

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDÜSTRİYEL OLARAK KULLANILABİLECEK LİPAZLARI
KODLAYAN GENLERİN ZEYTİNDEN KLONLANMASI

Munise YURTSEVER

DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Temmuz, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDÜSTRİYEL OLARAK KULLANILABİLECEK LİPAZLARI KODLAYAN
GENLERİN ZEYTİNDEN KLONLANMASI**

Munise YURTSEVER tarafından hazırlanan tez çalışması çalışması 19.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nevin Gül KARAGÜLER, Üye

İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL, Üye

Ahi Evran Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Endüstriyel Olarak Kullanılabilecek Lipazları Kodlayan Genlerin Zeytinden Klonlanması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim

Munise YURTSEVER

İmza

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2015-01-07-DOP01 numaralı projesi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 217Z171 numaralı 1002 projesi ile desteklenmiştir.

Aileme
ve
dostlarıma

TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun ve araştırma yöntemlerinin belirlenmesinde, deneyleri yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi sırasında bilgi ve birikimlerinden faydalandığım Tez Danışmanım Yard. Doç. Dr. Şenay Vural Korkut'a desteği ve yönlendirici yardımları için içtenlikle teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşım Günseli Korkut Gür'e ve tüm diğer çalışma arkadaşlarıma arkadaşlarıma ve laboratuvardaki aileme,

Hayatım boyunca desteklerini eksik etmeyen aileme ve dostlarıma,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Munise YURTSEVER

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 Giriş	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Lipazlar	1
1.1.2 Lipaz Enzimatik Mekanizması ve Reaksiyonları.....	1
1.1.3 Lipazların Sınıflandırılması.....	5
1.1.4 Lipazların Ekonomik Önemi ve Endüstriyel Kullanımı.....	6
1.1.5 Lipaz Kaynakları.....	10
1.1.6 Stres Cevap Mekanizmalarında Lipazların Görevi	16
1.1.7 Zeytin	17
1.1.8 Zeytin ve Stres.....	18
1.1.9 <i>Pichia pastoris</i> Ekspresyon Sistemi	19
1.2 Tezin Amacı	19
1.3 Hipotez	20
2 Materyal ve Metod	21
2.1 Tamponlar ve Çözeltiler	21
2.2 Besi yerleri.....	22
2.3 Bitki Materyali.....	23
2.3.1 Bitki Büyütme Koşulları	23
2.3.2 Bitki Örneklerinin Alınması	23
2.4 RNA İzolasyonu.....	24
2.4.1 Ribonükleaz (RNaz)' ların Uzaklaştırılması	24
2.4.2 Bitki Örneklerinden RNA İzolasyonu	24

2.4.3	Total RNA Miktarının Belirlenmesi.....	25
2.4.4	RNA'ların Formaldehit Jeli Üzerinde Analizi.....	25
2.4.5	RNA Temizleme	25
2.5	RACE Reaksiyonları.....	26
2.5.1	3'RACE Primerlerinin Tasarımı.....	26
2.5.2	3'RACE İlk Zincir cDNA Sentezi	27
2.5.3	3'RACE PZR Reaksiyonu.....	27
2.5.4	DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz	27
2.5.5	PZR Ürününün Agaroz Jelden Pürifikasyonu	28
2.5.6	Saflaştırılan PZR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu	28
2.5.7	Kompetan Hücrelerin Hazırlanması	29
2.5.8	Transformasyon	30
2.5.9	Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması	30
2.5.10.	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	30
2.5.11	Plazmit İzolasyonu ve Dizi Analizi.....	30
2.6	5'RACE Reaksiyonları	31
2.6.1	5'RACE Reaksiyonları için Primer Tasarımı.....	31
2.6.2	5'RACE Reaksiyonları için İlk Zincir cDNA Sentezlenmesi	33
2.6.3	PZR Reaksiyonu	33
2.6.4	DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz	33
2.6.5	PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu	34
2.6.6	Vektör Ligasyonu ve Transformasyon.....	34
2.6.7	Plazmit İzolasyonu ve Dizi Analizi.....	34
2.7	3'RACE ve 5'RACE Reaksiyonları ile Elde Edilen DNA Dizilerinin Biyoinformatik Analizleri.....	34
2.8	Tam Uzunluktaki cDNA'nın Klonlanması.....	34
2.8.1	İlk Zincir cDNA Sentezlenmesi.....	35
2.8.2	PZR Reaksiyonu	35
2.8.3	İkincil PZR.....	35
2.8.4	Vektör Ligasyonu ve Transformasyon.....	36
2.8.5	Plazmit İzolasyonu ve Dizi Analizi.....	36
2.9	Filogenetik Analiz.....	36
2.10	Zeytin Yaprak Lipazının Soğuk Stresinde Ekspresyon Düzeylerinin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi.....	36
2.11	Zeytin Yaprak Lipazının <i>Pichia pastoris</i> 'te Ekspresyonu.....	37

2.11.1 Vektör Seçimi, Primer Tasarımı ve Lipaz cDNA'sının Çoğaltımı.....	37
2.11.2 Lipaz cDNA'sının pPICZαA Vektörüne Aktarılması ve <i>E.coli</i> 'de Çoğaltılması.....	39
2.11.3 <i>Pichia pastoris</i> X33 Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi.....	39
2.11.4 Plazmitlerin <i>Pichia pastoris</i> X33 Hücrelerine Kimyasal Yolla Transformasyonu	40
2.11.5 X33 Kolonilerinin Taranması.....	40
2.11.6 Tribütirin Petri Deneyi ile Kolonilerinde Aktivite Taranması.....	41
2.12 Zeytin Lipaz cDNA'sının <i>P. pastoris</i> 'te Küçük Ölçekli Ekspresyonu.....	41
2.12.1 SDS-PAGE Analizi.....	42
2.12.2 Enzim Aktivite Analizi.....	42
2.13 Zeytin Yaprak Lipazının <i>Pichia pastoris</i> 'te Büyük Ölçekte Ekspresyonu...	42
2.13.1 Ultrafiltrasyon ile Amonyum Sülfatın Uzaklaştırılması.....	43
2.13.2. Protein Saflaştırma.....	43
2.14 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu.....	43
2.15 Aktivite Analizinin Optimizasyonu.....	44
3 Sonuç ve Öneriler	45
3.1 RNA İzolasyonu.....	45
3.2 RNA Temizleme	45
3.3 RACE Reaksiyonları.....	46
3.3.1 3' RACE Reaksiyonları ve Plazmit İzolasyonu	46
3.3.2 Dizin Analizi Sonuçları ve Benzerlik Analizleri	49
3.4 5'RACE Reaksiyonları.....	52
3.4.1 5'RACE Dizin Analizi ve Benzerlik Analizi.....	53
3.5 3'RACE ve 5'RACE Reaksiyonları ile Elde Edilen DNA Dizilerinin Benzerlik Analizleri.....	54
3.6 Tam Uzunluktaki cDNA'nın Klonlanması.....	56
3.7 Tam Uzunluktaki cDNA Dizisinin Biyoinformatik Analizleri	60
3.8 Filogenetik Analiz.....	64
3.9 Zeytin Yaprak Lipazının Soğuk Stresinde Ekspresyon Düzeylerinin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi.....	65
3.10 Zeytin Yaprak Lipazının <i>Pichia pastoris</i> 'te Ekspresyonu.....	66
3.10.1 Lipaz cDNA'sının Ekspresyon Vektörleri ile Çoğaltımı.....	66
3.10.2 Lipaz cDNA'sının pPICZαA Vektörüne Aktarılması ve <i>E.coli</i> 'de Çoğaltılması.....	68

3.10.3 Rekombinant pPICZ α A Vektörün <i>Pichia pastoris</i> 'e Genomuna Entegrasyonu.....	68
3.10.4 Zeytin Lipaz cDNA'sının <i>P. Pastoris</i> 'te Küçük Ölçekli Ekspresyonu.....	69
3.10.5 Tribütirin Petri Deneyi ile Kolonilerinde Aktivite Taranması.....	70
3.10.6 Protein Miktar Tayini.....	71
3.10.7 Enzim Aktivite Analizi.....	72
3.10.8 Zeytin Lipaz cDNA'sının <i>P. pastoris</i> 'te Büyük Ölçekte Ekspresyonu.....	73
3.10.9 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu.....	74
3.11 Aktivite Analizinin Optimizasyonu.....	75
3.12 Tartışma ve Öneriler.....	76
Kaynakça	78
Tezden Üretilmiş Yayınlar	90

SİMGE LİSTESİ

bp	Baz çifti
kb	Kilobaz
kDa	Kilo Dalton
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
ml	Mililitre
nM	Nanomolar
°C	Santigrat derece
UV	Ultraviyole
U	Ünite

KISALTMA LİSTESİ

cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
IPTG	İzopropil β -D- tiogalaktozit
LB	Luria Broth
MOPS	3-(N-morfolino) Propan Sülfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RACE	cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Devir/ dakika
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-Poli akrilamid jel
X-Gal	5-brom-4-kloro-3-indol-beta-D- galaktozit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1 <i>Candida rugosa</i> lipazı.....	2
Şekil 2.1 PGEMT Vektör Haritası	29
Şekil 2.2 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi.....	29
Şekil 2.3 pPICZαA vektör haritası	38
Şekil 3.1 RNA Formaldehit Jeli Görüntüsü.....	45
Şekil 3.2 RNA Formaldehit Jeli	46
Şekil 3.3 3'RACE PZR ürünlerinin jel üzerinde görüntüsü	47
Şekil 3.4 İkincil PZR ürünlerinin jel üzerinde görüntüsü.....	48
Şekil 3.5 Plazmit kesim jel görüntüsü.....	49
Şekil 3.6 5'RACE reaksiyonların jel üzerinde görüntüsü.....	52
Şekil 3.7 Plazmit kesimlerin agaroz jel üzerinde görüntüsü.	53
Şekil 3.8 PZR ürünlerinin jel üzerinde görüntüsü.....	57
Şekil 3.9 İkincil PZR ürünlerinin agaroz jel üzerinde görüntüsü.....	58
Şekil 3.10 Koloni PZR agaroz jel görüntüsü	59
Şekil 3.11 EcoRI ve PstI enzimleri ile kesilen plazmitlerin agaroz jel görüntüsü.....	60
Şekil 3.12 Hizalanmış lipaz dizileri ve Espiript programı ile tahmin edilen ikincil yapılar	64
Şekil 3.13 MEGA7 programı ile oluşturulan filogenetik ağaç.....	65
Şekil 3.14 LENSF2 ve LER primerleri ile çoğaltılan cDNA'nın agaroz jel üzerinde görüntüsü.....	67
Şekil 3.15 Koloni PCR jel görüntüsü.....	67
Şekil 3.16 Koloni PCR ürünlerinin jel üzerinde görüntüsü	68
Şekil 3.17 Maya koloni PCR jel görüntüsü	69
Şekil 3.18 SDS-PAGE üzerinde X33 ve pozitif kolonilerin ekstraselüler sıvısındaki proteinlerin karşılaştırılması.....	70
Şekil 3.19 Tributirin petri aktivite deneyi	71
Şekil 3.20 Koloniler arasında enzim aktivitesinin karşılaştırılması.....	74
Şekil 3.21 Protein saflaştırma SDS-PAGE jel görüntüsü	74
Şekil 3.22 SDS-PAGE üzerinde X33 ve pozitif kolonilerin ekstraselüler sıvısındaki proteinlerin karşılaştırılması.....	75

