

Atf İçin: Erden-Karaoğlan F, Karaoğlan M, 2022. Bakteriye Kaynaklı Lipaz Geninin *Pichia pastoris*'te Klonlanması, Ekspresyonu ve Rekombinant Enzimin Saflaştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(4): 2209 - 2222.

To Cite: Erden-Karaoğlan F, Karaoğlan M, 2022. Cloning and Expression of the Bacterial Lipase Gene in *Pichia pastoris* and Purification of the Recombinant Enzyme. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(4): 2209 - 2222.

Bakteriyel Kaynaklı Lipaz Geninin *Pichia pastoris*'te Klonlanması, Ekspresyonu ve Rekombinant Enzimin Saflaştırılması

Fidan ERDEN-KARAOĞLAN^{1*}, Mert KARAOĞLAN¹

ÖZET: Gıda endüstrisinde enzimler her türlü işleme ve üretim proseslerinde uygulama alanı bulan biyolojik katalizörlerdir. Süt işlemeden meyve suyu üretimine, et işlemeden ekmek üretimine kadar gıda sanayinin çeşitli alanlarında yaygın olarak ihtiyaç duyulan enzimlerden biri lipazlardır. Bu çalışmada, kodon optimize edilmiş *Geobacillus stearothermophilus* lipaz enzimini kodlayan genin, *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde güçlü ve indüklenebilir bir promotör olan *AOX1* promotörü içeren pPICZαA ekspresyon vektörü kullanılarak ekspresyonu yapılmış ve en yüksek lipaz enzimi üretimi gösteren klon belirlenmiştir. Belirlenen klon ile 400 mL indüksiyon besiyerinde 72 saat boyunca üretim gerçekleştirilmiş ve toplanan süpernatant örneğinde enzim aktivitesi, toplam protein ve SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant lipaz enzimi Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminin her aşamasından alınan örneklerde SDS-PAGE analizi yapılmış ve her aşamada elde edilen örneklerde saflaştırma verimi hesaplanmıştır. Saflaştırma işleminden sonra analiz edilen örnekte, en yüksek üretim gösteren klonun 25.02 mg L⁻¹ lipaz üretim seviyesine ulaştığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gıda işleme enzimi, lipaz, protein saflaştırma, *Pichia pastoris*

Cloning and Expression of the Bacterial Lipase Gene in *Pichia pastoris* and Purification of the Recombinant Enzyme

ABSTRACT: In the food industry, enzymes are biological catalysts that find application area in all kinds of processing and production processes. Lipases are one of the enzymes that are widely needed in various fields of the food industry, from milk processing to fruit juice production, from meat processing to bread production. In this study, the gene encoding codon optimized *Geobacillus stearothermophilus* lipase was expressed using the pPICZαA expression vector containing the *AOX1* promoter, which is a strong and inducible promoter in the *Pichia pastoris* expression system, and the clone exhibiting the highest lipase enzyme production was determined. Production was carried out with the determined clone in 400 mL induction medium for 72 hours and the enzyme activity, total protein and SDS-PAGE analyzes were performed in the collected supernatant sample. The recombinant lipase enzyme was purified by Ni-NTA affinity chromatography. SDS-PAGE analysis was performed on the samples taken from each step of the purification process and the purification efficiency was calculated in the samples obtained at each step. In the sample analyzed after purification, it was determined that the clone with the highest production reached the lipase production level of 25.02 mg L⁻¹.

Keywords: Food processing enzyme, lipase, protein purification, *Pichia pastoris*

¹ Fidan ERDEN KARAOĞLAN (Orcid ID: 0000-0002-7062-1844), Mert KARAOĞLAN (Orcid ID: 0000-0002-8280-3282), Erzincan Binalı Yıldırım Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzincan, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Fidan ERDEN-KARAOĞLAN, e-mail: fidan.karaoglan@erzincan.edu.tr

GİRİŞ

Lipazlar (EC 3.1.1.3) trigliseridlerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen ve endüstriyel kullanımlarda oldukça önemli yere sahip bir hidrolaz enzimidir. Lipazlar, karboksilesterazlar ve gerçek lipazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Karboksilesterazlar, suda kısmen çözünebilir, kısa zincirli karboksilik asit esterlerinden oluşan yağları parçalarken, gerçek lipazlar suda çözünmeyen uzun zincirli açilgliserol yapısındaki yağları hidrolize etmektedir (Arpigny ve Jaeger, 1999; Eggert ve ark., 2002; Messaoudi ve ark., 2010). Lipazlar, su-yağ karışımından oluşan kısmen homojen çözeltilerde aktivite gösterebilme yeteneğine sahip enzimlerdir (Sharma ve ark., 2001).

Lipazlar, gıda sanayisinin başta süt işleme, ekmek üretimi, meyve suyu üretimi, hazır gıda işlemede ve içecek üretimi gibi alanlarının yanı sıra deterjan, ilaç, temizlik, kağıt kozmetik gibi diğer sanayi kollarında da yaygın olarak kullanılan ve kullanımı her geçen gün artmakta olan bir enzimdir. Süt endüstrisinde süt yağının hidrolizi, yağ asitlerinin zincir uzunluklarının modifikasyonu ve peynirlerde aroma geliştirici olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Balcao ve Macata, 1998). Ticari olarak kullanılacak lipazların yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermesi ve geniş pH aralığında çalışabilen enzimler olması istenmektedir. Bu nedenle ticari olarak kullanılacak lipaz enzimleri daha çok termofilik mikroorganizmalardan doğal yolla ya da bu mikroorganizmaların gen kaynağı olarak kullanılması ile rekombinant olarak üretilmektedir (Kulkarni ve Gadre, 1999; Sharma ve ark., 2002).

Ticari olarak kullanılan lipazlar günümüzde mikrobiyal kaynaklardan fermentasyon yoluyla elde edilmektedir. Lipaz üreten mikroorganizmalar bakteriler, mayalar ve küflerdir. Bu organizmalar arasında *Penicillium* sp., *Candida* sp., *Fusarium* sp., *Rhizomucor* sp., *Rhizopus* sp. ve *Aspergillus* sp. gibi doğal üretim yapan suşlar olduğu gibi, rekombinant DNA teknoloji metotları kullanılarak elde edilmiş *Pichia* sp. ve *Aspergillus* sp. türleri de bulunmaktadır (Minning ve ark., 1998; Prathumpai ve ark., 2004; Bharathi ve Rajalakshmi, 2019).

Prokaryotik ekspresyon sistemleri; besin gereksiniminin kolaylığı ve ucuz olması, transformasyon proseslerinin kolaylığı ve hızlı olması ve yüksek seviyede ekspresyon gibi sağladığı avantajları sebebi ile rekombinant protein üretimi için genelde ilk tercih olarak öne çıkmaktadır. Ancak üretilen heterolog proteinin stabilitesini veya aktivitesini kaybetmesi gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Ökaryotik proteinlerin doğru şekilde katlanması için, maya ekspresyon sistemlerinin hücre içi ortamı prokaryotik sistemlere göre daha uygundur (Cregg ve ark., 1987). Ayrıca ökaryotik proteinlerin biyolojik olarak aktif olabilmesi için elzem olan post-translasyonel modifikasyonları (disülfit bağı oluşumu ve glikozilasyon gibi) gerçekleştirebilmeleri ile de avantaj sağlamaktadır (Cregg, 2007). Bu çalışmada konukçu olarak ökaryotik bir ekspresyon sistemi olan *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) kullanılmıştır.

P. pastoris mayası farklı karbon kaynakları üzerinde gelişim gösterebilmektedir. Başta glukoz ve metanol olmak üzere gliserol, etanol, sorbitol, mannitol, trehaloz, alaninden de karbon kaynağı olarak yararlanabilmektedir. Ayrıca *AOXI* gibi indüklenebilir ve *GAP* gibi yapısal güçlü promotorlara sahiptir (Cregg ve ark., 1989; Karaoğlan ve ark., 2016).

