiang, Z., Liu, Y., Yan, Q., Xiang, M., & Yang, S. (2019). High-level expression of codon-optimized *Thielavia terrestris* cutinase suitable for ester biosynthesis and biodegradation. *International journal of biological macromolecules*, 135, 768-775.
- Duan, X., Liu, Y., You, X., Jiang, Z., Yang, S., & Yang, S. (2017). High-level expression and characterization of a novel cutinase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for butyl butyrate production. *Biotechnology for biofuels*, 10, 1-14.
- Dussud, C., Hudec, C., George, M., Fabre, P., Higgs, P., Bruzard, S., Delort, A.-M., Eyheraguibel, B., Meistertzheim, A.-L., & Jacquin, J. (2018). Colonization of non-biodegradable and biodegradable plastics by marine microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 9, 1571.
- Dutta, K., Sen, S., & Veeranki, V. D. (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*, 44(2), 127-134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.008>
- Enright, A. J., & Ouzounis, C. A. (2000). GeneRAGE: a robust algorithm for sequence clustering and domain detection. *Bioinformatics*, 16(5), 451-457. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.5.451>
- Enright, A. J., Van Dongen, S., & Ouzounis, C. A. (2002). An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Res*, 30(7), 1575-1584. <https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1575>
- Erni-Cassola, G., Wright, R. J., Gibson, M. I., & Christie-Oleza, J. A. (2020). Early Colonization of Weathered Polyethylene by Distinct Bacteria in Marine Coastal Seawater. *Microb Ecol*, 79(3), 517-526. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01424-5>

- Escuder-Rodríguez, J.-J., DeCastro, M.-E., Cerdán, M.-E., Rodríguez-Belmonte, E., Becerra, M., & González-Siso, M.-I. (2018). Cellulases from thermophiles found by metagenomics. *Microorganisms*, 6(3), 66.
- Falconnier, B., Lapierre, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., Corrieu, G., & Asther, M. (1994). Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways. *Journal of Biotechnology*, 37(2), 123-132.
- Fett, W. F., Wijey, C., Moreau, R. A., & Osman, S. F. (2000). Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 31(1), 25-29. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00752.x>
- Fortuna, S., Cesugli, M., Todea, A., Pellis, A., & Gardossi, L. (2021). Criteria for Engineering Cutinases: Bioinformatics Analysis of Catalophores. *Catalysts*, 11(7), 784.
- Frishman, D., & Argos, P. (1992). Recognition of distantly related protein sequences using conserved motifs and neural networks. *J Mol Biol*, 228(3), 951-962. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90877-m](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90877-m)
- Fruton, J. S. (2002). A history of pepsin and related enzymes. *Q Rev Biol*, 77(2), 127-147. <https://doi.org/10.1086/340729>
- Gupta, S., Arango-Argoty, G., Zhang, L., Pruden, A., & Vikesland, P. (2019). Identification of discriminatory antibiotic resistance genes among environmental resistomes using extremely randomized tree algorithm. *Microbiome*, 7, 1-15.
- Heckmann, C. M., & Paradisi, F. (2020). Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools. *ChemCatChem*, 12(24), 6082-6102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cctc.202001107>
- Heredia, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1620(1-3), 1-7.
- Hotelier, T., Nègre, V., Marchot, P., & Chatonnet, A. (2010). Insecticide resistance through mutations in cholinesterases or carboxylesterases: data mining in the ESTHER database. *Journal of pesticide science*, 35(3), 315-320.
- Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P., & Chatonnet, A. (2004). ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic acids research*, 32(suppl\_1), D145-D147.
- Jackson, D. A., Symons, R. H., & Berg, P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(10), 2904-2909. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.10.2904>
- Jaskolski, M., Dauter, Z., & Wlodawer, A. (2014). A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. *Febs j*, 281(18), 3985-4009. <https://doi.org/10.1111/febs.12796>
- Jayanath, G., Mohandas, S. P., Kachiprath, B., Solomon, S., Sajeevan, T., Singh, I. B., & Philip, R. (2018). A novel solvent tolerant esterase of GDSGG motif subfamily from solar saltern through metagenomic approach: Recombinant expression and characterization. *International journal of biological macromolecules*, 119, 393-401.
- JS, F. (1990). Chapter 5- Emil Fischer and Franz Hofmeister". Contrasts in Scientific Style: Research Groups in the Chemical and Biochemical Sciences. *American Philosophical Society*, Vol. 191, 163-165.
- Jones, R. M., Collier, L. S., Neidle, E. L., & Williams, P. A. (1999). areABC genes determine the catabolism of aryl esters in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Journal of bacteriology*, 181(15), 4568-4575.