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Lipazlar tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar	3
Tablo 1.2 Bitkisel Lipazlar	13
Tablo 2.1 Kullanılan tampon ve çözeltiler.	21
Tablo 2.2 Kullanılan besiyerlerinin içerikleri.....	22
Tablo 2.3 Tasarlanan 3'RACE primerleri.....	26
Tablo 2.4 LRR1 ters primeri.....	32
Tablo 2.5 Tam uzunlukta cDNA'nın klonlanması için tasarlanan primerler.....	35
Tablo 2.6 Gerçek Zamanlı PZR primerleri.....	37
Tablo 2.7 pPICZαA vektörü ile ekspresyon için yeni primerler	38
Tablo 3.1 Dizi analizi sonuçları	49
Tablo 3.2 Hizalanmış diziler.....	50
Tablo 3.3 K3 dizisi ve BLASTn analizi sonuçları.....	54
Tablo 3.4 Birleştirilmiş DNA dizisi ve BLASTn analizi sonuçları	55
Tablo 3.5 Birleştirilen dizinin kodlayıcı kısmı ve amino asit dizisi.....	56
Tablo 3.6 Tam uzunlukta klonlanan dizilerin hizalama analizi.....	60
Tablo 3.7 Tam uzunlukta klonlanan dizinin okuma çerçevesi.....	62
Tablo 3.8 Zeytin yaprak lipazının relatif ekspresyon düzeyleri.....	66
Tablo 3.9 Bradford yöntemi ile protein miktar tayini.....	72
Tablo 3.10 Enzim aktivitesi ve protein miktarı	72
Tablo 3.11 Titrasyonda kullanılan NaOH miktarları	75

Endüstriyel Olarak Kullanılabilecek Lipazları Kodlayan Genlerin Zeytinden Klonlanması

Munise YURTSEVER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Lipazlar, triglisertilerin hidrolizini katalizleyen hidrolazlardır. Hidroliz dışında esterleşme, ester değişimi, asidoliz, alkoliz, aminoliz gibi sentez reaksiyonlarını katalizleyebilen çok yönlü enzimlerdir. Bölge seçicilik, enantiyoseçicilik ve stereoseçicilikleri ve yüksek stabiliteleri nedeniyle sayesinde organik kimyada, deterjan, ilaç, gıda, kozmetik, kâğıt, deri endüstrilerinde, biyodizel üretiminde kullanılırlar.

Endüstride çoğunlukla mikrobiyal lipazlar kullanılmaktadır. Bitkisel lipazlarla ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Bitki lipazları genelde yüksek substrat özgülüğü gösterirler. Bitki lipazları ile ilgili literatürdeki bilgilerin çoğu yağlı tohumlarla ilgilidir. Yağlı tohumlarda aktif lipazlar genellikle çimlenen tohumlarda bulunmuştur. Bununla beraber hint yağı lipazı gibi bazı lipazlar dormant tohumda aktif olarak bulunmuştur. Bunun dışında lateks lipazları da kullanım alan ve olanakları ile dikkat çekmektedir.

Bu projede zeytinden lipaz enzimlerini kodlayan genlerin klonlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla RACE yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle farklı bitkisel lipaz homologlarının dizileri kullanarak EST veritabanı taranmış ve lipaza benzerlik gösteren 843 bp uzunluğunda bir zeytin contig dizisi bulunmuştur. Bu dizi kullanarak 3'RACE primerleri tasarlanmış ve cDNA'nın 3' ucu çoğaltılmıştır. Daha sonra 5'RACE yöntemi ile cDNA'nın 5' ucu çoğaltılmıştır. Daha sonra RACE ile ediletilen dizi bilgisi kullanarak tasarlanan primerler ile 1536 bp uzunluğundaki cDNA tek dizi olarak klonlanmıştır. Bu dizinin lipaza benzerliği BLAST programları ile doğrulanmıştır. Zeytin yaprak lipazının GX SXG lipaz ailesine dahil olduğu görülmüştür. Gerçek Zamanlı PZR analizleri soğuk stresinin ilk 24 saatinde lipaz relatif ekspresyon düzeyinin stres verilmemiş örneğe göre azaldığını göstermektedir. Onuncu günde ise ekspresyon düzeyi stres uygulanmamış örneklerdeki ekspresyon düzeyinin üzerine çıkmıştır. *Pichia pastoris*'te heterolog ekspresyon için farklı koşullarda ekspresyon denemeleri yapılmıştır. Yapılan aktivite deneylerinde enzimin pH 7'de çalıştığı belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonunda tutarlı bir ekspresyon sağlanamamıştır.

Anahtar Kelime: Lipaz, zeytin, klonlama, ekspresyon

Cloning Of Genes Coding Lipase That Could Be Used In Industry From Olive

Munise YURTSEVER

Department of Molecular Biology ve Genetics

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Assist. Prof. Şenay VURAL KORKUT

Lipases are hydrolases which catalyse hydrolysis of tri-glycerides. Lipases are versatile because they can perform both hydrolysis ve synthesis reactions like esterification, interesterification, acidolysis, alcoholysis, amylosis. Since they are chemo-selective, regio-selective, enantio-selective ve highly stable they have applications in organic synthesis, food, detergent, cosmetics, paper, pharmacological industries ve biodiesel production.

Most of lipases used in industry are microbial lipases. There is only a few studies on plant lipases. Plant lipases generally exhibit a particular specificity, usually a substrate specificity. Most of the literature on plant lipases concerns about oil seed lipases. Oil seed lipases generally are active in germinating seeds. However there are lipases found active in dormant seeds, like castor bean lipase.

The aim of this project is cloning of genes encoding lipase enzymes from olive leaves. For this purpose RACE method is used. First, the EST database was screened using sequences of different plant lipase homologs ve an 843 bp long olive contig sequence which is similar to lipase was found. Using this sequence, 3'RACE primers were designed ve the 3' end of the cDNA was replicated. The 5' end of the cDNA was then

amplified by the 5'RACE method. New primers were designed using RACE sequence information ve an 1536 bp long cDNA was cloned as a single sequence. This sequence was analysed ve characterized with bioinformatics programs. Olive leaf lipase was found to be included in the GXSXG lipase family. Real-time PCR analyzes showed that the reletive expression level of lipase in first 24 hours exposed to cold stress were lower than no-stressed sample. Expression level in 10th day reached over no-stressed sample. Expression experiments have been conducted in different conditions for heterologous expression in *Pichia pastoris*. In the activity experiments, it was determined that the enzyme works at pH 7. No consistent expression was achieved by optimization studies.

Key words: Lipase, olive, cloning, expression

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Lipazlar

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar, EC3.1.1.3), triacilgliserollerini diaçil-, monoacil- glisereol veya yağ asidi ve gliserole hidrolizini gerçekleştiren enzimlerdir [1]. İlk olarak Claude Bernard tarafından pankreasta yağları parçalayan bir madde olarak keşfedilmiştir [2]. Lipaz ile ilgili ilk çalışmalar, lipazların hayvan pankreaslarından izole edilmesi ve insan sindirimine yardımcı olarak kullanılması üzerinedir [3]. 1958’de Sarda ve Denuelle lipazların “ara yüz aktivasyonu” ile çalıştıklarını göstermiştir [4].

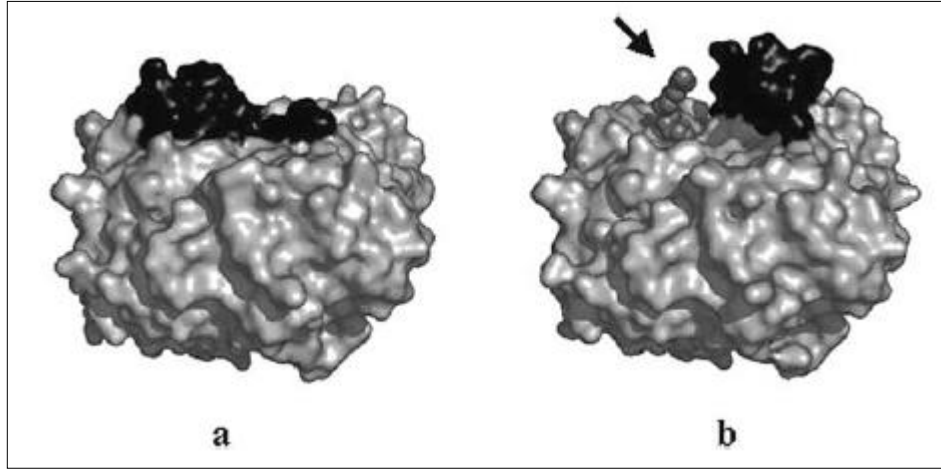
Lipazlar, fizyolojik olarak sindirimde, membran fosfolipid mekanizmasında, iltihap karşıtı mekanizmalarda, hücre sinyal mekanizmalarında rol oynarlar [5], [6]. Esterazlara ait klasik α/β hidrolaz katlanışına sahiptirler. Lipazlar ile esterazların moleküler yapısı ve katalitik mekanizması benzerse de lipazlar esterazlardan substrat tercihi, ara yüz aktivasyonu ve kapak varlığı ile ayrılırlar [7]. Esterazlar suda çözünebilir substratlara, lipazlar ise suda çözünmeyen substratlara etki eder.

Lipazlar, organik çözücülerde stabil, kofaktör gerektirmeyen, geniş substrat özgüllüğüne sahip, stereo-seçicilik ve bölge-seçicilik gösteren enzimlerdir [8]. Uygun koşullarda hidroliz dışında esterleşme, ester değişimi, asidoliz gibi sentez reaksiyonlarını da katalizleyebilirler [9], [10]. Bu özellikleri sayesinde deterjan, yağ, biyodizel, gıda, kağıt, tekstil, organik sentez, kozmetik, ilaç gibi endüstri alanlarında geniş kullanım alanı bulurlar.

1.1.2 Lipaz Enzimatik Mekanizması ve Reaksiyonları

Lipazlar yağ-su ara yüzünde çalışan enzimlerdir. Bu özellikleri onları suda çözünen substratları kullanan esterazlardan ayırır. Enzimin aktif bölgesi “kapak” veya “kanat” olarak adlandırılan mobil bir yapı ile çözücünden korunmaktadır.

Substrat/su ara fazında bu kapak açılarak enzimi aktif formuna dönüştürür (Şekil 1.1) ve substratın katalitik bölgeye erişebilmesini sağlar [11].



Şekil 1. 1 *Candida rugosa* lipazı. [11]

(a) kapak kapalı form (b) kapak açık form. (b) aktif formda substrata erişilebilir bölge okla belirtilen ve koyu gri olan inhibitör ile gösterilmiştir

Enzimatik reaksiyonun ilk aşamasında, katalitik üçlüdeki negatif yüklü aspartik asit veya glutamik asit histidin ile etkileşir. Bu sayede histidinin genel bir baz olarak hareket etmesini ve aktif bölgedeki serinin hidroksil grubundan bir proton koparmasını sağlar. Serinin hidroksil grubunun nükleofilliği artar ve açilgliserolün karbonil grubuna saldırarak açil-enzim ara formu oluşmasını sağlar. Tetrahedral ara form oksianyon rolü ile stabilize olur. Deaçilasyon aşaması arayüzdeki moleküllerin nükleofilliği ile kontrol edilir. Bir nükleofil (Örn: H_2O) açillenmiş enzime saldırıp bir ürünün (uzun zincirli yağ asidi) salınmasına ve böylece katalitik bölgenin rejenerasyonuna sebep olur [12].