Literatürde *P. pastoris*'te kodon optimizasyonu ile üretilen birçok proteinin birim başına daha yüksek üretim seviyelerine ulaşıldığı gösterilmiştir. Lipaz üretimi üzerine yapılan önceki çalışmalardan *Yarrowia lipolytica* kaynaklı lipaz geninin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde kodon optimizasyonu yapılarak üretiminde yaklaşık 2.5 kat bir üretim artışı sağlandığı rapor edilmiştir (Zhou ve ark., 2015). Benzer şekilde *Candida rugosa* kaynaklı lipaz geni *P. pastoris* ekspresyon sisteminde kodon optimizasyonu yapılarak ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve 52 kat üretim ve aktivite artışı sağlanmıştır (Chang ve ark., 2006). *P. pastoris* ile termofilik mikroorganizma kaynaklı lipaz enzim üretimleri ele alındığında *Bacillus thermocatenulatus* kaynaklı lipaz enzimini kodlayan genin *P. pastoris*'te fermentör

koşullarında ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve enzimin spesifik aktivitesi 23 000 U mg⁻¹ olarak rapor edilmiştir (Quyen ve ark., 2003). Gıda endüstrisi başta olmak üzere birçok alanda kullanımı oldukça yaygın olan lipazlar teknolojik olarak termofilik organizmalardan elde edilmekte ve teknolojiye de daha çok termofilik özellik gösteren enzimler tercih edilmektedir.

Bu çalışmanın konusu olan *Geobacillus stearothermophilus* kaynaklı lipaz geni, ilk olarak Sinchaikul ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada *G. stearothermophilus* genomik DNA'sından PZR ile elde edilmiş ve gen sekansı ortaya konulmuştur. PZR ile elde edilen lipaz geni prokaryotik bir ekspresyon sistemi olan *E. coli* ekspresyon sisteminde üretilmiş ve bazı biyokimyasal özellikleri ortaya konulmuştur. Ancak *G. stearothermophilus* lipaz geninin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde ekspresyonu veya üretimi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada ise, kodon optimizasyonu yapılmış *G. stearothermophilus* lipaz enzimini kodlayan genin *P. pastoris* ekspresyon sisteminde *AOX1* promotörü altında klonlanması, en yüksek üretim seviyesine sahip *P. pastoris* klonunun seçilmesi ve üretilen enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılarak üretim seviyesinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Lipaz gen kaynağı

Bu çalışmada lipaz (EC 3.1.1.3) gen kaynağı olarak *G. stearothermophilus* lipaz (NCBI Erişim kodu: AAX11388) geni kullanılmıştır. Lipaz enzimini kodlayan gen (*GsLPZopt*) *P. pastoris* ekspresyon sistemine göre kodon optimizasyonu yapılarak C ucundan (C-terminus) polihistidin etiketli olarak sentezlenmiş ve yurtiçi firmalar (Alternatif Medikal, Tokat) aracılığı ile pUC57 klonlama vektöründe liyofilize olarak temin edilmiştir.

Kullanılan suş, besiyeri ve kimyasallar

Alt klonlama çalışmaları ve pPICZ α A-GsLPZopt ekspresyon vektörlerinin çoğaltılması için *E. coli* XL1-Blue, lipaz enziminin rekombinant üretimi için konukçu sistem olarak *P. pastoris* KM71H (*Δaox1::ARG4*) suşu kullanılmıştır. Protein üretimi için ticari pPICZ α A vektörü kullanılmış olup ilgili vektör Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarında mevcuttur.

Transformasyona yetenekli (kompetent) hücrelerinin hazırlanmasında *E. coli* için standart CaCl₂ yöntemi, *P. pastoris* için lityum asetat yöntemi (Wu ve Letchworth, 2004) kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* hücrelerinin geliştirilmesinde LB Miller Broth, LB Miller Agar, LB Lennox Broth ve LB Lennox Agar besiyerleri, *P. pastoris* hücrelerinin geliştirilmesinde YPD Broth, YPD Agar besiyerleri kullanılmıştır. Rekombinant protein üretimi çalışmalarında hücrelerin geliştirilmesi aşamasında BMGY (%1 gliserol, %2 pepton, %1 maya özütü, % 1.34 aminoasit içermeyen maya azot kaynağı, % 4×10⁻⁵ biyotin ve pH 6 100 mM potasyum fosfat tamponu), protein üretimi aşamasında BMMY (%1 metanol, %2 pepton, %1 maya özütü, % 1.34 aminoasit içermeyen maya azot kaynağı, % 4×10⁻⁵ biyotin ve pH 6 100 mM potasyum fosfat tamponu) besiyerleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm besiyeri bileşimleri Becton, Dickinson and Company (BD) (Franklin Lakes, NJ, USA) firmasından temin edilmiştir.

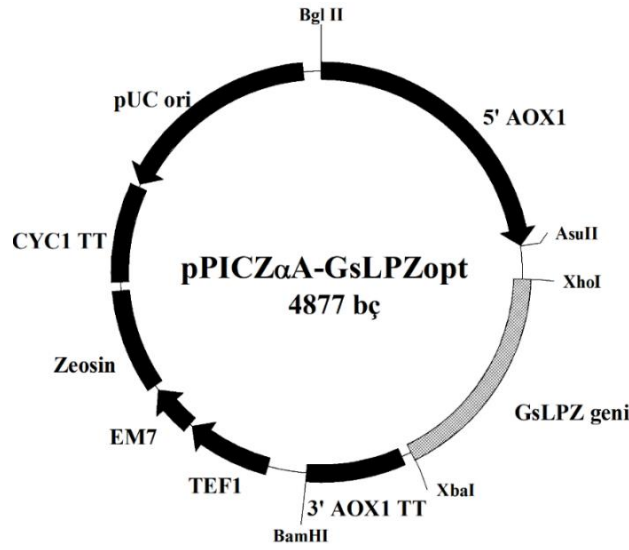
Moleküler klonlama işlemlerinde kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri (*XhoI*, *XbaI*, *StuI* ve *MssI*), DNA ligasyon kiti (Rapid DNA Ligation Kit) ve nükleik asit izolasyon kitleri (GeneJET Plasmid miniprep Kit, GeneJet Gel Extraction Kit) Fermentas (Waltham, MA, ABD) firmasından temin

edilmiştir. Aksi belirtilmediği sürece bu çalışma kapsamında kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir.

Metot

P. pastoris ekspresyon vektörünün oluşturulması

P. pastoris'e göre kodon optimizasyonu yapılmış *GsLPZopt* genini içeren pUC57-*GsLPZopt* vektörü *XhoI* ve *XbaI* enzimleri ile kesilmiş ve 1251 bç uzunluğundaki *GsLPZopt* geni agaroz jelden Gel Extraction Kit (Fermentas, Thermo, ABD) kullanılarak izole edilmiştir. Elde edilen *GsLPZopt* geni aynı restriksiyon enzimleri ile çoklu klonlama bölgesinden lineer hale getirilmiş ve *AOX1* promotörü altında hücre dışı üretim sağlayan pPICZ α A vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmiştir. *GsLPZopt* genini içeren, elde edilen ekspresyon vektörü pPICZ α A-*GsLPZopt* olarak isimlendirilmiştir. Çalışma kapsamında oluşturulan ekspresyon vektörünün şematik gösterimi Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Çalışma kapsamında oluşturulan *AOX1* promotörü altında *GsLPZopt* genini içeren pPICZ α A-*GsLPZopt* ekspresyon vektörü

Ekspresyon vektörü *StuI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve DNAMAN 7.0 programına göre teorik olarak hesaplanan 1710 ve 3077 bç uzunluğundaki DNA parçalarının gözlenmesi ile doğrulanmıştır.

Ekspresyon vektörünün *P. pastoris* KM71H hücrelerine aktarılması

Klonlama sonrası elde edilen pPICZ α A-*GsLPZopt* ekspresyon vektörü, *AOX1* promotöründen ve tek noktadan kesen *MssI* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş ve yaklaşık 3µg DNA örneği elektro-kompotent *P. pastoris* KM71H hücrelerine aktarılmaya hazır hale getirilmiştir.