- Kawai, F. (2021). The Current State of Research on PET Hydrolyzing Enzymes Available for Biorecycling. *Catalysts*, 11(2), 206. <https://www.mdpi.com/2073-4344/11/2/206>
- Kawai, F., Kawabata, T., & Oda, M. (2019). Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11), 4253-4268. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09717-y>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.
- Kendrew, J. C. (1963). Myoglobin and the structure of proteins. *Science*, 139(3561), 1259-1266. <https://doi.org/10.1126/science.139.3561.1259>
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., & Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, 181(4610), 662-666. <https://doi.org/10.1038/181662a0>
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Phillips, D. C., & Shore, V. C. (1960). Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, 185(4711), 422-427. <https://doi.org/10.1038/185422a0>
- Kim, M. Y., Kim, C., Moon, J., Heo, J., Jung, S. P., & Kim, J. R. (2017). Polymer Film-Based Screening and Isolation of Polylactic Acid (PLA)-Degrading Microorganisms. *J Microbiol Biotechnol*, 27(2), 342-349. <https://doi.org/10.4014/jmb.1610.10015>
- Kim, Y. H., Lee, J., & Moon, S. H. (2003). Uniqueness of microbial cutinases in hydrolysis of p-nitrophenyl esters. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(1), 57-63.
- Kitadokoro, K., Kakara, M., Matsui, S., Osokoshi, R., Thumarat, U., Kawai, F., & Kamitani, S. (2019). Structural insights into the unique polylactate-degrading mechanism of *Thermobifida alba* cutinase. *The FEBS Journal*, 286(11), 2087-2098.
- Kohler, R. (1971). The background to Eduard Buchner's discovery of cell-free fermentation. *J Hist Biol*, 4, 35-61. <https://doi.org/10.1007/bf00356976>
- Kohler, R. E., Jr. (1973). The enzyme theory and the origin of biochemistry. *Isis*, 64(222), 181-196. <https://doi.org/10.1086/351080>
- Koshland, D. E., Jr. (1959). Enzyme flexibility and enzyme action. *J Cell Comp Physiol*, 54, 245-258. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030540420>
- Koshland, D. E., Jr., Ray, W. J., Jr., & Erwin, M. J. (1958). Protein structure and enzyme action. *Fed Proc*, 17(4), 1145-1150.
- Krause, S., Molari, M., Gorb, E., Gorb, S., Kossel, E., & Haeckel, M. (2020). Persistence of plastic debris and its colonization by bacterial communities after two decades on the abyssal seafloor. *Scientific reports*, 10(1), 9484.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Lee, H. Y., Cho, D. Y., Ahmad, I., Patel, H. M., Kim, M. J., Jung, J. G., Jeong, E. H., Haque, M. A., & Cho, K. M. (2021). Mining of a novel esterase (est3S) gene from a cow rumen metagenomic library with organophosphorus insecticides degrading capability: Catalytic insights by site directed mutations, docking, and molecular dynamic simulations. *International journal of biological macromolecules*, 190, 441-455.
- Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J.-F., Ceccaldi, B. C., Brunerie, P., & Asther, M. (1996). A two-step bioconversion process for vanillin production from

- ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Biotechnology*, 50(2-3), 107-113.
- Liang, X., & Zou, H. (2022). Biotechnological Application of Cutinase: A Powerful Tool in Synthetic Biology. *SynBio*, 1(1), 54-64.
- Liang, X., & Zou, H. (2023). Biotechnological Application of Cutinase: A Powerful Tool in Synthetic Biology. *SynBio*, 1(1), 54-64. <https://www.mdpi.com/2674-0583/1/1/4>
- Lichtenthaler, F. W. (1995). 100 years “Schlüssel-Schloss-Prinzip”: what made Emil Fischer use this analogy? *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2364-2374.
- Ma, Y., Huang, J., Han, T., Yan, C., Cao, C., & Cao, M. (2021). Comprehensive metagenomic and enzyme activity analysis reveals the negatively influential and potentially toxic mechanism of polystyrene nanoparticles on nitrogen transformation in constructed wetlands. *Water Research*, 202, 117420.
- Manchester, K. L. (1995). Louis Pasteur (1822-1895)--chance and the prepared mind. *Trends Biotechnol*, 13(12), 511-515. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)89014-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)89014-9)
- Martínez, A., & Maicas, S. (2021). Cutinases: characteristics and insights in industrial production. *Catalysts*, 11(10), 1194.
- Martinez-Carrion, M., Kuczenski, R., Tiemeier, D. C., & Peterson, D. L. (1970). The Structure and Enzyme-Coenzyme Relationship of Supernatant Aspartate Transaminase after Dye Sensitized Photooxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 245(4), 799-805. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63335-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63335-6)
- Maruthamuthu, M., Jiménez, D. J., Stevens, P., & van Elsas, J. D. (2016). A multi-substrate approach for functional metagenomics-based screening for (hemi) cellulases in two wheat straw-degrading microbial consortia unveils novel thermoalkaliphilic enzymes. *BMC genomics*, 17, 1-16.
- Matthews, B. W., Sigler, P. B., Henderson, R., & Blow, D. M. (1967). Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin. *Nature*, 214(5089), 652-656. <https://doi.org/10.1038/214652a0>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2014). Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS Journal*, 281(2), 583-592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.12530>
- Michaelis, L., Menten, M. L., Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2011). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264-8269. <https://doi.org/10.1021/bi201284u>
- Miguel-Ruano, V., Rivera, I., Rajkovic, J., Knapik, K., Torrado, A., Otero, J. M., Beneventi, E., Becerra, M., Sánchez-Costa, M., & Hidalgo, A. (2021). Biochemical and Structural Characterization of a novel thermophilic esterase EstD11 provide catalytic insights for the HSL family. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 1214-1232.
- Moeis, M. R., & Maulana, M. F. (2021). Improving plastic degradation by increasing the thermostability of a whole cell biocatalyst with LC-cutinase activity. *Journal of Physics: Conference Series*, 1764(1), 012029. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1764/1/012029>
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M. B., & Levin, D. B. (2019). Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers. *Can J Microbiol*, 65(3), 224-234. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0335>
- Montella, I. R., Schama, R., & Valle, D. (2012). The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance-A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 437-449.