Lipazlar çok yönlü enzimlerdir, koşullara bağlı olarak farklı reaksiyonları katalizleyebilirler. Lipazların gerçekleştirebildiği reaksiyonlar hidroliz ve sentez olmak üzere iki grup altında toplanabilir [13]. Ester değişimi, alkoliz ve asidoliz reaksiyonları Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1 Lipazlar tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar

1. Hidroliz
$RCOOR' + H_2O \leftrightarrow RCOOH + R'OH$
2. Sentez Reaksiyonları
a. Esterleşme
$RCOOH + R'OH \leftrightarrow RCOOR' + H_2O$
b. Ester Değişimi
$RCOOR' + R''COOR^* \leftrightarrow RCOOR^* + R''COOR'$
c. Alkoliz (Trans esterleşme)
$RCOOR' + R''OH \leftrightarrow RCOOR'' + R'OH$
d. Aminoliz
$RCOOR' + R''NH_2 \rightarrow RCONHR'' + R'OH$
e. Asidoliz
$RCOOR' + R''COOH \rightarrow R''COOR' + RCOOH$

1.1.2.1 Hidroliz

Lipazların gerçekleştirdiği en temel reaksiyon trigliseritlerin yağ asidi ve gliserole hidrolizidir. Hidroliz için kullanılan geleneksel yöntemler yüksek sıcaklık ve yüksek basınç gerektirir. En bilinen işlem, 50 bar basınç altında sıcaklığın 250°C'ye çıkarılmasını gerektiren Colgate Emery reaksiyonudur [14]. Enzimatik reaksiyon ise oda sıcaklığı veya ılımlı sıcaklıklarda gerçekleşir. Oksitlenmemiş renksiz bir ürün oluşur. Yağ asidi tuzu yerine serbest yağ asitleri üretilir. Bu sayede stabil olamayan yağlardaki yağ asitleri de elde edilebilir. Üretilen yağ asitleri organik çözücülerle yıkanarak lipazdan uzaklaştırılabilir [13].

Lipazlar p-nitrofenil esterleri ve vaks esterlerini de hidrolize edebilir. Bu esterler lipaz aktivite testlerinde kullanılabilir [15].

1.1.2.2 Esterleşme

Hidrolizin tersine esterleşme reaksiyonunda serbest yağ asitleri ve alkol arasında ester bağları kurulur. Lipazlar organik çözücülerde esterleşme reaksiyonlarını

katalizleyebilirler. Lipazların n-pozisyonlarına olan seçiciliği ve bazı yağ asitlerine olan seçiciliği kimyasal yöntemlerle elde edilemeyen özgün ve yüksek değere sahip çok sayıda ürünün biyotransformasyon ile üretilebilmesini mümkün kılar [16]. İlimli koşullarda çalışmaları, yan ürün oluşmaması da kimyasal yöntemle karşı avantaj sağlar.

1.1.2.3 Ester Değişimi

Ester değişimi terimi, bir ester ve başka bir ester arasındaki grupların yer değiştirmesi işlemi olarak tanımlanır. Yağın fiziksel ve kimyasal özellikleri içerdiği yağ asitlerinden birinin başka bir yağ asidi ile değiştirilmesiyle tamamen değişebilir. Değeri düşük yağlardan daha değerli yağların üretimi için ester değişimi reaksiyonları endüstriyel olarak önem taşımaktadır. Lipazlar, özellikle bölge seçicilikleri sayesinde ester değişim reaksiyonlarında dikkat çekmektedir [17].

1.1.2.4 Trans-esterleşme

Trans-esterleşme, bir ester ve bir alkolün yer değiştirmesi reaksiyonudur. Bitkisel ve hayvansal yağların alkolizi yağ asidi alkil esterleri oluşturduğu için önemlidir. Metil esterleri ve etil esterleri oleokimya için önemli ara formlardır [18]. Bazı durumlarda trans-esterleşme karboksilik asit ve alkollerden ester sentezinden daha avantajlı olabilir. Kararsız ve izolasyonu zor karboksilik asitlerin kullanımı yerine ester değiştirme reaksiyonu daha kullanışlıdır [16].

Trans-esterleşme reaksiyonunun en önemli kullanım alanlarından biri de biyodizel üretimidir. Yağ asidi metil esterleri ve etil esterleri dizel yakıtların yerine geçmek için çok uygun bileşiklerdir [19]. Kimyasal yolla biyodizel üretiminde alkali koşullarda gerçekleşen reaksiyon sonucunda istenmeyen bir yan ürün olarak sabun oluşur. Sabun biyodizel ve gliserolün ayrıştırılmasını zorlaştırır. Lipaz katalizi ile üretimde ise sabun oluşmaz. İmmobilize lipazların kullanımı da enzimin geri kazanımını kolaylaştırır [20].

1.1.2.5 Asidoliz

Asidoliz, bir ester ve bir asit grubunun yer değiştirmesi reaksiyonudur. Lipaz katalizli asidoliz ile açıl grubunun trigliserit üzerinde belirli bir yere aktarılması

mümkündür. Ancak kimyasal reaksiyonda bölgesel seçicilik olmadığı için açıl grubu rastgele yerleşir [21]. Yağların hedefli bir şekilde modifikasyonu ile fonksiyonellikleri, absorpsiyonları, metabolizmaları ve besin değerleri iyileştirilebilir [22].

1.1.2.6 Aminoliz

Lipazlar, aminoliz yoluyla aminoalkol bileşiklerinin sentezinde katalizör olarak kullanılabilir. Alkanol aminler hem amin hem de alkol grubundan açillenebilir. Bu nedenle aminoliz reaksiyonunda lipazın kimyasal seçiciliği önemlidir. Organik çözücülerde serbest karboksilik asit kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlarda aminoliz kinetiğini, reaktifler tarafından oluşturulan iyon çiftinin çözünürlüğü kontrol eder [23].

1.1.3 Lipazların Sınıflandırılması

1.1.3.1 Lipazların Korunmuş Dizilere göre Sınıflandırılması

Korunmuş dizi elementlerine göre lipazlar, GX SXG [24] ve GDSL [25] lipazları olmak üzere iki aile altında toplanabilir. GX SXG lipazları klasik lipazlar olarak bilinir ve lipazların genel özelliği olarak aktif bölgelerinde Ser, His, Asp/Glu katalitik üçlüsünü taşırlar. Serin aminoasidi, aminoasit dizisinin ortalarına yakın bulunan korunmuş Gly-X-Ser-X-Gly (X herhangi bir aminoasit olabilir) motifinin merkezinde bulunur [26], [27]. GDSL ailesine ait lipazlar, GX SXG motifini taşımazlar ve nükleofilik dirsek yapısına sahip değildirler [28]. GDSL tipi lipazlar sınıflandırmalarında önem taşıyan korunmuş 5 blokta homoloji paylaşırlar. Aktif bölgedeki serin N-ucuna yakındır [29]. Bu korunmuş diziler dışında lipazlarda dizi benzerliği oldukça düşüktür [27].

1.1.3.2 Lipazların Özgüllüklerine göre Sınıflandırılması

Lipazların özgüllüğü substrat yapısı, enzimin moleküler özellikleri ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından belirlenir. Lipazlar bölge özgüllüklerine göre sn 1,3 bölge seçici lipazlar, sn-2 bölge seçici lipazlar ve özgül olmayan lipazlar olmak üzere gruplandırılabilir. Sn-1,3 bölge seçici lipazlar, 1 veya 3 pozisyonundaki bağı tanıyıp hidrolizler [30]. Böylece 1,2-digliserit veya 2,3-digliserit oluşur. Sn-1,3 bölge seçici lipazları, yapısı değiştirilmiş lipidler, insan sütü

yağı muadili ve kakao yağı muadili üretiminde kullanılırlar [31] . Sn-2 bölge seçici lipazlar 1,3-digliserit ürününü oluşturur. Özgül olmayan lipazlar ise herhangi bir pozisyona seçicilik göstermez. Trigliseritleri tamamen serbest yağ asidi ve gliserole parçalarlar.

Stereo seçici lipazlar, asimetric hidroliz, esterleşme veya trans esterleşme yollarıyla rasemik asit ve alkollerin ayrımını gerçekleştirebilir. Örneğin, *Candida cylindracea* lipazı yüksek stereo seçicilik gösteren bir lipazdır ve kiral alkol, karboksilik ester üretiminde başarı ile kullanılabilir [32].

Lipazlar, yağ asidi zincirinin uzunluğuna göre de özgüllük gösterebilir. *Rhizopus arrhizus* gibi kısa zincirli yağ asitlerini tercih eden lipazlar özellikle yağların işlenmesinde önemlidir [33]. *Ficus carica* lipazı gibi bazı lipazlar ise uzun yağ asitlerine özgüllük gösterir [34].

Bazı lipazlar yağ asidine özgüllük gösterir. *Geotrichum candidum* lipazı, uzun zincirli belli bir tür yağ asidine özgüllük gösterir. Bu enzim 9 pozisyonunda bir cis çift bağ taşıyan uzun zincirli yağ asitlerini hidrolizler. Bu bağı içermeyen doymamış yağ asitleri veya doymuş yağ asitleri trigliseridlerden çok yavaş salınır [35].

1.1.4 Lipazların Ekonomik Önemi ve Endüstriyel Kullanımı

Lipazlar esterleşme, trans-esterleşme, asidoliz ve alkolizis gibi sentez reaksiyonlarını katalizleyebilirler [36]. Bu reaksiyonları gerçekleştirirken yüksek substrat spesifikliğı, enantiyoseçicilik gösterirler ve genellikle kofaktör gerektirmezler [37]. Bu özellikleri lipazların birçok endüstriyel alanda kullanılabilmesini sağlar.

1.1.4.1 Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

Lipazların en önemli kullanım alanlarından biri deterjan endüstrisidir. Deterjan formüllerinde proteaz, amilaz ve selülaz ile birlikte kullanılırlar. Lipazlar kumaşlardaki yağ lekeleri ve bulaşıklardaki yağ kalıntılarının sulu ortamda ve 30-40 derece gibi düşük sıcaklıklarda parçalanıp uzaklaştırılmasını sağlar. Ayrıca sert kimyasalların deterjana katılmasına veya yüksek sıcaklıklara çıkılarak daha fazla enerji harcanmasına gerek kalmaz. Çamaşır ve bulaşık makinelerinde kullanıma

uygun olmaları, kumaşlara yumuşaklık ve esneklik kazandırmaları ve cilt için hafif olmaları gibi avantajları da deterjan endüstrisinde kullanımlarını gittikçe arttırmaktadır [5]. Novozymes (eski adıyla Novo) deterjan endüstrisi için geliştirilmiş ilk lipaz olan Lipolaz®'ı 1988 yılında piyasaya sürmüştür. Daha sonra Novozymes Lipolaz'ın LipoPrime, Lipolaz Ultra ve Lipex olmak üzere 3 yeni genetik olarak değiştirilmiş formunu satışa sunmuştur [38]. Günümüzde lipazın farklı formları dünya çapında birçok deterjanda katkı olarak kullanılmaktadır.

Lipazlar, deterjan dışında yemek artığı veya bitkisel kalıntılarla tıkanan giderlerin açılması için hazırlanan karışımlarda da kullanılmaktadır. Bu formüllerde pektinaz ile birlikte kullanılırlar [39].

1.1.4.2 Gıda Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Lipazların gıda endüstrisinde yaygın kullanımı bulunmaktadır. Süt ürünlerinin işlenmesinde, yumurta sarısının işlenmesinde, lesitin modifiye edilmesinde, yağlarda sakızlaşmanın giderilmesinde kullanılır.

Lipazlar süt ürünlerinin endüstrisinde süt yağının hidrolizi için sıkça kullanılmaktadır. Peynir üretiminde yağ asidi zincirlerinin uzunluklarının değiştirilmesi ve peynir tadının gelişmesi için kullanılır. Örneğin, Rokfor peynirinin kendine has tadı yağ asidi metabolizması ile oluşan metil ketonlarına bağlıdır. *Penicillium roqueforti* lipazı bu ketonların üretimini sağlayarak peynirin tadının oluşmasına katkı sağlar [40]. Ayrıca peynir mayalanmasını hızlandırılması ve tereyağı, yağ ve kremaların işlenmesi ve tadının arttırılması için kullanılırlar [5].