Transformasyon işlemi 1500V ve 5ms olacak şekilde elektroporasyon (Bio-rad, Gene Pulser Xcell) tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon sonrası transformant hücreler 100-500 µg mL⁻¹ farklı konsantrasyonda zeosin içeren YPD Agar (%1 maya ekstratı, %2 pepton, %2 glukoz ve %1.5 Agar) plakalara ekilmiş ve ardından 30°C sabit sıcaklıkta 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında zeosin içeren YPD Agar plakalarda gelişen farklı büyüklüğe sahip kolonilerden 10 tanesi seçilerek YPD sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 28°C'de gece boyu geliştirilmiştir.

Protein üretimi

Transformasyon plakasından farklı büyüklükte seçilen ve YPD sıvı besiyerinde geliştirilen 10 adet transformantın lipaz enzimi üretim yeteneğinin belirlenebilmesi için ön deneme amaçlı test tüplerinde üretim gerçekleştirilmiştir. İlk olarak BMGY besiyerinde yaklaşık 18 saat geliştirilen hücreler 1200×g'de santrifüj edilmiş ve protein üretim besiyeri olan BMMY besiyerine aktarılmıştır. Test tüpü koşullarında her 24 saatte bir son konsantrasyonu %1 olacak şekilde metanol eklenerek indüklenen lipaz üretimi 72 saat sürdürülmüştür.

Belirli aralıklarla alınan örneklerden kültürün OD₆₀₀ değeri ölçülerek hücre gelişimi takip edilmiştir. Fermentasyon boyunca protein üretiminin belirlenmesi için enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmak üzere ve hücre dışı ortamda bulunan proteinlerin SDS-PAGE analizi için süpernatant örnekleri toplanmıştır.

Lipaz enzim aktivitesi tayini

Lipaz enzim aktivitesinin kantitatif analizi için, yağ molekülünden serbest bırakılan serbest yağ asitinin ölçülmesi prensibine dayanan spektrofotometrik metot kullanılmıştır.

Lipaz enzim aktivitesi, Saisuburamaniyan ve ark. (2004) tarafından kullanılan metot modifiye edilerek analiz edilmiştir. Substrat çözeltisi, sırasıyla 4:3:1 oranlarında olacak şekilde 50 mM fosfat tamponu pH 6, %2 polivinil alkol (PVA) ve rafine zeytin yağının ultraturaks cihazında 5 dak. emülsifiye edilmesiyle hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 900 µL substrat çözeltisi ve uygun dilüsyona getirilen 100 µL süpernatantın karıştırılıp, güçlü şekilde vortekslenmesi ve 37°C'de 20 dak. 200 rpm çalkalamalı inkübatörde tutulması ile hazırlanmıştır. Sürenin sonunda karışıma 500 µL 6N HCl eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Üzerine 2 mL izooktan eklenmiş ve 1 dak. vortekslenerek serbest yağ asitlerinin izooktan fazına geçmesi sağlanmıştır. Faz ayrımının gerçekleşmesi için 2 dak. oda sıcaklığında inkübasyon sonrası üst faz olan izooktan fazından 1 mL alınarak temiz santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Üzerine pridin ile pH değeri 6.1'e ayarlanan %5 bakır asetat çözeltisi eklenmiş ve vortekslenmiştir. Faz ayrımı oluşan örnekte üst faz olan izooktan fazından yaklaşık 1 mL alınarak spektrofotometrede 715 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür.

Standart aktivite kurvesi farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (1-10 µmol) oleik asit çözeltileri ile elde edilmiştir. Bir ünite lipaz aktivitesi, 1 dakikada, deney koşullarında (40°C, 50 mM fosfat tamponu pH 6), 1 µmol oleik asit üretmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

SDS-PAGE ve western blot analizi

Süpernatant örnekleri ve saflaştırma aşamalarında alınan örneklerde proteinlerin SDS-PAGE ile analizi için; örnekler 20 µL 3:1 kısım olacak şekilde 4×SDS jel yükleme tamponu ile karıştırılmış ve 70°C'de 10 dak. denatüre edilmiştir. Ardından %5 poliakrilamid içeren yükleme jeli ve %10 poliakrilamid içeren ayırma jeli olmak üzere iki fazdan oluşan SDS-PAGE jelinde proteinlerin elektroforez ile ayrımı sağlanmıştır.

Elektroforez işlemi, 1xTGS (0.025 M Tris, 0.192 M Glisin, %0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 100 V değerinde 90 dak. yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyanmış ve ardından boya giderme çözeltisi (%10 asetik asit, %50 metanol ve %40 saf su) ile muamele edilerek boyanın uzaklaştırılması işleminin ardından elde edilen SDS-PAGE jeli görüntülenmiştir (Karaoğlan ve Erden-Karaoğlan, 2020).

Örneklerin western blot analizi için; jelde elektroforez ile ayrımı sağlanan proteinler Owl HEP-1 Semi-Dry Electrobloetter kullanılarak 60 dak. 20 V uygulama ile PVDF membrana (Millipore) aktarılmıştır. Histidin etiketli proteinlerin tespiti SuperSignal West HisProbe Kit ile kit talimatları

doğrultusunda yapılmıştır. Proteinlerin görüntüleme işlemi; karanlık odada membran ile X-ışını filminin 10 sn. inkübasyonunun ardından Kodak film geliştirme solüsyonları ile muamele edilerek gerçekleştirilmiştir.

Çalkalamalı erlenmayerde lipaz üretimi

En yüksek lipaz enzim üretimi sağlayan klonun -80°C 'de muhafaza edilen stok kültüründen ilk olarak 5 mL YPD besiyeri içeren test tüplerine inoküle edilmiş ve 28°C 'de 24 saat 250 rpm'de inkübe edilmiştir. Bu kültür, başlangıç yoğunluğu $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$ olacak şekilde 400 mL BMGY besiyeri içeren 2 L'lik erlenmayer için inokulum olarak kullanılmıştır. Hücreler 28°C 'de yaklaşık 18 saat boyunca geliştirilmiş ve $1200\times\text{g}$ 'de santrifüjlenerek toplanan hücreler enzim üretimi için 400 mL BMMY besiyerine aktararak, üretim 28°C 'de 250 rpm'de 72 saat sürdürülmüştür. Fermentasyon süresinin sonunda kültür $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $10000\times\text{g}$ 'de 5 dak. santrifüjlenmiş ve yaklaşık 400 mL süpernatant örneği toplanmıştır. Toplanan süpernatant örneği aktivite analizleri ve afinite kromatografisi saflaştırmasında kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Lipaz enziminin afinite kromatografisi (Ni-NTA) ile saflaştırılması

Elde edilen 400 mL süpernatant örneğinden histidin etiketli (6×His) olarak üretilmiş olan lipaz enzimi Ni-NTA resin kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla, protein üretimi sonrası elde edilen 400 mL süpernatant örneğinde bulunan proteinler %80 doygunlukta amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve 20 mL $1\times\text{PBS}$ (20 mM potasyum fosfat pH 7.4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) ile çözülmüştür. Karışım $1\times\text{PBS}$ tamponuna karşı diyaliz edilerek amonyum tuzu uzaklaştırmıştır. Elde edilen örneğe $1\times\text{PBS}$ tamponu ile standardize edilmiş olan 4 mL nikel resin eklenmiştir. Karışım 30 dak. boyunca oda sıcaklığında yavaşça çalkalanmış ve ardından proteinin tutunduğu resini toplamak için karışım resin tutma kolonundan geçirilmiştir. Elde edilen resin 25 mM imidazol içeren $1\times\text{PBS}$ ile 3 defa yıkanmış ve ardından resine tutunmuş olan protein (lipaz) farklı konsantrasyonlarda imidazol içeren (100 ve 300 mM) $1\times\text{PBS}$ elüsyon tamponu ile 3 defa muamele edilmiştir (Karaoğlan ve Erden-Karaoğlan, 2021). Saflaştırma prosedürünün her aşamasından alınan örneklerdeki proteinler ve saflaştırma kalitesi SDS-PAGE yöntemiyle tespit edilmiştir. Elüsyon örneklerinde toplam protein miktarı Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit kullanılarak kit talimatları doğrultusunda analiz edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