- Monzon, V., Paysan-Lafosse, T., Wood, V., & Bateman, A. (2022). Reciprocal best structure hits: using AlphaFold models to discover distant homologues. *Bioinformatics Advances*, 2(1), vbac072.
- Moore, C. J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ Res*, 108(2), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025>
- Müller, R. J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., & Deckwer, W. D. (2005). Enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular rapid communications*, 26(17), 1400-1405.
- Nagano, N., Porter, C. T., & Thornton, J. M. (2001). The (betaalpha)(8) glycosidases: sequence and structure analyses suggest distant evolutionary relationships. *Protein Eng*, 14(11), 845-855. <https://doi.org/10.1093/protein/14.11.845>
- Nardini, M., & Dijkstra, B. W. (1999).  $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*, 9(6), 732-737.
- Neufeld L, Stassen F, Sheppard R, & T, G. (2016). The new plastics economy: rethinking the future of plastics (*World Economic Forum*, 2016). [www3.weforum.org/docs/WEF\\_The\\_New\\_Plastics\\_Economy.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf)
- Nikolaivits, E., Kanelli, M., Dimarogona, M., & Topakas, E. (2018). A middle-aged enzyme still in its prime: Recent advances in the field of cutinases. *Catalysts*, 8(12), 612.
- Noby, N., Hussein, A., Saeed, H., & Embaby, A. M. (2020). "Recombinant cold-adapted halotolerant, organic solvent-stable esterase (estHIJ) from *Bacillus halodurans*. *Analytical biochemistry*, 591, 113554.
- Northrop, J. H. (1946). The preparations of pure enzymes and virus proteins. *Chic Med Sch Q*, 8(2), 4-12.
- Nyyssölä, A., Pihlajaniemi, V., Häkkinen, M., Kontkanen, H., Saloheimo, M., & Nakari-Setälä, T. (2014). Cloning and characterization of a novel acidic cutinase from *Sirococcus conigenus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 3639-3650.
- Oberbeckmann, S., Osborn, A. M., & Duhaime, M. B. (2016). Microbes on a bottle: substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. *PLoS One*, 11(8), e0159289.
- Ogonowski, M., Motiei, A., Ininbergs, K., Hell, E., Gerdes, Z., Udekwu, K. I., Bacsik, Z., & Gorokhova, E. (2018). Evidence for selective bacterial community structuring on microplastics. *Environmental microbiology*, 20(8), 2796-2808.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., & Schrag, J. (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197-211.
- Pabbathi, N. P. P., Velidandi, A., Tavarana, T., Gupta, S., Raj, R. S., Gandam, P. K., & Baadhe, R. R. (2021). Role of metagenomics in prospecting novel endoglucanases, accentuating functional metagenomics approach in second-generation biofuel production: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-28.
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2007). *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*. Elsevier.
- Park, H., & Cho, M. (2020). A multiscale framework for the elasto-plastic constitutive equations of crosslinked epoxy polymers considering the effects of temperature, strain rate, hydrostatic pressure, and crosslinking density. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 142, 103962.
- Paul, P. E. V., Sangeetha, V., & Deepika, R. G. (2019). Chapter 9 - Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. In V. Buddolla (Ed.),

- Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 107-125). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00009-X>
- Pauling, L. (1948). Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature*, *161*(4097), 707-709. <https://doi.org/10.1038/161707a0>
- Pauling, L., Corey, R. B., & Branson, H. R. (1951). The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *37*(4), 205-211. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.4.205>
- PE, K. (1981). Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Annu Rev Plant Physiol* (32), 539–567.
- Pelley, J. W. (2012). 4 - Enzymes and Energetics. In J. W. Pelley (Ed.), *Elsevier's Integrated Review Biochemistry (Second Edition)* (pp. 29-37). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07446-9.00004-0>
- Pérez-García, P., Danso, D., Zhang, H., Chow, J., & Streit, W. R. (2021). Exploring the global metagenome for plastic-degrading enzymes. In *Methods in enzymology* (Vol. 648, pp. 137-157). Elsevier.
- Perutz, M. F. (1951). New x-ray evidence on the configuration of polypeptide chains. *Nature*, *167*(4261), 1053-1054. <https://doi.org/10.1038/1671053a0>
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., & North, A. C. (1960). Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, *185*(4711), 416-422. <https://doi.org/10.1038/185416a0>
- Pio, T. F., & Macedo, G. A. (2009). Cutinases:: Properties and Industrial Applications. *Advances in applied microbiology*, *66*, 77-95.
- Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., & Borilova, G. (2019). The Quality of DNA Isolated from Processed Food and Feed via Different Extraction Procedures. *Molecules*, *24*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061188>
- Privé, F., Newbold, C. J., Kaderbhai, N. N., Girdwood, S. G., Golyshina, O. V., Golyshin, P. N., Scollan, N. D., & Huws, S. A. (2015). Isolation and characterization of novel lipases/esterases from a bovine rumen metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*, 5475-5485.
- Puglisi, E., Romaniello, F., Galletti, S., Boccaleri, E., Frache, A., & Cocconcelli, P. S. (2019). Selective bacterial colonization processes on polyethylene waste samples in an abandoned landfill site. *Sci Rep*, *9*(1), 14138. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50740-w>
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., & Clements, J. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, *40*(D1), D290-D301.
- Qiu, J., Zhang, Y., Shi, Y., Jiang, J., Wu, S., Li, L., Shao, Y., & Xin, Z. (2020). Identification and characterization of a novel phthalate-degrading hydrolase from a soil metagenomic library. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *190*, 110148.
- Quax, W., & Broekhuizen, C. (1994). Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *41*(4), 425-431.
- Reeke, G. N., Hartsuck, J. A., Ludwig, M. L., Quijcho, F. A., Steitz, T. A., & Lipscomb, W. N. (1967). The structure of carboxypeptidase a, vi. Some results at 2.0-Å resolution, and the complex with glycyl-tyrosine at 2.8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *58*(6), 2220-2226. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.6.2220>