Fırıncılık sektöründe lipazlar ekmek hamurunun kıvamının arttırılmasında ve bisküvi, kek gibi ürünlerinin kalitesinin arttırılmasında kullanılır [41]. Lipaz eklenmiş kek hamurunda gluten ağı genişler ve hacim artar ayrıca kekin kırıntı kalitesi artar [42].

1.1.4.3 Yağ ve Oleokimyasal Endüstrisinde

Spesifik bir yağ asidi kompozisyonu ve pozisyonel dağılımına sahip lipidlerin sağlık üzerine olumlu etkilerinin anlaşılmasından sonra yağların besin değerini arttıracak teknolojilerin geliştirilmesi için çalışmalar artmıştır [43]. Kimyasal ester değişimi

reaksiyonları ile modifikasyonlarda bölgesel seçicilik yoktur. Lipaz katalizli reaksiyonlarla istenilen bir veya daha fazla açıl grubu spesifik bir bölgede değiştirilerek lipidlerin özellikleri değiştirilebilir. Bu sayede daha ucuz ve daha az tercih edilen lipidler daha değerli yağlara dönüştürülebilir [44]. Bu alanda daha çok sn-1,3 bölge seçici lipazları kullanılır. Yapılan bir çalışmada kanola yağı ve kaprilik asit kullanılarak asidoliz reaksiyonu ile orta ve uzun zincirli lipidlerin üretimi için kullanılmıştır. 6 ticari lipaz ile yapılan verimlilik testlerinde *Rhizomucor meihe*'ye ait olan lipaz en yüksek verimi göstermiştir [45]. Başka bir çalışmada Lipozim RM IM enzimi ile palm yağı, çay tohumu yağı ve soya yağı kullanılarak insan sütü yağı muadilinin asidoliz yoluyla üretimi gerçekleştirilmiştir [46]. Önemli bir bitkisel lipaz olan papaya lateks lipazı palm yağından kakao yağı muadilinin üretiminde kullanılmıştır [47]. Metil stearat, etil stearat ve stearik asit ester değişimi reaksiyonlarında açıl donörü olarak kullanılmıştır. En yüksek verim metil stearat kullanılarak 45 °C'de 4 saat gerçekleştirilen reaksiyonla elde edilmiştir.

Oleokimyasallar, petrolden petrokimyasalların üretimine benzer şekilde yağlardan türetilen kimyasallardır. Bu kimyasallar kişisel bakım ürünleri, ev temizlik ürünleri, plastik, boya, biyoyakıt, tekstil vb. alanlarda kullanılmaktadır. Yağ asitleri, mum esterleri, yağ alkoller ve gliserin en çok kullanılan olekimyasallardır [48]. Oleokimyasalların işlenmesinde lipazların kullanımı enerjiden tasarruf sağlar ve ısıya bağlı parçalanmayı önler [1]. Bir oleokimyasal olan biyoyağlayıcılar bitkisel yağlardan elde edilen çevre dostu yağlayıcılardır. *Candida antarctica* immobilize lipaz B'si kullanılarak bir biyoyağlayıcı olan trimetil propan esterlerinin %96 verimle üretimi başarılmıştır. Ayrıca oluşan ürünün kimyasal katalizden daha kaliteli olduğu görülmüştür [49].

Monogliserit ve disgliserit emülgatörler kozmetik ve gıda endüstrisinin de sık kullanılan oleokimyasallardır. Gliserol monostearat bu oleokimyasallardan biridir. Kimyasal olarak yağların yüksek ısıda gliserolizasyonu ile elde edilir ancak verim %40 gibi düşük seviyelerdedir. *Candida antarctica* immobilize lipazıyla yüksek polariteye sahip organik çözücüler kullanılarak gliserol monostearat üretimi denenmiştir. Stearik asit ve gliserolün 40°C'de 6 saatlik esterleşme reaksiyonu sonucu %90 verimle üretim gerçekleştirilmiştir [50].

Vakslar esterleri uzun zincirli yağ asitleri ile uzun zincirli alkollerin esterleşmesiyle oluşan kozmetik sektöründe sık kullanılan önemli oleokimyasallardır. Yağsız süt ürünlerinin kullanımının artmasıyla süt yağının değeri ve kullanımı azalmıştır. Süt yağının kullanım alanını genişletmek amacı ile yapılan bir çalışmada lipaz katalizli alkoliz ile 4 farklı vaks esterinin üretimi denenmiştir [51]. En yüksek verim oleil alkol kullanılarak *Alcaligenes sp.* ve *Chromobacterium viscosum* lipazları ile elde edilmiştir.

1.1.4.4 İlaç Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Tek kiral izomer içeren ilaçların, organik çözücülerde hidroliz, trans-esterleşme ya da aminoliz ile üretimi için lipaz kullanımı çok elverişli bir yöntemdir. Rasemik alkol, ester, asit veya aminlerin kinetik ayrımı ile asimetrik sentez ve prokiral bileşiklerin desimetrisasyonu lipazların uygulama alanlarıdır [52].

Serratia marcescens lipazı, yüksek enantiyo seçicilik gösterir ve tran-3-(4-metoksifenil) glisidik asit metil esterinin asimetrik hidrolizini katalizler. Bu reaksiyon sonucunda bir damar genişletici olan diltiazem sentezi için önemli bir ara ürün oluşmuş olur [53]. İbuprofenin, S enantiyomeri R'ye göre 160 kat daha aktiftir. Bu nedenle rasemik karışımlardan S enantiyomerinin saf elde edilmesi önemlidir. *Candida* türlerine ait lipazlar ile transesterifikasyon yoluyla (S)-ibuprofenin enantiyo seçici sentezinin optimizasyonu için çok sayıda çalışma vardır [54], [55],[56].

1.1.4.5 Biyodizel Üretiminde Lipazların Kullanımı

Biyodizel, yağ ve alkolden elde edilen mono alkil ester gruplarından meydana gelir. Yapısı petro dizele benzer ama emisyon değerleri daha düşüktür. Bitkisel yağlar, hayvansal yağlar veya atık yağlardan biyodizel üretimi mümkündür. Kimyasal üretimde reaksiyonlarda katalizör olarak NaOH ya da KOH kullanılır. Bu da istenmeyen bir yan ürün olarak sabun oluşumuna sebep olur. Lipaz ile trans-esterleşme gerçekleştirildiğinde ise sabun oluşmaz ve reaksiyon koşulları yumuşaktır [57].

Lipaz kullanarak biyodizel üretilmesi üzerine çok sayıda çalışma vardır. *Candida rugosa* lipazı [58], *Rizomucor miehei* lipazı [19], *Candida antarctica* lipazı

[19],[59],[60], hint yağı lipazı [19], hintfıstığı lipazı [57],[61], *Thermomyces lanuginosa* lipazı [62], *Rhizopus oryzae* lipazı [63] bugüne kadar denenmiş lipazlardan bazılarıdır. Maliyeti düşük ve besin kaynakları ile yarışmayacak yağlar ve daha verimli lipazlar bulmak için araştırmalar sürmektedir.

1.1.5 Lipaz Kaynakları

Lipazlar, tüm canlı gruplarında bulunan enzimlerdir. Lipazlarla ilgili ilk çalışmalar çoğunlukla memeli lipazları üzerinedir. Pankreas gibi sindirim sistemine ait lipazlar izole edilerek insan sindirim sistemindeki etkileri araştırılmıştır [64], [65]. Günümüzde en çok araştırılan ve endüstride en çok kullanılan bakteri ve fungus lipazlarıdır.

1.1.5.1 Hayvansal Lipazlar

Hayvanlara ait pankreas ve pregastrik doku lipazları ticari olarak üretilen enzimler arasındadır. Hayvan lipazları genellikle sn-1 ve sn-3 pozisyonlarına spesifiktir [66]. Klasik pankreatik lipazlar yaklaşık 50 kDa büyüklüğünde sindirim enzimleridir ve koyun, domuz, sığır, at, deve, tavuk köpek ve insandan izole edilmiştir [67]. Hayvansal lipazların bazıları pankreatik lipaz eksikliğinde takviye olarak kullanılmaktadır [68]. Sığır, keçi ve kuzulardan izole edilen lipazlar, peynir olgunlaşması ve tat oluşumunda ve ayrıca tereyağı, krema üretiminde kullanılmaktadır [69].

1.1.5.2 Mikrobiyal Lipazlar

Bakteriyel lipazların varlığı *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* ve *Bacillus fluorescens* bakterilerinde 1901 yılında Eijkmann tarafından keşfedilmiş ve günümüze kadar çok sayıda bakteriden lipazlar elde edilmiştir. 1999 yılında yapılan bir çalışmada filogenetik analizlerle bakteriyel lipazlar sekiz aile altında toplanmıştır [70]. Günümüzde yeni keşfedilen lipazlarla bu sayı on yediye kadar ulaşmıştır [71], [72], [73].

Bakteriyel lipazlar ilaç, deterjan, deri, tekstil, kağıt ve biyodizel gibi birçok endüstride kullanılmaktadır. Geniş kullanım alanları nedeniyle yeni lipazlar için arayışlar devam etmektedir. Farklı özelliklere sahip lipaz arayışında yüksek

sıcaklığa [74], [75], tuza [76], şekere[77] dayanıklı ekstremofilik bakterilere ait lipazlar araştırılmaktadır.

Fungal lipazlar, bakteriyel lipazlar yanında endüstride en çok tercih edilen lipazlardandır. *Aspergillus* [78], [79], *Penicillium* [80], *Rhizopus* [81], *Candida* [82] türlerine ait lipazlar en çok çalışılan fungal lipazlardandır. Fungal lipazlar genellikle hücre dışına salındıkları için saflaştırılmaları kolaydır [83]. Bu enzimler 4-8 pH aralığında optimum pH'ya sahiptir [84]. Optimum çalışma sıcaklıkları genelde 25-30°C olsa da ekstrem termofilik funguslardan da 45-55°C arasında çalışan lipazlar izole edilmiştir [84]. Fungal lipazlar, peynir endüstrisinde [85], yağlı atıkların bioremediyasyonunda [86], ester sentezi [87], biyodizel üretimi [88] gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır.

1.1.5.3 Bitkisel lipazlar

Bitkilerde triaçilgliseroller temel yağ deposudur, tohumlarda ve yaprak mezofilinde yağ cisimcikleri halinde bulunurlar. Yapraktaki lipit cisimcikleri çoğunlukla kloroplastta bulunur ve kloroplast triaçil gliserolleri ile tohum triaçil gliserollerinin yağ asidi kompozisyonu oldukça benzerdir [89]. Lipazlar bu triaçil gliserolleri hidrolize ederek bitkilerde önemli fizyolojik rollerde görev alırlar. Çimlenme öncesinde tohum lipazları genellikle inaktiftir, tohum çimlenirken ise ilk olarak lipazlar aktive olarak depo yağlarını hidrolizler [90]. Yaprak dökümü sırasında hücre membranlarının parçalanması lipazların önemli başka bir görevidir [91], [92]. Bazı lipazların kuraklık [93], patojen saldırısı [94] ve UV stresi [95] gibi streslere cevap mekanizmalarında rol aldıkları gösterilmiştir. Fizyolojik rolleri dışında bitki lipazları esterleşme reaksiyonlarındaki yüksek kullanım potansiyelleri ile dikkat çekmektedirler [96],[97]. Bununla beraber bitkisel lipazlar üzerine az sayıda çalışma vardır. Bitkisel lipazların listesi Tablo1.2'de verilmiştir.

En çok çalışılan lipazlar tahıl lipazları, yağlı tohumlara ait lipazlar ve lateks lipazlarıdır. Tahıllar üzerine yapılan çalışmalarda saklama koşullarında tohumdaki lipaz aktivesinin engellenmesi hedeflenmiştir [98], [99], [100]. Buğday, arpa, yulaf unlarında lipazların aktive olması ile yağlar parçalanarak oksidatif bozulmaya sebep olmaktadır [98], [100], [101].