GsLPZ Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

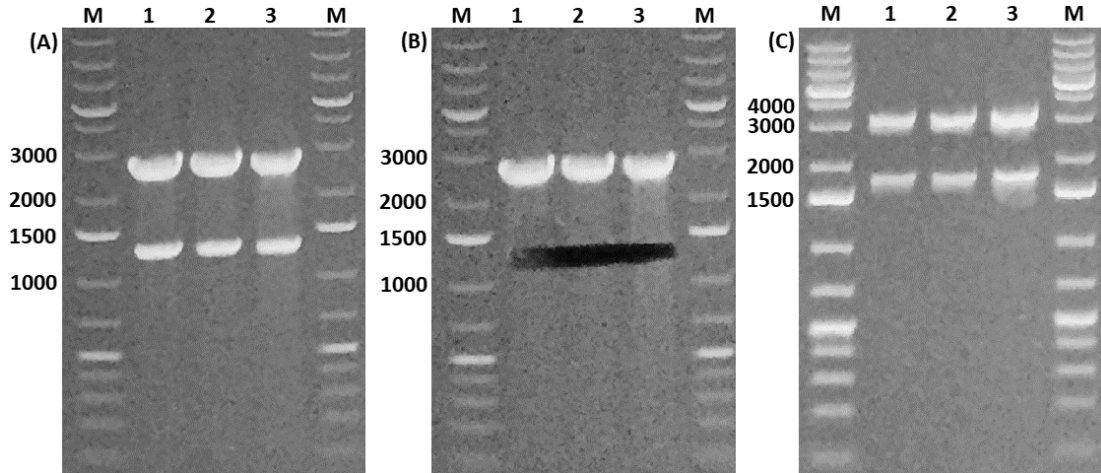
G. stearothermophilus lipaz geninin *P. pastoris* ekspresyon sistemine göre kodon optimizasyonu yapılmış ve bu sekansın doğal sekans ile karşılaştırılması Şekil 2'de verilmiştir. Optimize gen sekansı yurtiçi firmalar aracılığı ile pUC57 standart klonlama vektörü içinde temin edilmiştir.

Bakteriyel Kaynaklı Lipaz Geninin *Pichia pastoris*'te Klonlanması, Ekspresyonu ve Rekombinant Enzimin Saflaştırılması

GsLPZ	ATGAAAGGCTGTGGGTTATGTTGTCTTGCCTGGATTATGCGTGTATTCGGCTTCTCGGTCCTCCGGAGGCGGGGCTGAAAGCGCAACTTCACGGCCCA	100
GsLPZopt	ATGAAAGGATGATGGGTTATGTTGTCTTGCCTGGATTATGCGTGTATTCGGCTTCTCGGTCCTCCGGAGGCGGGGCTGAAAGCGCAACTTCACGGGCTA	100
Consensus	atgaaagg tgt gggttatgtt gt ct tgcct gggattatgct ggtat ttcggc tct cggctc cccggagg cgggct gaaagc gcaact tcac ggccca	
GsLPZ	ACGATGCAACCACTGCTCTCTCATGGTTTACGGCTGGGGAAAGCAAGAAATGTTGGCTTCAAGTATGGGGGGGCTCGCCGGCAATATGAAACA	200
GsLPZopt	ACGATGCAACCACTGCTCTCTCATGGTTTACGGCTGGGGTCCGCAAGAAATGTTGGCTTCAAGTATGGGGTGGGCTCGCTGGCAATATGAAACA	200
Consensus	a gatgc cc at gt t ct catggttt ac gg tgggg g gaagaaatggt gg tcaagta tgggg gg gt cg gg ga at ga ca	
GsLPZ	ATGGCTTGAACGACAAACGGTATCGAACTTATACGCTGCGCTCGGACCGCTCTCCAGAACTGGGACGGGCTGCGAAGCGTATGCTCAGCTTGTGTCGGC	300
GsLPZopt	ATGGCTTGAACGACAAACGGTATCGAACTTATACGCTGCGCTCGGACCGCTCTCCAGAACTGGGACGGGCTGCGAAGCGTATGCTCAGCTTGTGTCGGC	300
Consensus	atgg t aa gacaagg ta gaactta ac ct gc gcaaa ca gg ca gc ggtttgg g actta cccggc t t cc ga tt aaaagggg gg	
GsLPZ	GGGACCGTCGATTA TGGGCGCGCCATGCGGCAAGCAACGGCCATGCGCGGTTTGGCCGACTTATCCCGGCTGTGTCCGGAATGAAAAGGGGTGGCC	400
GsLPZopt	GGGACCGTCGATTA TGGGCGCGCCATGCGGCAAGCAACGGCCATGCGCGGTTTGGCCGACTTATCCCGGCTGTGTCCGGAATGAAAAGGGGTGGCC	400
Consensus	gg ac gtcgatta gg gc gc ca gc gcaaa ca gg ca gc ggtttgg g actta cccggc t t cc ga tt aaaagggg gg	
GsLPZ	GCATCCATATCATGGCCACAGCCCAAGGSGGCAAGCGGCCCATGCTGTCTCGCTCCATAGAAAGGAAGCAAGAAGAGCGGAGTACCGCAAGGC	500
GsLPZopt	GCATCCATATCATGGCCACAGCCCAAGGSGGCAAGCGGCCCATGCTGTCTCGCTCCATAGAAAGGAAGCAAGAAGAGCGGAGTACCGCAAGGC	500
Consensus	g at ca at at gc cac ca gg gg ca acggc g atg t gctc ct t gagaa ggaag caagaagag g gagtacgc aa gc	
GsLPZ	GCAACACCTTCTGTCACCGTTGTTGAAAGGAGCATCATTTTGTGTGAGTGTACGACCATCGCCACTCCCATGACGGGACGACGCTTGTGTCAC	600
GsLPZopt	GCAACACCTTCTGTCACCGTTGTTGAAAGGAGCATCATTTTGTGTGAGTGTACGACCATCGCCACTCCCATGACGGGACGACGCTTGTGTCAC	600
Consensus	ca aa gt tc tg cc t ttga gg gg catcattt gt tt gt ac ac at gc ac cc ca gacgg acgac cttgtcaac	
GsLPZ	ATGGTTCGATTCACCGATCGCTTTTTCGACTTGC AAAAGCGGTTTGGAAAGCGCGCTGCTCGCCAGCAACGTCGCCATCACAGTCAAGTATACGATT	700
GsLPZopt	ATGGTTCGATTCACCGATCGCTTTTTCGACTTGC AAAAGCGGTTTGGAAAGCGCGCTGCTCGCCAGCAACGTCGCCATCACAGTCAAGTATACGATT	700
Consensus	atggt gattt ac gatcg tttt gacttgc aaaa gc gt ttggaag gc gctgctgc ag aacgt cc ta ac ca gt tacgatt	
GsLPZ	TTAAGCTCAGCAATGGGGACTGCGCCGCAACCGGGTGAATCGTTGACCATATATTTGAAACGGCTCAAGCGCTCCCTGTGTGGACCTCAGAGATAC	800
GsLPZopt	TTAAGCTCAGCAATGGGGACTGCGCCGCAACCGGGTGAATCGTTGACCATATATTTGAAACGGCTCAAGCGCTCCCTGTGTGGACCTCAGAGATAC	800
Consensus	t aagct ga caatggg tg g g ca cc ggtga tc tt ga ca ta tt ga g ct aagct tc cctgt tggac tc ac gatac	
GsLPZ	CGCCCGCTACGATTTATCGGTTCCGCGCTGAGAAAGTTGAATCAATGGGTGCAAGCGAGCCCAATACGATATTTGAGCTTTGCCACAGAACGACG	900
GsLPZopt	CGCCCGCTACGATTTATCGGTTCCGCGCTGAGAAAGTTGAATCAATGGGTGCAAGCGAGCCCAATACGATATTTGAGCTTTGCCACAGAACGACG	900
Consensus	gc cg ta ga tt tc gt tc gg gctga aagtt aa caatgggt ca gc cc aa ac ta tat tg tt gc ac gaa g ac	
GsLPZ	TATCCGGGCGGCTCAGCGGCACTATTATCCGAACTCGCAATGAATGATTCAGCGCTGCTGTGCGGTTGCGGTTCCGCTTCCGATCCGATCCGA	1000
GsLPZopt	TATCCGGGCGGCTCAGCGGCACTATTATCCGAACTCGCAATGAATGATTCAGCGCTGCTGTGCGGTTGCGGTTCCGCTTCCGATCCGATCCGATCCGA	1000
Consensus	tat g gg gc t ac gg aactattatcc gaact gg atgaatg tt gc gt gt tg gc cc ttt t gggtc tac g aatcc a	
GsLPZ	CGCTCGCATTTGACGACCGCTGGGCTTGA AACGATGGTATTTCTCAATACGGTTTCATGAACGGTCCAAAGCGTGGATCAAGCGATCCGATCTGACGGTA	1100
GsLPZopt	CGCTCGCATTTGACGACCGCTGGGCTTGA AACGATGGTATTTCTCAATACGGTTTCATGAACGGTCCAAAGCGTGGATCAAGCGATCCGATCTGACGGTA	1100
Consensus	c t ggcattgacga cg tggct ga aacgatgg at gt aa acggt tc atgaacgg cc aagcgtggatca cgat g at gt cc ta	
GsLPZ	TGACCGGCGGCTTCAAAAAGGGGTTTGGAAATGACATGGGACACTACAATSTCGACATTTGGAAATCATCGGCTTGGACCGCAATCCGTCATTGATAT	1200
GsLPZopt	TGACCGGCGGCTTCAAAAAGGGGTTTGGAAATGACATGGGACACTACAATSTCGACATTTGGAAATCATCGGCTTGGACCGCAATCCGTCATTGATAT	1200
Consensus	tgacgg gc tt aaaaaagg gt tggaa gacatggg ac tacaa gt ga cat tggaa at at gg gttgacc aatcc tcatt gatat	
GsLPZ	CGGCGCTTTTATTTGGGACTTGGCGAGCASTTGGCGAGCTTCCAGCCCTTAA	1251
GsLPZopt	CGGCGCTTTTATTTGGGACTTGGCGAGCASTTGGCGAGCTTCCAGCCCTTAA	1251
Consensus	cg gc tt tatttggc cttgc gagca tggc tt ca cc taa	