- Roager, L., & Sonnenschein, E. C. (2019). Bacterial Candidates for Colonization and Degradation of Marine Plastic Debris. *Environ Sci Technol*, 53(20), 11636-11643. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02212>
- Sanger, F., & Tuppy, H. (1951). The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J*, 49(4), 481-490. <https://doi.org/10.1042/bj0490481>
- Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S., & Gokhale, D. V. (2019). Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol*, 127(6), 1612-1626. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>
- Sogorb, M. A., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology letters*, 128(1-3), 215-228.
- Sree, B. R., Sowjanya, B., & Divakar, K. (2019). Metagenomic bioprospecting of novel oxygen insensitive nitroreductase for degradation of nitro aromatic compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 143, 104737.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 189(1), 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185, 60-89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85008-c](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85008-c)
- Sulaiman, S., Yamato, S., Kanaya, E., Kim, J.-J., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. (2012). Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1556-1562.
- Sumner, J. B. ((1968)). The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Harvard University Press.*, 322-327.
- Sumner, J. B. (1946). “-Nobel Lecture: The Chemical Nature of Enzymes. *The Nobel Foundation*.
- Sun, Q., Ren, S.-Y., & Ni, H.-G. (2020). Incidence of microplastics in personal care products: An appreciable part of plastic pollution. *Science of the Total Environment*, 742, 140218.
- Tan, Y., Henehan, G. T., Kinsella, G. K., & Ryan, B. J. (2021). An extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* is a cutinase with plastic degrading activity. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 869-879.
- Testa, B., & Krämer, S. D. (2007). The biochemistry of drug metabolism—an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chemistry & biodiversity*, 4(3), 257-405.
- Todd, A. E., Orengo, C. A., & Thornton, J. M. (2001). Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J Mol Biol*, 307(4), 1113-1143. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4513>
- Tokiwa, Y., & Calabia, B. P. (2007). Biodegradability and biodegradation of polyesters. *Journal of Polymers and the Environment*, 15, 259-267.
- Vertommen, M., Nierstrasz, V., Van Der Veer, M., & Warmoeskerken, M. (2005). Enzymatic surface modification of poly (ethylene terephthalate). *Journal of Biotechnology*, 120(4), 376-386.
- Vieira, J., & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19(3), 259-268. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90015-4)