Pirinç lipazları üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Pirinç tohumu kabuğundan 361 amino asitlik peptid kodlayan 1445 bp uzunluğunda bir cDNA klonlanmıştır (GenBank ulaşım no AY580163) [102]. Bu lipaz, tam uzunlukta kodlayıcı cDNA'sı klonlanan ilk bitkisel lipaz olmuştur. Biyoinformatik analizler dizinin GXSXG motifini taşıdığı ve memeli lipazları ile mikrobiyal lipazlara benzerliğinin düşük olduğu göstermiştir. *E.coli*'de pET21b ekspresyon vektörü kullanılarak BL21 hücrelerinde yapılan ekspresyon sonucunda 40 kDa'lık bir protein elde edilmiştir. Farklı yağlarla yapılan aktivite testleri sonucu enzimin tribütirin ile en yüksek aktivite verdiği görülmüştür.

Pirinç kepeğinden lipaz 1 [103] ve lipaz 2 [104] pürifiye edilmiştir. Lipaz 1, sn-1,3 özgülüğü gösteren 40 kDa büyüklünde bir proteindir. Lipaz 2'nin büyüklüğü 33 kDa'dır. Optimum pH'sı 7,5-8 arasında olduğu ve optimum çalışma sıcaklığının 27°C olduğu görülmüştür. Lipaz 2'nin cDNA'sı daha sonraki bir çalışmada klonlanmış ve *E.coli* ve *Pichia pastoris*'te ekspresyon çalışmaları yapılmıştır [7]. *E.coli* 'ye ait BL21(DE3)pLysS, RIL(DE3)pLysS, Rosetta(DE3) pLysS ve Origami(DE3)pLysS suşlarında yapılan ekspresyon denemelerinde inklüzyon cisimcikleri oluşmuş ve lipaz aktivitesi görülmemiştir. *Pichia pastoris* X33 suşunda pPICZαA vektörü kullanılarak yapılan ekspresyon denemelerinde 72 saatte maksimum ekspresyon görülmüştür. Rekombinant lipaz 2'nin triasetin ile aktivitesinin saflaştırılan doğal forma göre 4 kat fazla olduğu görülmüştür. Enzimin kısa zincirli yağ asitlerini uzun zincirliye göre daha fazla tercih etmektedir.

Pirinç kepeği ile yapılan başka bir çalışmada ise veri tabanlarında bulunan pirinçle ilişkilendirilen 125 putatif lipaz dizisi taranarak seçilen AK099612 cDNA'sı klonlanmıştır [105]. Yapılan tüm denemelere rağmen bu lipazın *E.coli*'de ekspresyonu gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle cDNA'nın *Pichia pastoris* X33 hücrelerinde pPICZαA vektörü kullanılarak ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE jellerinde ekspresyonu artan bantlar tespit edilemediği için zimogram yapılmıştır. MUF bütirat kullanılarak yapılan zimogram analizleri lipaz aktivitesinin zamanla arttığı ve 72 saatte en yüksek olduğu görülmüştür. Saflaştırma sonrası SDS jelde proteine ait bant *P.pastoris*'te translasyon sonrası glikozillenme nedeniyle

beklenenden büyük çıkmıştır. Deglikolizasyon sonrası bant boyutu 50 kDa'dan 35 kDa 'ya inmiştir.

Tablo 1.2 Bitkisel Lipazlar

Kaynak	Lipaz türü	Optimum pH	Sıcaklık	Substrat	
Hint yağı tohumu	GXSXG	pH 4,5	30°C	Kısa ve orta uzunluktaki yağ asitleri	[106], [107]
Hint yağı tohumu		pH 9,0	30°C	Monoaçil gliserol	[108]
	GXSXG			Kısa yağ asitleri	[102]
Pirinç kepeği	GXSXG				[105]
	GXSXG	pH 7,4	25°C	Kısa yağ asitleri	[7]
Kolza tohumu	GXSXG				[27]
(Stres)	GXSXG				[89]
Papaya lateksi	GXSXG	pH 8,5	35 ° C	Uzun zincirli yağ asitleri	[109]
Domates tohumu	GXSXG	pH 8,0	25°C	Uzun zincirli yağ asitleri	[110]
Beyaz kavun tohumu		pH 5,9	37°C		[111]
		pH 7,5	37°C		
Akdeniz Defnesi tohumu		pH 8,0	50°C		[112]
Biber yaprak (stres)	GDSL			Kısa ve uzun yağ asitleri	[113]

Yabani karanfil petal (senesens)	GXSXG	Uzun zincirli yağ asitleri	[91]
Arabidopsis	GDSL		[26]
Zeytin meyve	pH 8,5	35°C	[114]
	pH 5	35°C	[115]
Sorgum	pH 7		[116]

Yağlı tohumlara ait lipazlar endüstriyel potansiyel açısından dikkat çekmektedir. Tohum lipazlarının substrat spesifiteleri genellikle yüksektir ve esterleşme, ester değişimi reaksiyonlarını gerçekleştirebilirler [27].

Dormant kolza tohumlarında lipaz aktivitesi çok düşüktür, ancak çimlenme ile aktivitede ciddi bir artış görülmüştür [117]. Enzimin farklı substratları farklı miktarlarda hidrolize ettiği görülmüştür. En yüksek aktiviteyi tributirinle göstermiştir. Triasetin ve zeytinyağıyla da orta düzeyde aktivite vermiştir. Kolzada yapılan başka bir çalışmada da çimlenen tohumdan saflaştırılan lipazın optimum çalışma sıcaklığının 37°C ve optimum pH'sının 7.0 olduğu belirlenmiştir [118]. 2016 yılında, kolzadan GXSXG motifini içeren iki farklı lipaz klonlanmıştır [89], [27]. Bu lipazlardan biri olan BnDIL1 kuraklık stresi ile indüklenmektedir. Okuma çerçevesi 1878 kb uzunluğundadır. *Saccharomyces cerevisiae*'de klonlanan cDNA'nın ekspresyonu yapılarak üretilen proteinin lipaz aktivitesi doğrulanmıştır. Gerçek Zamanlı PZR analizleri ile BnDIL1'in hem yavaş hem de hızlı kuraklık stresinde aktive olduğu görülmüştür [89]. Klonlanan diğer kolza lipazı BnLIP 1581 baz çifti uzunluğunda olup 526 amino asitlik bir polipeptid kodlamaktadır. Yapılan Ters Transkripsiyon PZR analizleri bu genin yalnızca çimlenen tohumda aktif olduğunu göstermektedir. Bu sonuç bu lipazın tohumda depolanan yağların hidrolizinden sorumlu olduğunu göstermektedir [27].

Hintyağı tohum lipazı, varlığı 1890 yılında keşfedildiğinden beri en çok çalışılan ve dikkat çeken bitki lipazlarından [119]. Lipazlar genelde tohum çimlenmesinde aktive olurken hintyağı asidik lipazı tohumlar dormantken aktiftir [120], [107]. Enzim pH 4,2'de optimum çalışmaktadır ve fungal lipazlara benzerlik göstermektedir. Asidik lipazın tam uzunluktaki cDNA' sını klonlanmış ve yaklaşık 60 kDa boyutunda olan enzimin GXSXG motifini içerdiği gösterilmiştir [107]. Hintyağı tohumu asidik lipazının, yağ asidi ile gliserolün esterleşmesini katalizleyebildiği [121], *Acrocomia aculeata* yağından biyodizel üretimi ve palm yağından biyolubrikant üretiminde [120] kullanılabildiği gösterilmiştir. Hintyağı tohumlarında asidik lipaz dışında çimlenmeden sonra aktive olan pH 9'da aktivite gösteren alkali bir lipaz daha mevcuttur [108]. Bu lipazın soya yağı, kanola yağı gibi bitkisel yağların hidrolizi ile serbest yağ asidi üretimi için de umut verici bir katalizör olduğu görülmüştür [122].

Biyoteknolojik olarak dikkat çeken diğer bir lipaz papaya lateks lipazıdır. Papaya lipazı ilk olarak 1935 yılında rapor edilmiştir ancak hidrolitik aktivitesi 1990'ların başında karakterize edilmiştir [123]. Papaya lipazının lateksten izolasyonu için yapılan çalışmalar başarısız olmuştur. Bu nedenle enzim "kendiliğinden immobilize lipaz" olarak anılmaktadır [124]. Yapılan çalışmalar bu enzimin hidroliz reaksiyonlarında 1-3 bölgesel seçiciliği gösterdiği ve sn-3 pozisyonuna stereo seçicilik gösterdiği bulunmuştur [125]. Enantiyoseçiciliği sayesinde rasemik karışımların ayrılmasında kullanılabilmektedir [126]. Lipid modifikasyonları ile ilgili çalışmalarda da papaya lipazının kullanılabileceği görülmüştür [127], [128]. Bebek mamaları için insan sütü benzerlerinin üretilmesi bu alandaki en önemli kullanımlarında biridir [129]. Enzimin lateksten izolasyonu başaramadığı için klonlanması ve farklı host sistemlerinde ekspresyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. *Carica papaya* lipaz 1'i kodlayan DNA klonlanmış ve *Pichia pastoris*'te eksprese edilmiştir. Bu enzimin GXSXG ailesine ait olduğu ve pH 8,5'de 35°C sıcaklıkta en iyi aktivite gösterdiği belirlenmiştir [109]. Diğer bir çalışmada da *Carica papaya* lipaz 2'yi kodlayan DNA klonlanmış ve *Nicotiana benthamiana* bitkisinde transient ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Bu lipaz ise GDSL ailesine ait olduğu ve kısa zincirli yağ asitlerine spesifite gösterdiği belirlenmiştir [130].

Çimlenen susam tohumlarından elde edilen özütlerdeki lipolitik aktivite pH7-8,5 arasında pH'dan etkilenmeden gerçekleşmektedir. Susam lipazları doymuş yağ asitlerinin hidrolizini 38 °C'de ve çoklu doymamış asitlerinin hidrolizini 36°C'de en yüksek aktivitede gerçekleştirebilmektedir [131].

1993 yılında Olias tarafından zeytin meyve özütünde lipolitik aktivite varlığı gösterilmiştir. Özütteki lipaz aktivitesi pH 8-9 dar bir aralıkta gerçekleşmektedir. Bu aralık dışında enzi aktivitesi %20'den azdır. Optimum pH ise 8,5 olarak bulunmuştur [114]. 2010 yılında ise Panzanaro zeytin meyve mezokarpında asidik bir lipaz varlığını göstermiştir. Asidik lipazın optimum pH'sı 5 ve optimum sıcaklığı 35°C olarak bulunmuştur [114]. Bu bilgiler zeytinden birden fazla lipaz olduğunu düşündürmektedir.

1.1.6 Stres Cevap Mekanizmalarında Lipazların Görevi

Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı lipazlar ve lipaz benzeri proteinlerin bitkilerdeki strese cevap mekanizmalarında rol aldıklarını göstermektedir.

Bitkiler, hareketsiz canlılar oldukları için sürekli abiyotik ve biyotik strese maruz kalırlar. Bu nedenle bitkilerde stres cevap mekanizmaları çok önemlidir. Çeşitli stresler karşısında Ca^{*2} , protein kinaz, jasmonik asit sinyal mekanizması ve lipid sinyal mekanizmaları uyarılır [132]. Jasmonik asit ve esterleri, bitki sinyal mekanizmalarında önemli bir yer alır. Bu maddeler, linolenik asitten türetilir. Linoleik asit ise hücre zarı veya kloroplast zarındaki fosfolipitlerden lipazlar yardımı ile salınır [133]. Stresle indüklenen lipazlar sinyal yolundaki ilk enzimdir.