Şekil 2. *G. stearothermophilus* lipaz geninin *P. pastoris* mayasına göre kodon optimize DNA sekansının doğal sekans ile karşılaştırması

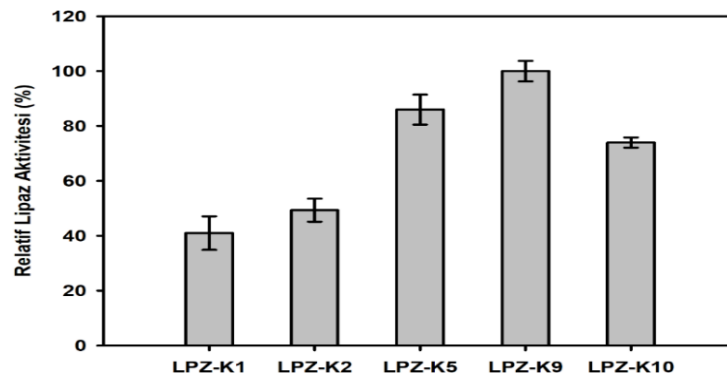
P. pastoris'e göre kodon optimize olarak temin edilen lipaz genini içeren pUC57-GsLPZopt vektörü *XhoI-XbaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ve *GsLPZ* geni klonlama vektöründen çıkarılmıştır. Yaklaşık 1251 bç uzunluğundaki *GsLPZ* geni agaroz jelden saflaştırılmıştır (Şekil 3A-B). pPICZαA ekspresyon vektörü aynı restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmiş ve elde edilen lineer ekspresyon vektörüne *GsLPZ* geninin ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon karışımı CaCl₂ metodu ile kompetent hale getirilen *E. coli* XL1-Blue hücrelerine aktararak 25 µg mL⁻¹ zeosin antibiyotiği içeren LB Lennox agar besiyerinde seleksiyon yapılmıştır. Antibiyotik içeren besiyerinde gelişen kolonilerden 3 adet seçilmiş ve ekspresyon vektörünün doğruluğu vektörü ve klonlanan geni birer noktadan kesen *StuI* restriksiyon enzimi ile kontrol edilmiş ve DNAMAN 7.0 ile teorik olarak hesaplanan 1710 ve 3077 bç uzunluğunda DNA parçaları agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3C). Doğrulanmış ekspresyon vektörü *MssI* restriksiyon endonükleaz ile lineer hale getirilerek kompetent *P. pastoris* KM71H hücrelerine elektroporasyon tekniği ile aktarılmıştır.



Şekil 3. (A) *GsLPZopt* geninin pUC57-*GsLPZopt* vektöründen çıkarılması, (B) jelden ekstraksiyonu, (C) elde edilen pPICZ α A-*GsLPZopt* vektörünün restriksiyon enzimi ile kontrolü

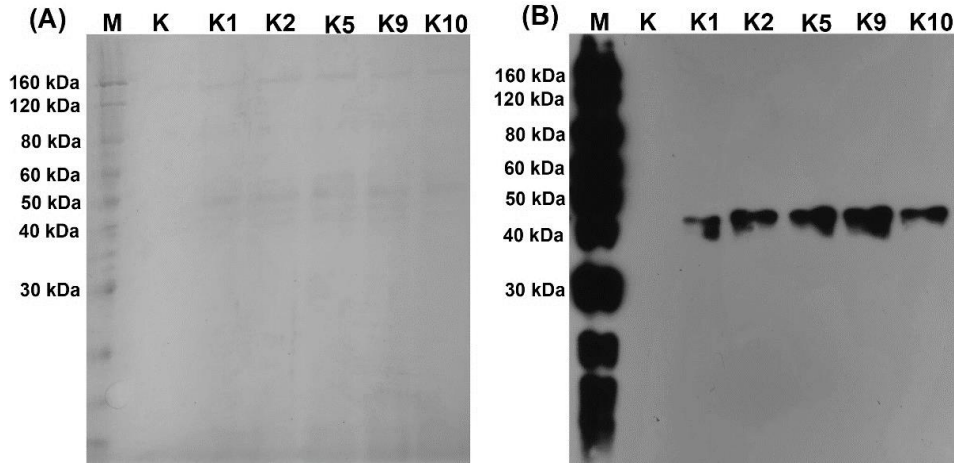
GsLPZopt geninin *P. pastoris*'te Ekspresyon Çalışmaları

Ekspresyon vektörünün Lityum-asetat metodu ile kompetent hale getirilen *P. pastoris* KM71H suşuna transformasyonu sonrası zeosin içeren seleksiyon plakasında gelişim gösteren 10 koloni ilk olarak YPD besiyerinde 28°C'de bir gece boyunca geliştirilmiştir. YPD besiyeri ortamında gelişen hücrelerin 100 μ L'si 2 mL BMGY besiyeri içeren test tüplerine inoküle edilerek 18 saat 28°C 250 rpm'de gelişime bırakılmıştır. Sürenin sonunda hücreler 2 mL steril tüplerde santrifüjlenmiş ve elde edilen hücre peleti 2 mL BMMY besiyerinde çözülerek temiz test tüplerinde aynı hacim ve koşullarda 72 saat boyunca induksiyona bırakılmıştır. İndüksiyon süresi boyunca her 24 saatte bir besiyeri ortamında son konsantrasyonu %1 olacak şekilde hem karbon kaynağı hem de indükleyici olarak rol oynayan metanol eklenmiştir. İndüksiyon aşamasının sonunda kültürlerin hücre yoğunlukları (OD_{600nm}) ölçülerek süpernatant örnekleri aktivite analizleri için toplanarak fermentasyon sonlandırılmıştır. Süpernatant örneklerinde lipaz aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Enzim aktivitesi ölçümü sonrası seçilen 10 klondan 5 klonda enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Ayrıca kontrol olarak kullanılan ekspresyon kaseti transform edilmemiş KM71H hücresinden elde edilen süpernatant örneğinde de enzim aktivitesi tespit edilmemiştir. Diğer 5 klonda ise farklı düzeylerde enzim aktivitesi tespit edilmiş olup, en yüksek enzim aktivitesi LPZ-K9 olarak isimlendirilen klonda elde edilmiştir. Sonuçlar en yüksek aktivite gösteren örneğe göre bağıl lipaz aktivitesi olarak verilmiş olup, her bir kültürün hücre yoğunluğunun farklı olması sebebiyle değerler hücre yoğunluğu ile normalize edilerek verilmiştir. Bu sayede hücre yoğunluğundan gelebilecek olan enzim aktivitesi farklarının önüne geçilmiştir. LPZ-K9 klonu ile test tüpü koşullarında 72 saatlik induksiyon sonucu aktivite değeri 13.28 U mL⁻¹ olarak ölçülmüştür.