- Wang, J., Zhao, H., Zhao, G., Chen, D., Tao, Y., & Wu, S. (2019). Enhancing the atypical esterase promiscuity of the  $\gamma$ -lactamase Sspg from *Sulfolobus solfataricus* by substrate screening. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(10), 4077-4087. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09758-3>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., & Bordoli, L. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.
- Wright, S. L., Ulke, J., Font, A., Chan, K. L. A., & Kelly, F. J. (2020). Atmospheric microplastic deposition in an urban environment and an evaluation of transport. *Environment international*, 136, 105411.
- Wu, S., Nan, F., Jiang, J., Qiu, J., Zhang, Y., Qiao, B., Li, S., & Xin, Z. (2019). Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library with phthalate-degrading activity. *Biotechnology letters*, 41, 995-1006.
- Xin, L., & Hui-Ying, Y. (2013). Purification and characterization of an extracellular esterase with organic solvent tolerance from a halotolerant isolate, *Salimicrobium* sp. LY19. *BMC Biotechnol*, 13, 108. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-108>
- Xing, X.-W., Zhang, J.-T., Ma, Y.-B., He, M.-W., Yao, G.-E., Wang, W., Qi, X.-K., Chen, X.-Y., Wu, L., & Wang, X.-L. (2020). Metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of infectious encephalitis and meningitis: a large, prospective case series of 213 patients. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 88.
- Xu, Y., Gao, Y., Wu, C., Fang, J., Sun, G., Steven, G. P., & Li, Q. (2021). On design of carbon fiber reinforced plastic (CFRP) laminated structure with different failure criteria. *International Journal of Mechanical Sciences*, 196, 106251.
- Yan, H., Zhu, L., Wang, Y., Zhang, S., Liu, P., Dong, T. T., Wu, Q., & Duan, J.-A. (2021). Comparative metagenomics analysis of the rhizosphere microbiota influence on *Radix Angelica sinensis* in different growth soil environments in China. *Food Science and Technology*, 41, 775-784.
- Yan, Y., Zhu, F., Zhu, C., Chen, Z., Liu, S., Wang, C., & Gu, C. (2021). Dibutyl phthalate release from polyvinyl chloride microplastics: Influence of plastic properties and environmental factors. *Water Research*, 204, 117597.
- Yan, Z., Ding, L., Zou, D., Wang, L., Tan, Y., Guo, S., Zhang, Y., & Xin, Z. (2021). Identification and characterization of a novel carboxylesterase EstQ7 from a soil metagenomic library. *Archives of Microbiology*, 203, 4113-4125.
- Yang, A. S. (2002). Structure-dependent sequence alignment for remotely related proteins. *Bioinformatics*, 18(12), 1658-1665. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.12.1658>
- Yang, S., Liu, M., Long, L., Zhang, R., & Ding, S. (2018). Characterization of a cutinase from *Myceliophthora thermophila* and its application in polyester hydrolysis and deinking process. *Process Biochemistry*, 66, 106-112.
- Zarafeta, D., Moschidi, D., Ladoukakis, E., Gavrilov, S., Chrysina, E. D., Chatzioannou, A., Kublanov, I., Skretas, G., & Kolisis, F. N. (2016). Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases. *Scientific reports*, 6(1), 1-16.

- Zhang, K., Hamidian, A. H., Tubić, A., Zhang, Y., Fang, J. K., Wu, C., & Lam, P. K. (2021). Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environmental Pollution*, 274, 116554.
- Zimmermann, W., & Billig, S. (2011). Enzymes for the biofunctionalization of poly (ethylene terephthalate). *Biofunctionalization of Polymers and their Applications*, 97-120.
- Zock, J., Cantwell, C., Swartling, J., Hodges, R., Pohl, T., Sutton, K., Rosteck Jr, P., McGilvray, D., & Queener, S. (1994). The *Bacillus subtilis* pnbA gene encoding p-nitrobenzyl esterase: cloning, sequence and high-level expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 151(1-2), 37-43.



## ÖZ GEÇMİŞ

Fatma Şen Samsun/Çarşamba Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 17.09.2020 tarihinde mezun oldu. 2021 yılında OMÜ LEE Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi.

### İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0009-0004-8022-0050

### Yayınlar:

1. Koçdemir K., Şen F., Wedajo Y.A., Bilgici Ç.M., Bayram M., Selçuk İ., Yılmaz B., Çakar M.M., Aslan E.S., Binay B., 2021. Investigation new positions for catalytic activity of Chaetomium thermophilum and Ceriporiopsis subvermispora formate dehydrogenases. Biocatalysis and Biotransformation, 39:4, 302-312, doi: 10.1080/10242422.2020.1863951

2. Şen F., Cilmeli S., Tunçer M., Doruk T., Könen Adıgüzel S., Ahmet Erkan Kıdeyş A.E., Arzu Karahan A., Adıgüzel A.O., Screening of Potential Cutinase-Producing Clones in Metagenomic Libraries Constructed Using DNA Extracted from Microplastics. 2nd International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences, 10-13 March 2022, Konya/TÜRKİYE.

### Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. 120Z329 numaralı ve “Denizel Ortamlarda Plastiklerin Parçalanma Süreçlerini Hızlandıracak Kütinazların Fonksiyonel Metagenomik Yöntemlerle Keşfi ve Karakterizasyonu” başlıklı TÜBİTAK proje bursu.