Arabidopsis'te patojenle saldırısı ile indüklenen lipazların, jasmonic asit yolağından bağımsız olarak etilen ve salisilik asit sinyal mekanizmasını indükledikleri görülmüştür [134], [135]. Arabidopsis GDGL lipaz 1'i sistemik sinyal mekanizmasını tetiklemenin yanında antimikrobiyal etki ile fungal sporun bütünlüğünü bozmaktadır [134]. Yeşil şeftali afidi ile indüklenen Arabidopsis lipazı (MPL1) seviyesi afid saldırısı ile hızla artar. GXSG motifini içeren MPL1, petiyolde antibiyotik birikiminin artması için de gereklidir [136]. Bu lipazın triolein ve tributirat trigliseritleri ile fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin phosphatidylinositol fosfolipidlerine karşı aktif olduğu gösterilmiştir.

Lipazlar tuz, kuraklık ve UV stresi gibi abiyotik streslere karşı cevap mekanizmalarında da rol almaktadır. LiCl toleranslı *Arabidopsis thaliana* lipazının over ekspresyonu ile ilgili bir çalışmada transgenik bitkinin tuz toleransının artmasını sağladığı gözlemlenmiştir [137]. Kuraklık stresi ile indüklenen *Brassica napus* lipazının karakterizasyonu için yapılan çalışma, genin tüm organlarda ve özellikle tohumlarda kuraklık stresi ile ekspresyonunun arttığını göstermiştir [138]. Arabidopsis bitkisi öldürücü seviyenin altında UV-B radyasyonuna maruz bırakıldığında UV-B ile indüklenen lipaz üretimini şiddetle artmıştır [139].

1.1.7 Zeytin

Olea europaea L. (zeytin), 29 cins ve 600 türü altında barındıran Oleaceae ailesine ait bir türdür. Anavatanın, Suriye ve Güneydoğu Anadolu'yu içine alan Güneybatı Asya ve Yukarı Mezopotamya olduğuna inanılmaktadır [140].

Ilıman iklim bitkisi olan zeytin 30-45° enlemleri arasında yayılışı her gösterir. Akdeniz iklimine iyi uyum sağlamıştır. Düşük besin seviyesine sahip sıg ve taşlı topraklarda yetişir ve uzun kuraklık dönemlerine dayanıklıdır [141]. Türkiye, İspanya, İtalya, Yunanistan, Portekiz, Suriye, Fas, Cezayir gibi Akdeniz Havzası ülkelerinde yetiştirilen ve ticareti yapılan önemli bir üründür. Akdeniz havzası dışında Portekiz, Batı Afrika, ABD, Avustralya, Azerbaycan ve Çin'de kültürü yapılmaktadır [142].

Zeytin, kültüre alınan en eski meyve ağaçlarından biridir ve önemli bir yağ kaynağıdır [142]. Sağlıklı üzerine olumlu etkileri ile bilinen zeytin ve zeytinyağı, antik çağlardan beri en sağlıklı diyetlerden biri olan Akdeniz diyetinde önemli bir yer oynamaktadır. Sağlıklı beslenmeye artan ilgi nedeniyle özellikle zeytinyağına olan talep dünya genelinde gittikçe artmaktadır. Yapılan çalışmalar da zeytinyağının içerdiği antioksidan ve fenolik bileşikler ile kalp ve damar sağlığını koruyucu [143], tansiyon düşürücü etkisi [144], ibuprofen benzeri inflamasyon karşıtı etkisi [145], kanser karşıtı etkileri [146] olduğunu göstermektedir. Zeytinyağına göre az bilirse de zeytin yaprağı da alternatif tıpta antik çağlardan beri kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar zeytin yaprağı özütlerinin antioksidan, inflamasyon karşıtı ve antimikrobiyal etkileri olduğunu göstermektedir [147].

Zeytinin kültür formu olan aşılı zeytin "*Olea europaea* L. var. *europaea*" ve yabani form olan delice de denilen "*Olea europaea* L. var. *sylvestris*" olmak üzere iki formu bulunur. Aşılı zeytin, yabani formundan türetilmiştir [148]. Türkiye florasında, her iki zeytin formu da kayıtlıdır [143]. Yabani zeytin ve kültür formları aynı kromozom sayısı sahiptir ($2n=46$) [149]. Bununla beraber kültür genomik dizileme çalışmaları yabani formun genomunun kültür formlarından daha büyük olduğunu, fakat gen sayısının daha az olduğunu göstermektedir [150],[151],[152]. Kültür formlarının arasındaki genetik çeşitlilik de yüksektir [153].

1.1.8 Zeytin ve Stres

Akdeniz ikliminde yazlar sıcak ve kurak geçer. Akdeniz iklimde büyüeyebilen bitkiler bu şartlara uyum sağlamak ve hayatta kalabilmek için bazı morfolojik, anatomik ve fizyolojik mekanizmalar geliştirmiştir [154]. Zeytin, bu iklime uyum sağlamış bir bitki olarak çeşitli strese dayanıklılık mekanizmaları geliştirmiştir. Ozmotik düzenleme, kuraklığa karşı mekanizmalardan biridir. Hücreler, çözünebilir maddeler üretilip biriktirerek turgor basıncını artırır ve böylece su alımı artar [155]. Yapraklarda meydana gelen anatomik değişiklikler de kuraklık toleransına katkı sağlar. Susuzluk durumunda, yaprakları boyutunda azalma, yaprak hücrelerinin yoğunluğunda artış, yapraklardaki tüy ve stoma sayısında artış gözlenir [156].

Zeytinin maruz kaldığı diğer bir stres tuz stresidir. Sıcaklığa bağlı yüksek buharlaşma ile toprakta biriken tuz miktarı artar. Bazen de kısıtlı kullanım suyu nedeniyle zeytinler tuzlu su ile sulanır. Kültivarlar arasında farklılıklar olmakla beraber zeytin ağaçlarının tuza toleransı orta seviyededir [157]. Kök seviyesinde tolerans mekanizmalarından biri tuzun içeri girmesinin engellenmesidir. Kök hücrelerinde biriktirilen glikolipit, fosfolipit ve sterol kapasitesine bağlı olarak tuzun içeri girmesi engellenir [158]. Olgun yapraklarda biriktirilip atılma yoluyla da tuz ve diğer toksik maddeler uzaklaştırılabilir [159].

Zeytin ağaçları her dem yeşil ılıman iklim bitkisi oldukları için soğuğa karşı hassastır. $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altında ağaçlar ölür ve -7°C 'nin altında don hasarına uğrar [160]. Bununla beraber soğuk olgunlaşma sonrası evreyi uzattığı için zeytinyağı kalitesi atar. Bu nedenle zeytinin soğuğa dayanıklılığını arttırabilmek ekonomik

açından önemli olacaktır [161]. Zeytinin soğuğa dayanıklılığında Ca^{+2} miktarının önemli olduğu görülmüştür. Genç yapraklar yaşlı yapraklara göre soğuğa daha hassastır. Yaprak yaşlandıkça Ca^{+2} miktarının arttığı görülür [162].

1.1.9 *Pichia pastoris* Ekspresyon Sistemi

Pichia pastoris, ekspresyon sistemi heterolog protein üretimi için en sık kullanılan maya ekspresyon sistemidir. Beş yüzü aşkın rekombinant protein *P.pastoris* ekspresyon sisteminde başarıyla üretilmiştir [85]. Bakteriyel ekspresyon sistemlerine göre minimal besi yerinde yüksek hücre yoğunluğunda üreme, rekombinant proteinin hücre dışına salınabilmesi ve bu sayede saflaştırmanın kolaylaşması gibi avantajları vardır [109]. Ayrıca ökaryotik olduğu için protein katlanması, proteolitik proses, disülfid köprülerinin oluşumu ve glikolizasyon gibi post translasyonel modifikasyonların birçoğunu gerçekleştirebilir [163].

Metilotrofik bir maya olan *P.pastoris* metanolü karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. AOX1 promotörü metanol metabolizmasındaki AOX1 ve AOX2 genlerinin ekspresyonunu kontrol eder. Bu promotor glukoz ve gliserol varlığında baskılanırken metanol varlığında kuvvetli bir şekilde indüklenir. Bu nedenle AOX1 promotörü ile ilişkilendirilen vektör sistemleri sık olarak kullanılmaktadır [164].

1.2 Tezin Amacı

Lipazlar, çok sayıda endüstriyel alanda kullanılan enzimlerdir. En çok araştırılan ve kullanılan lipazlar mikrobiyal lipazlardır. Yapılan çalışmalar farklı ve ilgi çekici özelliklere sahip bitkisel lipazların varlığını göstermiştir. Aynı bitki çok farklı karaktere sahip birden fazla lipaz içerebilmektedir. Bazı bitkisel lipazlar, yüksek substrat özgüllüğünü ile dikkat çekmektedir ve endüstriyel kullanım potansiyeline sahiptirler. Bununla beraber bitkisel lipazlar ve karakterizasyonları ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu tezin amacı, zeytin bitkisinin yapraklarından lipaz kodlayan genlerin klonlanması ve karakterizasyonudur. Bu sayede zeytin yaprak lipazının endüstriyel kullanım potansiyeli hakkında fikir sahibi olunması hedeflenmiştir. Ayrıca bu lipazın soğuk stresi ile ilişkisi araştırılacaktır. Heterolog ekspresyon çalışmaları ile de enzimin rekombinant üretim koşulları ve aktivitesi araştırılacaktır.

1.3 Hipotez

Zeytin, ekonomik değeri yüksek bir yağ bitkisidir. Meyveleri yağ üretimi için ve besin olarak kullanılmaktadır. Yağ bitkilerinin tohumlarına ait lipazlarla yapılan çalışmalarda ilgi çekici özelliklere sahip lipazlar görülmüştür. Bununla beraber lipazlar genelde dormant tohumlarda inaktiftir, çimlenme sırasında aktive olurlar. Zeytin meyve özütlerinde lipazlar aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda asidik ve bazik iki farklı aktivite görülmüştür. Bu durum birden fazla zeytin lipazı olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu lipazlar klonlanmamış ve karakterize edilmemiştir. Zeytin yaprak lipazlarına yönelik bir çalışma ise literatürde mevcut değildir. Bu çalışma ile ilk kez zeytin yaprak lipazına ait bir cDNA tam uzunlukta klonlanacak ve karakterize edilecektir. Soğuk stresinde lipazın ekspresyon düzeyi analiz edilecektir. Elde edilen bilgiler diğer lipazlarla karşılaştırılarak zeytin yaprak lipazının endüstriyel kullanım potansiyeli araştırılacaktır.

2.1 Tamponlar ve Çözeltiler

Deneyler sırasında kullanılan tampon ve çözeltiler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1 Kullanılan tampon ve çözeltiler

TBE çözeltisi (10 X)	108 g Tris bazı, 55 g Borik asit, 40 ml 0.5M EDTA (pH 8.0) karıştırılıp 1 L distile suya tamamlandı.
10X YNB (%13,4 Amonyum sülfat içeren Amino asit içermeyen Maya Azot Bazı)	13,4 g YNB 100ml su içerisinde çözüldü. 0,22µm şırınga ucu filtre ile steril edildi.
10X D (%20 Dekstroz)	20 g Dekstroz 100 ml’ye distile su ile tamamlandı. 0,22µm şırınga ucu filtre ile steril edildi.
10X M (%5 Metanol)	5 ml Metanol 100 ml’ye distile su ile tamamlandı. 0,22µm şırınga ucu filtre ile steril edildi.
10X GY (%10 Gliserol)	10 ml Gliserole 90 ml distile su eklendi. Otoklavlanarak steril edildi.
500X B (Biotin)	2 mg Biotin 10 ml distile suda çözdürüldü. 0,22µm şırınga ucu filtre ile sterilizasyonu yapıldı.
200 mM Lityum Asetat Tamponu	41 mg LioAC dihidrat 20 mg SDS ile 2 ml distile suda çözdürüldü.
Tris-Glisin SDS-PAGE Yürütme Tamponu (pH 8.3)	1.5 g Tris-Base, 7.2 g Glisin 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. pH 8.3’e ayarlandı.