Şekil 4. Seçilen klonlardan lipaz aktivitesi gösteren klonların relatif lipaz enzim aktivitesi sonuçları

Enzim aktivitesi tespit edilen 5 klonla ait süpernatant örneklerindeki enzim varlığı SDS-PAGE ve western blot analizleri ile doğrulanmıştır. Hücre yoğunluğuna göre normalize edilen süpernatant örnekleri SDS-PAGE jeline yüklenmiş ve 100 V gerilimde 90 dak. yürütülmüştür. Ekspresyon vektörü transform edilmemiş ve aynı fermentasyon işlemleri uygulanan *P. pastoris* KM71H kontrol suşu olarak kullanılmıştır. Test tüpü koşullarında elde edilen süpernatant örneklerinde yapılan SDS-PAGE görüntüsü Şekil 5'te verilmiştir. SDS-PAGE analizi sonucu protein bantlarının zayıf olması nedeniyle ve lipaz olduğu düşünülen bantların doğrulanması için western blot analizi yapılmıştır. Yapılan western blot analizi sonucu seçilen klonlarda hücre dışı lipaz üretiminin varlığı ortaya konulmuştur (Şekil 5). Hücre yoğunluğu ile normalize edilerek jele yüklenen örneklerde yapılan western blot analizi sonucunda LPZ-K9 olarak numaralandırılan klonun daha yüksek yoğunlukta bant verdiği ve üretim seviyesinin lipaz üretimi gösteren diğer klonlara göre nispeten daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle, lipaz üretiminin erlenmayer koşullarında yüksek hacimle gerçekleştirilmesi ve saflaştırılması için üretim klonu olarak LPZ-K9 seçilmiştir.



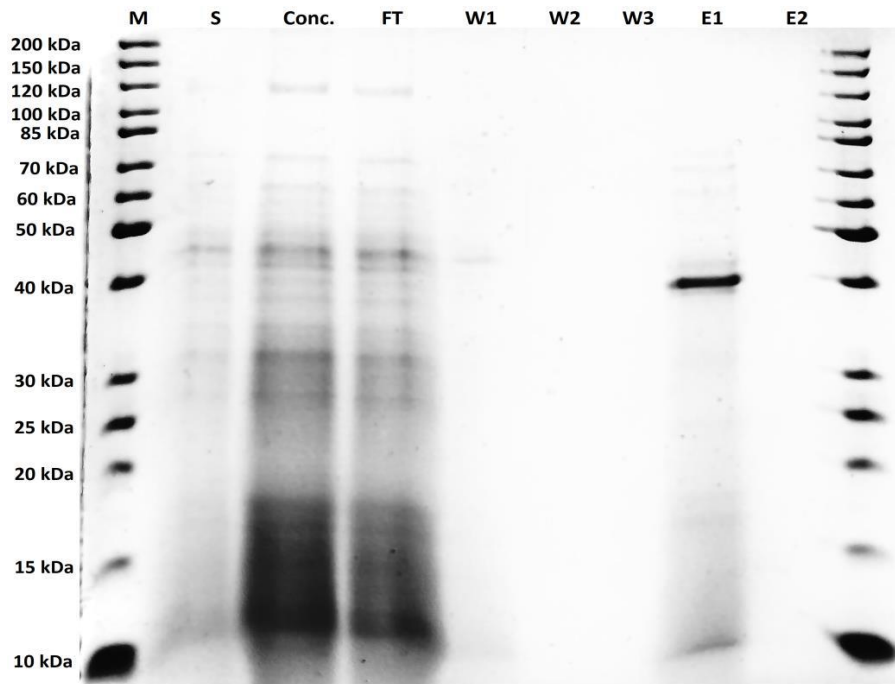
Şekil 5. En yüksek aktivite değeri gösteren 5 klon ile yapılan fermentasyon sonrası elde edilen süpernatant örneklerinin (A) SDS-PAGE ve (B) Western blot X-ray film görüntüsü. M: Benchmark His-Tagged protein Standard, K: Kontrol (transformasyon yapılmamış suş), K1-K10: Transformant klonlar

Lipaz enziminin Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Bu çalışmadaki rekombinant protein C ucundan (C-terminus) polihistidin (6xHis) etiketli olarak üretilmiştir. Histidin etiketi boyutunun küçük olması (6xHis etiket, 0.84 kDa) ve fizyolojik pH'da yüksüz olması nedeniyle genellikle proteinin katlanmasını, yapısını ve fonksiyonunu etkilememektedir (Carson ve ark., 2007). Ayrıca histidin etiketli proteinlerin saflaştırılması tekniği, yüksek saflıkta etkin saflaştırma olanağı sağlayan immobilize metal afinite kromatografisi prensibine dayanmaktadır. Bu teknikte protein, histidin etiketi ile reçine matrisi üzerinde sabitlenmiş olan geçiş metal iyonlarına (bu çalışmada nikel) bağlanarak süpernatandaki etiketsiz diğer proteinlerden ayrılır. Ardından histidin etiketi ile yarışan imidazol ile muamele edilen reçineden rekombinant proteinin geri kazanımı sağlanır (Spriestersbach ve ark., 2015).

En yüksek lipaz enzim aktivitesi gösteren LPZ-K9 klonu ile erlenmayer koşullarında protein üretimi yapılmıştır. Bu amaçla, 2 L erlenmayerde 400 mL BMGY besiyerinde yaklaşık 8-10 OD değerine kadar geliştirilen hücreler 1200×g'de santrifüj edilerek 400 mL BMMY besiyerine aktarılmış ve 28°C 250 rpm'de 72 saat boyunca induksiyon yapılmıştır. İndüksiyon her 12 saatte bir son konsantrasyonu %1 olacak şekilde metanol eklenerek sağlanmıştır. İndüksiyonun sonunda süpernatant 10000×g'de santrifüjlenerek ayrılmış ve yaklaşık 400 mL süpernatant örneği elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant örneğindeki proteinler %80 doygun amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve çökelti örneği 20 mL 1×PBS tamponunda çözülmüştür. Elde edilen konsantre enzim çözeltisi 3 kDa cut-off değerine

sahip snake-skin diyaliz torbasında (Thermo Scientific, ABD) 1×PBS tamponuna karşı gece boyu diyaliz edilerek amonyum tuzları uzaklaştırılmıştır. Diyaliz edilen örnek son konsantrasyonu 5 mM imidazol içeren 1×PBS tamponu ile karıştırılarak Ni-NTA resin içeren kromatografi kolonuna yüklenmiş ve saflaştırma protokolü doğrultusunda 10 mM imidazol içeren yıkama çözeltisi ile muamele sonrasında farklı imidazol konsantrasyonları ile elüsyon yapılmıştır. Saflaştırma aşamalarının her birinden alınan örneklerin SDS-PAGE görüntüsü Şekil 6'da verilmiştir. Ayrıca, saflaştırma aşamasının süpernatant, çöktürme sonrası ve Ni-NTA saflaştırma sonrası diyaliz edilen örneklerde saflaştırma protokolünün verimi hesaplanmıştır (Çizelge 1). En yüksek üretim seviyesine sahip klon ile erlenmayer koşullarında yapılan fermentasyon sonrası elde edilen süpernatant örneğinde 45.15 U mL^{-1} lipaz aktivitesine ulaşılmıştır. Bu sonuç, test tüpü koşullarında yapılan denemeler ile karşılaştırıldığında erlenmayer koşullarında üretimin yaklaşık 3.4 kat arttığı görülmüştür.