50 mM Potasyum Fosfat Tamponu pH 7	30,75 ml K ₂ HPO ₄ , 19,25 ml KH ₂ PO ₄ karıştırılarak 1 litreye distile su ile tamamlandı. pH 7'ye KOH ile ayarlandı.
%10 (APS) Amonyum Persülfat	100 mg APS 1 ml distile suda çözüldü.
%10 SDS	10 g SDS, 100 ml distile suda çözüldü.
SDS-PAGE Boyama Solüsyonu	125 mg CBB, 200 ml Metanol, 35 ml Asetik asit birleştirilip, son hacmi 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.
SDS-PAGE Boya Yıkama Solüsyonu	200 ml Metanol, 35 ml Asetik asit, son hacmi 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

2.2 Besi yerleri

Deneylerde kullanılan besiyerlerinin içerikleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2 Kullanılan besiyerlerinin içerikleri

LS-LB (Düşük Tuz İçerikli Luria Bertani)	10 g Tripton, 5 g Maya özütü, 5 g Sodyum Klorür, 15 g Agar 1 litre distile suya tamamlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.
SOB (pH 7.0) (Süper Optimal Brot)	%2 Tripton, %0.5 Maya Özütü, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ içeriği hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.
SOC (Glukoz içeren Süper Optimal Brot)	49 ml SOB'ye, 1 ml steril 1 M Glukoz solüsyonu eklendi.
YPDS (Maya Özütü Pepton Dekstroz Sorbitol)	%1 Maya özütü, %2 Pepton, 1 M Sorbitol, %2 Agar 450 ml'ye distile su ile tamamlanıp 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 50 ml 10X D eklendi.

YPD Agar (Maya Özütü Pepton Dekstroz Agar)	%1 Maya özütü, %2 Pepton, %2 Agar 450 ml'ye distile su ile tamamlanıp 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 50 ml 10X D eklendi.
BMGY Besiyeri (Tamponlu Gliserol Kompleksi)	%1 Maya özütü, %2 Pepton otoklavlandıktan sonra ayrıca steril edilen YNB %1.34, Gliserol %1, Biotin 4mg/L, pH 6.0 Potasyum Fosfat Tamponu 100 mM olacak şekilde steril şartlar altında eklendi.
BMMY Besiyeri (Tamponlu Metanol Kompleksi)	%1 Maya özütü, %2 Pepton otoklavlandıktan sonra ayrıca steril edilen YNB %1.34, Metanol %1, Biotin 4mg/L, pH 6.0 Potasyum Fosfat Tamponu 100 mM olacak şekilde steril şartlar altında eklendi.

2.3 Bitki Materyali

Olea europaea L. Gemlik Kültivarına 1 yaşındaki fidanları Türkiye Cumhuriyeti Tarım Bakanlığı Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

2.3.1 Bitki Büyütme Koşulları

Olası zirai ilaç kalıntılarının uzaklaştırılması için zeytin fidanlarının yaprakları distile su ile yıkandı ve fidanlar temiz saksılara dikildi. Ortam koşullarına uyum sağlamaları için bir hafta süreyle 22 °C'de, 14 saat gündüz / 15 °C'de, 10 saat gece periyodunda, gündüz 150 µmol M2s-1 ışık, gece ise karanlık olacak şekilde tutuldular.

Bu sürenin sonunda fidanlara 4 °C'de 14 saat gündüz / 2 °C'de 10 saat gece periyodunda, gündüz 150 µmol M2s-1 ışık, gece ise karanlık olacak şekilde 10 gün süreyle soğuk stresi verildi.

2.3.2 Bitki Örneklerinin Alınması

Kontrol yaprak örnekleri stres verilmeden hemen önce bitkiden alınıp, sıvı azot içerisinde donduruldu ve -80 °C'de saklandı. Daha sonra sırası ile 15 dakika ve 30

dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, bir gün, bir hafta ve on gün sonunda yaprak örnekleri alınıp, sıvı azot içerisinde donduruldu ve -80 °C'de saklandı.

2.4 RNA İzolasyonu

2.4.1 Ribonükleaz (RNaz)' ların Uzaklaştırılması

Ribonükleaz (RNaz) enzimleri biyolojik ortamlarda çok miktarda bulunan ve RNA moleküllerini parçalayan enzimlerdir. RNA'ların tam uzunlukta ve yüksek kalitede izole edilebilmesi için ortamdan RNaz'ların uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle RNA izolasyonunda kullanılacak havan, havaneli, tüm cam ve plastik malzemeler % 0,1'lik DEPC'li su içerisinde bir gece bekletildi ve 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı. Ayrıca izolasyonda kullanılacak tüm solüsyonlara % 0,1 oranında DEPC eklenip bir gece boyunca bekletildi ve 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı.

2.4.2 Bitki Örneklerinden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için yaklaşık 100 mg olan bitki örnekleri, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içerisinde ezilerek toz haline getirildi. Toz halindeki örnekler 2 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Kullanılan örnek ağırlığının % 10' u olacak şekilde Trizol Reagent ilave edildi. Nükleoprotein komplekslerinin ayrışması için oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve tüpler vortekslendi. Trizol Reagent miktarının %20'si kadar kloroform eklendi. 15 saniye kuvvetlice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2- 3 dakika bekletildi. Daha sonra 12000 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda RNA'yı içeren üst faz ayrı bir tüpe alınarak kullanılan Trizol Reagent miktarının %50'si kadar izopropanol eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üst faz alınarak, 12000 xg hızda 4 °C' de 20 dakika santrifüjlenerek RNA çöktürüldü.

Süpernatant uzaklaştırılarak RNA pelletinin üzerine başta kullanılan Trizol Reagent miktarı kadar %75'lik etanol eklenip, 7500 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet şeffaflaşınca kadar kurutuldu. Kuruyan pellet 100 µl DEPC'li su eklendi ve 10 dakika 65 °C' de bekletilip çözündürüldü. RNA örnekleri kullanılabilecek kadar -80 °C' de saklandı.

2.4.3 Total RNA Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları UV nanospektrofotometre ile 260 nm dalga boyunda absorbansının belirlenmesi ile ölçüldü.

2.4.4 RNA'ların Formaldehit Jeli Üzerinde Analizi

2.4.4.1 Formaldehit Jeli Hazırlanması

Elektroforez cihazına ait tüm aparatlar DEPC'li su ile yıkanarak temizlendi. % 1'lik formaldehit jelinin hazırlanışı için 0,8 gram Agaroz (Applichem), 16ml 5X MOPS, 50 ml su ile çözüldü. Jel karışımı 60 °C'ye soğutuldu ve önceden 60 °C'de ısıtılmış 14 ml formaldehit ile karıştırılıp jel tepsisine döküldü.

2.4.4.2 Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması

Örnekler jele yüklemek için hazırlanırken 2,5 µl RNA'ya, 2 µl DEPC'li su, 2 µl 5X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 1 µl Etidyum bromür ilave edildi ve 55 °C'de 15 dakika bekletildi. Bu karışıma 2 µl yükleme tamponu ilave edilerek jele yüklendi.

Total RNA'lar 1×MOPS tank tamponu olarak kullanılarak 60 V'da 90 dakika yürütüldü ve UV altında görüntülendi.

2.4.5 RNA Temizleme

Trizol kullanılarak izole edilen RNA'lara Qiagen RNeasy Plant Mini Kit kullanılarak temizleme işlemi uygulandı. Uygulama kit prosedürüne uygun olarak yapıldı.

200 ml DEPC'li suda çözülen RNA'lara 350 ml RLT tamponu eklenerek karıştırıldı. 200 ml %100 etanol eklenerek RNeasy Spin Mini kolonlarına aktarıldı ve 15 saniye 8000 xg'de santrifüj edildi. Süzüntü uzaklaştırılarak 500 ml RPE tamponu eklendi ve 15 saniye 8000 xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süzüntü uzaklaştırılarak RPE tamponundan tekrar 500 ml eklenerek 2 dakika santrifüj edildi. Süzüntü dökülerek tampon kalıntılarını uzaklaştırmak için 1 dakika santrifüj edildi. 100 ml DEPC'li su eklenip 1 dakika santrifüj edilerek RNA elüsyonları elde edildi. Elüsyonlar formaldehit agaroz jelinde görüntülendi.

2.5 RACE Reaksiyonları

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), PZR temelli bir yöntem olup cDNA uçlarının hızlı çoğaltımıdır. Kısa bir bölgesi bilinen cDNA'dan tasarlanan primerler ile cDNA'nın 3' ve 5' uçlarının çoğaltılmasına dayanır [165]. İlk zincir cDNA ters transkriptaz enzimi ile mRNA'dan sentezlenir. PZR reaksiyonu, gene özgü primer ve evrensel primer kullanılarak gerçekleştirilir. RACE yöntemi 3' ve 5' RACE olmak üzere ikiye ayrılır. 3' RACE'te gene özgü ileri primer ve evrensel ters primer kullanılarak 3' ucunun çoğaltılır. 5' RACE'te ise ilk zincir cDNA gene özgü ters primerle sentezlenir ve 5'ucuna G veya C kuyruğu eklenir. PZR ile eklenen kuyruğa uygun evrensel primer ve gene özgü ters primer kullanılarak cDNA'nın 5' ucu çoğaltılır.

2.5.1 3'RACE Primerlerinin Tasarımı

Zeytin yapraklarından lipaz enzimini kodlayan dizinin 3' ucunun klonlanması için ilk olarak primer tasarımında kullanılacak nükleotid dizisi seçildi. Farklı bitkisel lipaz dizileri kullanılarak tasarlanan dejenere primerler çalışmadı. Bu nedenle NCBI EST veri tabanı farklı bitkisel lipazlara ait nükleotid dizileri kullanılarak BLAST analizleri ile tarandı. Bu tarama sonucu zeytine ait GO246365.1 erişim numarasına sahip 843 bp uzunluğunda cDNA dizisinin lipaza benzerlik gösterdiği tespit edildi. GO246365.1 dizisi ile kontrol amaçlı nükleotid veritabanında BLAST yapıldı ve dizinin farklı lipazlara benzerlik gösterdiği doğrulandı. GO246365.1 dizisi primer tasarımı için kullanıldı.

LEF1 ve LEF2 olmak üzere iki adet 3'RACE primeri, Primer3 Programı kullanılarak tasarlandı (Tablo 2.3).

Tablo 2.3 Tasarlanan 3'RACE primerleri

LEF1	5'- CGTTGAAAGTGGCGCTCTTA -3'
LEF2	5'- CGCGTGTCATCTAGTTCTGG -3'

2.5.2 3'RACE İlk Zincir cDNA Sentezi

Stres verilmemiş ve 6 saat soğuk stresi verilmiş BioRad iScript cDNA Sentez Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde 1 µg RNA kullanılarak ilk zincir cDNA sentezi yapıldı. RNA'ya 12 µl su eklenerek 72 °C'de 3 dakika inkübe edildi. Tüplere 4'er µl 5X reaksiyon tamponu ve 1 µl Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 30 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA -20 °C'de saklandı.

2.5.3 3'RACE PZR Reaksiyonu

İlk zincir cDNA sentezinden sonra PZR reaksiyonları Bioline MyFi DNA Polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. 200 µl'lik PZR tüpü içerisinde, 1 µl kalıp cDNA, 5X MyFi reaksiyon tamponu, ileri primer (0,2 µM) ve OligodT anchor primer (0,2 µM), 2 U MyFi DNA Polimeraz enzimi ve H₂O koyulup 50 µl'ye tamamlandı.