Şekil 6. Lipaz enziminin saflaştırılma aşamalarına ait SDS-PAGE görüntüsü. M: Protein marker, S: Süpernatant, Conc.: Konsantre edilen süpernatant, FT: Kolondan tutulmadan geçen kısım, W1-W3: Yıkamalar, E1-E2: Elüsyonlar

Çizelge 1. Rekombinant lipaz enziminin saflaştırma aşamalarının verim hesaplamaları

	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik Aktivite (U mg^{-1})	Saflaştırma faktörü	Verim (%)
Süpernatant	18 060	132.46	136.34	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi	14 470	52.32	276.57	2.03	80.12
Ni-NTA kolon	10 530	10.01	1052	7.72	58.30

Saflaştırma sonrası yapılan SDS-PAGE analizi sonucu, teorik olarak yaklaşık 42 kDa moleküler ağırlığa sahip lipaz enziminin E1 fraksiyonunda saf olarak elde edilmiştir. Literatürde farklı termofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazların moleküler ağırlığı genellikle ~30-60 kDa arasında değişmekte olup (Salihu ve Alam, 2014), bu çalışmada kullanılan gen kaynağı için tespit edilen protein teorik olarak beklenen büyüklüktedir. Elde edilen fraksiyon diyaliz edilerek enzim aktivitesi, protein konsantrasyonu ve spesifik enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılmıştır. Diyaliz sonrası elde edilen saf protein çözeltisinde aktivite ölçümü sonrası spesifik aktivitesi 1052 U mg^{-1} olarak bulunmuştur.

Uygulanan Ni-NTA saflaştırma yönteminde saflaştırma verimi %58.30, saflaştırma katsayısı 7.72 olarak hesaplanmıştır. Daha önce *P. pastoris*'te üretilen *Bacillus* sp. strain L2 kaynaklı lipaz enzimi Ni-NTA yöntemi ile tek aşamada saflaştırılmış ve %63 verimle 1.8 kat saflaştırma sağlanmıştır (Sabri ve ark., 2009).

Doğal mikrobiyal kaynaklardan lipaz üretimi ve saflaştırması yapılan önceki çalışmalarda; *B. methylotrophicus* PS3 suşu ile lipaz üretimi gerçekleştirilmiş ve ardışık uygulanan amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex G-100 jel kolon kromatografisi yöntemleri ile %24.10 verimle 2.90 kat olarak saflaştırılan lipaz enziminde 693 U mg⁻¹ spesifik aktivite tespit edilmiştir (Sharma ve ark. (2017)). *G. thermodenitrificans* IBRL-nra suşundan termostabil lipazın saflaştırma işlemi ultrafiltrasyon, Heparin-afinite kromatografisi ve Sephadex G-100 jel kolon kromatografisi yöntemleri ile üç aşamada gerçekleştirilmiş ve son aşamada %9 verimle 34 kat saflaştırılan enzimde 36.7 U mg⁻¹ spesifik aktivite kaydedilmiştir (Balan et al. 2012). *G. stearothermophilus* Strain-5 suşundan lipaz saflaştırılması için ultrafiltrasyon, Q-Sepharose iyon değişim kromatografisi, Sephadex G-100 jel kolon kromatografisi ve Hidroksil Apatit kromatografisi ile dört aşamada gerçekleştirilen işlemde son aşama %9 verimle 22.6 kat saflaştırılan enzimde 579.22 U mg⁻¹ spesifik aktivite kaydedilmiştir. *E. coli* ekspresyon sisteminde rekombinant olarak üretilen *G. stearothermophilus* kaynaklı lipaz enzimi ile yapılan çalışmalarda; CM-Sepharose ve DEAE-Sepharose kolon ile yapılan saflaştırma işleminde son aşamada %62.2 verimle 11.6 kat saf enzim elde edilirken (Kim ve ark. 2000), ultrafiltrasyon ve Q HyperD kolon kullanılarak hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) yöntemi ile son aşamada %71 verimle 18 kat saflaştırma sağlanmıştır (Sinhaikul ve ark., 2001). Elde edilen sonuçlar rekombinant yöntemle üretilen enzimlerin saflaştırılmasında daha yüksek verim elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca, lipaz üretiminde rekombinant teknolojilerin yer alması; elde edilen enzimin saflığını ve verimini artırırken, aynı zamanda genel prosedürün maliyetini de düşürerek daha ekonomik bir seçenek olarak öne çıkmaktadır (Yagmurov ve ark., 2017).

Literatür incelendiğinde bakteriyel kaynaklı lipaz enzimlerinin spesifik aktivite değerlerinin 1.11-2392 U mg⁻¹ gibi geniş bir aralıkta değiştiği rapor edilmiştir (Javed ve ark., 2018). Bu çalışmanın konusu olan *G. stearothermophilus* lipaz enzimi ile yapılan çalışmalar incelendiğinde Kim ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada *E. coli* ekspresyon sisteminde üretilen enzimin spesifik aktivite değerinin 1690 U mg⁻¹ olduğu belirtilmektedir. Diğer bir çalışmada ise, aynı gen kaynağı kullanılarak benzer şekilde *E. coli* ekspresyon sisteminde üretilen enzimin spesifik aktivitesinin 811 U mg⁻¹ olarak analiz edildiği rapor edilmiştir (Sinhaikul ve ark., 2001). Bu çalışmalardan farklı olarak tarafımızdan yapılan çalışmada ökaryotik ekspresyon sisteminde üretilen aynı enzimin spesifik aktivite değeri yaklaşık 1052 U mg⁻¹ olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür ile kısmen uygunluk göstermekle birlikte, literatürde bu kadar farklı sonuçların olması daha önceki çalışmalarda ve bu çalışmada kullanılan saflaştırma yöntemlerinin birbirinden farklı yöntemler olması ve elde edilen son ürünlerdeki safsızlıklar ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Lipaz enzimi doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere çeşitli kaynaklardan izole edilebilmektedir. Bitkisel kaynaklarda genellikle yağlı tohumlardan saflaştırılan lipaz enzimini Mercan Ülkü ve ark. (2019) yağlı bir bitki tohumu olan antep fıstığından elde etmiş ve kinetik özelliklerini belirlemiştir. Rueda-Lopez ve ark. (2016) pasifik mavi yüzgeçli orkinostan izole edilen pankreatik lipazların biyokimyasal karakterizasyonlarını yapmışlardır. Acu ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada süt ve süt ürünlerinden izole edilen 50 laktik asit bakterisinin lipaz üretim yetenekleri taranmış ve lipaz üretimi için optimum koşulları araştırılmıştır. Arık ve ark. (2021) topraktan elde edilen aktinomiset izolatlarının lipaz aktivitelerini analiz etmişler ve lipaz üretimlerini aktiviteye bağlı zon

oluşumlarının ölçümü ile belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilen enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin de farklılık gösterdiği görülmektedir. Ancak yüksek sıcaklıklarda yürütülen proseslerde kullanımda avantaj sağlaması nedeniyle termofilik mikroorganizmalardan izole edilen enzimler endüstriyel alanda daha çok ilgi görmektedir (Zamost ve ark., 1991). Bu durum, çalışmaları endüstriyel öneme sahip enzimleri üreten termofilik mikroorganizmaların izolasyonuna yönlendirmektedir. Aytar ve ark. (2021) Aydın ve Denizli'deki termal alanlardan izole ettikleri termofilik suşların lipaz, amilaz ve proteaz aktivitelerini araştırmış ve izolatlardan %50'sinin lipaz ürettiğini rapor etmişlerdir. Rekombinant DNA teknolojisi ise enzimlerin farklı gen kaynaklarından izole edilebilmesine ve endüstriyel alanda daha kolay uyum sağlayan konukçu ekspresyon sistemlerinde hem daha yüksek üretim seviyelerinde hem de daha ekonomik üretimine imkan sağlamaktadır (Rigoldi ve ark., 2018). Literatürde farklı termofilik mikroorganizma kaynaklarından rekombinant lipaz üretimi üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Cho ve ark., 2000; Sinchaikul ve ark., 2001, Zhang ve ark., 2020). Bu çalışmada termofilik *G. stearothermophilus* lipaz enziminin *P. pastoris*'te rekombinant olarak üretimi ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen klon lipaz enzimi üretimi için ökaryotik ekspresyon sistemi olarak alternatif olma potansiyeline sahiptir.

SONUÇ

Bu çalışmada, *G. stearothermophilus* lipaz enziminin ökaryotik bir ekspresyon sistemi olan *P. pastoris*'te ilk kez rekombinant üretiminin yapılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında, *P. pastoris* ekspresyon sistemine göre optimize edilmiş gen dizisi ile *P. pastoris*'te *AOX1* promotörü altında metanol indüksiyonlu hücre dışı lipaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrası seçilen 10 klon üretim açısından test tüpü koşullarında taranmış ve 5 klonda üretimin başarılı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen 5 klon ile yapılan üretimler sonucunda en yüksek üretim düzeyine sahip klon belirlenmiştir. Ardından, en yüksek üretim sağlanan klon ile 2 L erlenmayer koşullarında üretim yapılmış ve elde edilen süpernatant çözeltisinden lipaz enzimi Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Çalışma sonunda lipaz enzimi için rekombinant üretim sağlayan bir klon başarı ile elde edilmiştir. Deterjan, deri ve kozmetik endüstrilerinde kullanım potansiyeline sahip olan bu enzim; ayrıca gıda alanında peynirlerin hızlı olgunlaştırılmasında, peynir ve benzeri gıda ürünlerinde aroma arttırıcı olarak, et ve balık işleme endüstrilerinde yağsız et üretiminde fazla yağın uzaklaştırılması amacıyla, ayrıca balık yağı hidrolizi ile omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri üretiminde değerlendirilebilir. İleride yapılacak çok kopyalı klonlar, üretim koşullarının optimizasyonu ve biyoreaktör koşullarında üretim çalışmaları ile üretim seviyesi ve veriminin daha yüksek seviyelere çıkarılması mümkündür.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2019-598 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

Acu E, Kılıç V, Kıvanç M, 2021. *Enterococcus durans* ile ekstraselüler lipaz üretimi ve karakterizasyonu. Gıda, 46 (2): 474-487.

- Arık G, Yılmaz Sariözlü N, 2021. Toprakta izole edilen aktinomisetlerin lipaz aktivitelerinin belirlenmesi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14(3): 487-492.
- Arpigny JL, Jaeger KE, 1999. Bacterial Lipolytic Enzymes: Classification and Properties. *Journal of Biochemistry*, 343: 177 – 183.
- Aytar M, Bozdoğan B, Başbülbul G, 2021. Aydın ve Denizli'deki sıcak su kaynaklarından izole edilen termofilik bakterilerin lipaz, amilaz ve proteaz aktivitelerinin araştırılması. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 27: 570-574.
- Balan A, Ibrahim D, Abdul Rahim R, Ahmad Rashid, FA, 2012. Purification and characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. *Enzyme Research*, 987523.
- Balcao VM, Malcata FX, 1998. Lipase catalyzed modification of milk fat. *Biotechnology Advances*, 16(2): 309-341.
- Bharathi D, Rajalakshmi G, 2019. Microbial Lipases: An Overview of Screening, Production and Purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368.
- Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, Delucas LJ, 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 63(Pt 3): 295-301.
- Chang SW, Lee GC, Shaw JF, 2006. Efficient Production of Active Recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and Biochemical Characterization of the Purified Enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5831-5838.
- Cho AR, Yoo SK, Kim EJ, 2000. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 186(2): 235-238.
- Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden KR, Kellaris A, Davis GR, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G, Thill GP, 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 5: 479-485.
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA, 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 1316–1323.
- Cregg JM, 2007. *Pichia* Protocols, *Methods in Molecular Biology Series*, 389, 2nd edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1-10.
- Eggert T, Pouderoyen GV, Pencreac'h G, Douchet I, Verger R, Dijkstra BW, Jaeger KE, 2002. Biochemical Properties and Three-Dimensional Structures of Two Extracellular Lipolytic Enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26: 37–46.
- Javed S, Azeem F, Hussain S, Rasul I, Siddique MH, Riaz M, Afzal M, Kouser A, Nadeem H, 2018. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132: 23-34.
- Karaoğlan M, Erden-Karaoğlan FE, Inan M, 2016. Comparison of ADH3 promoter with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 121: 112-117.
- Karaoğlan M, Erden-Karaoğlan F, 2020. Effect of codon optimization and promoter choice on recombinant endopolygalacturonase production in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 139, 109589.
- Karaoğlan M, Erden-Karaoğlan F, 2021. Extracellular Production and Purification of the β -glucanase in *Pichia pastoris* Expression System. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 14 (2): 620-630.
- Kim MH, Kim HK, Lee JK, Park SY, Oh TK, 2000. Thermostable Lipase of *Bacillus stearothermophilus*: High-level production, purification, and calcium-dependent Thermostability. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(2): 280-286.
- Kulkarni N, Gadre RV, 1999. A Novel Alkaline, Thermostable, Protease-free Lipase from *Pseudomonas sp.* *Biotechnology Letters*, 21: 897-899.
- Mercan Ülkü D, Gidiş M, Bülbül M, 2019. Antep fıstığı (*Pistacia vera*) tohumundan lipaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(3): 588-595.

- Messaoudi A, Belguith H, Gram I, Hamid JB, 2010. Classification of EC3.2.2.3 Bacterial true lipase using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology*, 9(48): 8243-8247.
- Minning S, Schmidt-Dannert C, Schmid RD, 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology*, 66(2-3): 147-56.
- Prathumpai W, Flitter SJ, McIntyre M, Nielsen, J, 2004. Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 714-719.
- Quyen DT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD, 2003. High-Level expression of lipase from *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. *Protein Expression and Purification* 28: 102-110.
- Rigoldi F, Donini S, Redaelli A, Parisini E, Gautieri A, 2018. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, 2(1), 011501.
- Rueda-Lopez S, Martinez-Montano E, Viana MT, 2016. Biochemical characterization and comparison of pancreatic lipases from the Pasific Bluefin Tuna, *Thunnus orientalis*; Totoaba, *Totoaba macdonaldi*; and Striped Bass, *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 48(1): 156-165.
- Sabri S, Rahman RN, Leow TC, Basri M, Salleh AB, 2009. Secretory expression and characterization of a highly Ca²⁺-activated thermostable L2 lipase. *Protein Expression and Purification*, 68(2): 161-166.
- Salihu A, Alam Z. 2014. Thermostable lipases: an overview of production, purification and characterization. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 11(3): 1095-1107.
- Saisuburamaniyan N, Krithika L, Dileena KP, Sivasubramanian S, Puvanakrishnan R, 2004. Lipase assay in soils by copper soap colorimetry. *Analytical Biochemistry*, 330: 70-73.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC, 2001. Production, Purification Characterization and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.
- Sharma R, Soni S, Vohra R, Gupta L, Gupta J, 2002. Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Lipase from a New Thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. *Process Biochemistry*, 37: 1075-1084.
- Sharma P, Sharma N, Pathania S, Handa, S, 2017. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2): 369-377.
- Sifour M, Saeed HM, Zaghoul TI, Berekaa MM, Abdel-Fattah YR, 2010. Purification and properties of a lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *International Journal of Biological Chemistry*, 4(4):203–212.
- Sinchaikul S, Sookkheo B, Phutrakul S, Pan FM, 2001. Optimization of a thermostable lipase *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification and Characterization. *Protein Expression and Purification*, 22: 388-398.
- Spiestersbach A, Kubicek J, Schäfer F, Block H, Maertens B, 2015. Purification of His-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*, 559: 1-15.
- Wu S, Letchworth GJ, 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 36: 152-154.
- Zamost BL, Nielsen HK, Starnes RL, 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8: 71-81.
- Zhang J, Tian M, Lv P, Luo W, Wang Z, Xu J, Wang Z, 2020. High-efficiency expression of the thermophilic lipase from *Geobacillus thermocatenuatus* in *Escherichia coli* and its application in the enzymatic hydrolysis of rapeseed oil. *3 Biotech*, 10(12): 523.
- Zhou WJ, Yang JK, Mao L, Miao LH, 2015. Codon optimization, promoter and expression system selection that achieved high-level production of *Yarrowia lipolytica* lipase in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 71: 66-72.