PZR reaksiyonu LEF1 ve LEF2 primerleri kullanılarak 55 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirildi. PZR döngüsü ise şöyledir: 94 °C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 94 °C'de 40 saniye denatürasyon, 55 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dakika uzama aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dakika son uzama yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp -20 °C de saklandı. Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

Özgüllüğü arttırmak amacı ile yapılan PZR'dan 1 µl kalıp olarak kullanılarak sekonder PZR yapıldı. Sekonder PZR, ilk PZR ile aynı koşullarda gerçekleştirildi ve agaroz jel üzerinde kontrol edildi.

2.5.4 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz

%1'lik agaroz jel hazırlamak için 0,4 g Agaroz (SeaKem), 40 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60°C'ye soğutulup içine etidyum bromür eklenerek jel tepsisine döküldü.

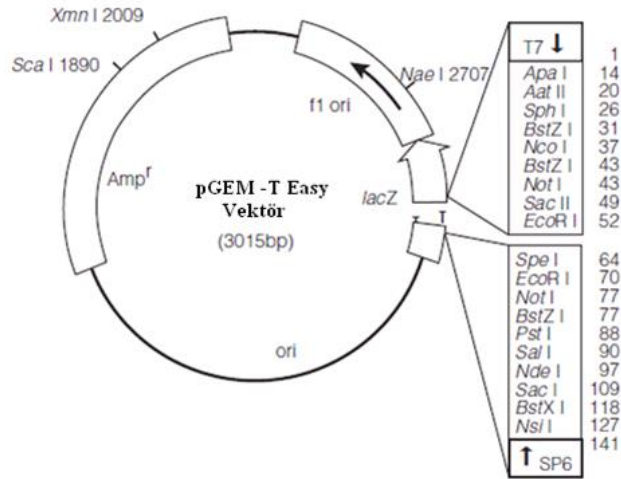
Örnekler 6× yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. 70 Voltta 80 dakika yürütüldü.

2.5.5 PZR Ürününün Agaroz Jelden Pürifikasyonu

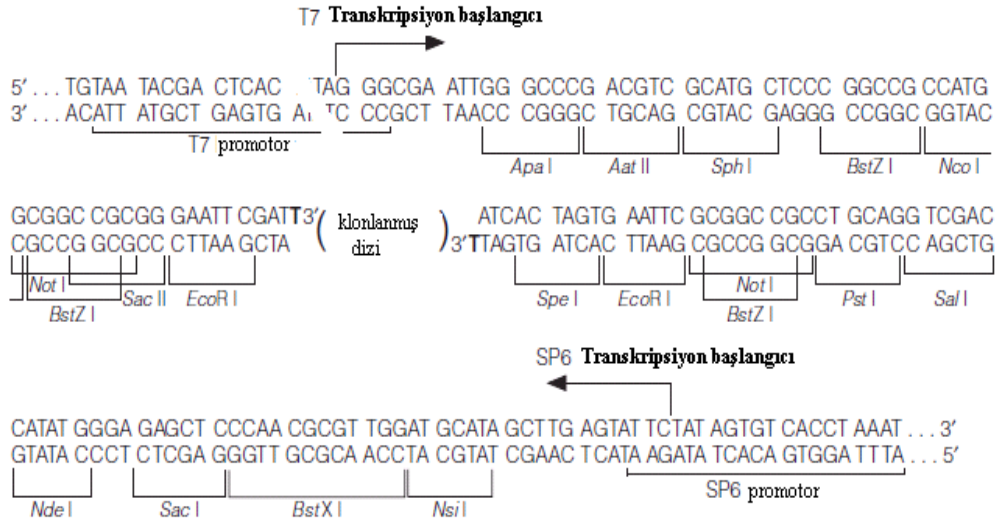
İlk ve ikinci PZR ürünlerinin saflaştırılması Qiagen QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti ile kullanım kılavuzuna uygun şekilde yapıldı. Bant agaroz jelden bisturi yardımı ile kesilip 2 ml'lik tüplere alındı. Jel hacminin 3 katı kadar QG tamponu eklenip 50 °C'de 10 dakika bekletildi. Jel eriyince jel hacmi kadar izopropanol eklendi. Karışım kitin kolonlarına aktararak 1 dakika 17900 xg hızda oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alt sıvı uzaklaştırılarak filtreye 0,5 ml QG tamponu eklendi ve 17900 xg hızda santrifüj edildi. Alt sıvı uzaklaştırılarak 0,75 ml PE tamponu eklenip 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. Kolonlar 1,5 ml'lik temiz tüplere alınarak 20 µl steril su eklenerek 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi.

2.5.6 Saflaştırılan PZR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

PZR ürünlerinin Promega pGEM-T Easy plazmit vektörünün (Şekil 2.1) çoklu klonlama bölgesine (Şekil 2.2) ligasyonu T4 ligaz kullanılarak gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonu "vektör/cDNA oranı", 1/8 olacak şekilde hazırlandı. Ligasyonlar, 4 °C'de 24 saat inkübe edildi.



Şekil 2.1 PGEMT Vektör Haritası



Şekil 2.2 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi

2.5.7 Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

Ultra kompetan hücreler Inoue ve arkadaşları (1990) tarafından önerilen protokole uygun olarak hazırlandı [166]. *E.coli* DH5α şusuna ait stok kültürden LB-Agar besiyerine ekilerek 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. Tek koloni seçilerek 25 ml SOB besiyerine ekilerek 37 °C'de 250 rpm'de 5-6 saat büyütüldü. Bu kültürden 2 ml alınarak 250 ml LB besiyerine aktarıldı ve 20 °C'de 250 rpm hızda 20-24 saat kadar OD₆₀₀ 0,5-0,6'ya ulaşana kadar büyütüldü. Kültür etüvden alınıp 10 dakika buzda bekletildikten sonra 2500xg hızda 4 °C'de 10 dakika santrifüjlendi. 80 ml soğuk Inoue tamponu içerisinde çözülüp, 10 dakika buzda bekletildi. 3000 xg hızda 4 °C'de

10 dakika santrifüj edildikten sonra 20 ml soğuk Inoue içinde çözülüp 1,5 ml DMSO ilave edildi. 10 dakika buzda bekletildikten sonra tüplere bölündü ve sıvı azot ile dondurularak -80 °C'de saklandı.

2.5.8 Transformasyon

2.5.9 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması

50 µl'si ultra kompetan hücre ile 5 µl ligasyon ürünü karıştırıldı ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. 42 °C' de 1 dakika sıcaklık şoku uygulandıktan sonra buzun üzerinde bekletildi. 950 µl SOC ilave edilerek, 37 °C'de 250 rpm hızda 1 saat büyütüldü.

Transformasyon karışımı plazmit içeren kolonilerin seçimi için 100 µg/ml ampisilin, mavi-beyaz seçimi için 0,5 mM IPTG ve 30 µg/ml X- gal içeren katı Luria-Bertani (LB) ortamına ekilerek, 37 °C'de 16 saat büyütüldü. Mavi renkte gözlemlenen koloniler istenen cDNA'yı içermeyen plazmitleri alan hücrelerden, beyaz renkte gözlemlenen koloniler ise rekombinant plazmitleri alan hücrelerden oluşmaktadır.

2.5.10 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Beyaz kolonilerin aktarılan DNA'yı taşıyıp taşımadıkları kontrol etmek amacı ile koloni PZR yapıldı. İlk olarak kolonilerden kürdanla alınarak 50 µl su içerisinde çözüldü ve 95 °C'de 10 dakika tutuldu. Hücre solüsyonundan 1,5 µl'si PZR kalıp olarak kullanıldı. 2x Qiagen Master Mix, dNTPs (0,4 mM), ileri primer (0,4 mM) ve geri primer (0,4 mM) primer karıştırılarak deiyonize su ile 25 µl'ye tamamlandı.

2.5.11 Plazmit İzolasyonu ve Dizi Analizi

Rekombinant plazmit taşıdığı koloni PZR ile belirlenen kolonilerden, 100 µg/ml antibiyotik ilave edilmiş sıvı LB ortamına ekilerek 37 °C'de 250 RPM hızda 16 saat büyütüldü.

Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerilen biçimde yapıldı. 10 ml kültür santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Peletler, 250 µl süspansiyon çözeltisinde yeniden çözüldü. Karışıma 250 µl liziz

çözeltisi eklenerek dikkatlice karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 350 µl bağlanma tamponu eklenerek dikkatlice karıştırılıp, 5 dakika buz üzerinde bekletildi. 13000 xg hızda 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı filtreli kolonlara aktarılıp 1 dakika 13000 xg hızda santrifüj edildi. Altta biriken sıvı atıldı. 700 µl yıkama çözeltisi II kolona koyulup 1 dakika 13000 xg hızda santrifüj edildi. Altta biriken sıvı atıldı ve tampon kalıntısının uzaklaştırılması için 13000 xg hızda 1 dakika daha santrifüjlendi. Kolon temiz tüpe alınıp filtre üzerine 80 µl deiyonize su eklendi ve 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Elde edilen plazmit DNA -20°C'de saklandı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinin iki ucunda bulunan EcoRI enzimi ile kesilerek plazmitin aktarılan cDNA'yı içerdiği doğrulandı. Plazmitler T7 ve SP6 primerleri ile çift yönlü dizi analizi için Triogen Firmasına gönderildi.

2.6 5'RACE Reaksiyonları

2.6.1 5'RACE Reaksiyonları için Primer Tasarımı

3'RACE reaksiyonları sonucu elde edilen K1-3 cDNA'sına ait nükleotid dizisi kullanılarak 5'RACE reaksiyonları için gene özgü ters primer (Tablo 2.2) tasarımı Primer3 programı kullanılarak yapıldı.

Tablo 2.4 LRR1 ters primeri

LRR1

5'- TAAAGATATATGGCCATGACACCAG -3'

1

CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTXXXcgttgaaagtgg
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>

61

cgctcttaagtagtctcctcctgtccgccgtgaagtccgccgaagacttcaacgataacct

121

taaacctccggcaaaaagtcacatgcagctgggtctttgcgctcaactcatcgaacctgctg

181

gtttcccttgctcagaacacaatgctcaaacaaaagatggatttgtactgggacttcaac

241

gcgtgtcatctagttctggaattctcagaagacaaatgggccctcctgttctgcttatatac

301

atggacttttcatggcaggatgatgcgtgggttcttgataccccaaatcaatccttggggct

361

ttatccttgccaatcggtggttttgatgtctgggttggaatgtgcgtgggacacgctgggt
<<<<<<

421

gtcatggccatatatctttatcagagaaagataagaaattctgggattggagttggcagg
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
LRR1

481

aatatgctctttacgatctccaagaaatgattcgttatgtatatacagttacaaactcta

541

gagtgtttgtcattggatattctcagggaacaatcatttctctggctgcctttactgaac

601

cagatacagtacaaacggttggagcagctgcgcttctttgtcctataacatatttgaatc

661

atatgactgctcgattgcctcttagattagttaaaatgcatcttactcagggttttacttg

721

cagtgggcattcatgaactcaatttcaaaagtgactggggactcgcacatcatggaaatga

781

tgtgcgacagacatgtagattgtggtgacttgctatcttctattacaggaagaattggt

841

gtttcaatagctctcggattgatttctatcttgaatatgaaccgcacatcatctacaa

901

aaaatttgaatcatctctttcagatgatccgaaaagggtacttttgcgaagtacgactatg

961

gattttggaagaacttgaagcactacggccaactgaagccaccaaggttcgatctaagcc

1021

aaattcccagttcattaccattatggatgggggtacgggggaagtgatgccttagcacagc

1081

tcacagatttgcagcatactcccaagaaattacaatcaaagccagattttgctctatcttg

1141

aaaattatgggtcatctagatttccttttaagcacaaagagcaaaggaagatgtttatgaca

1201

aatgcttgcatTTTTCGATTcattgggaacacacagcagttactaaatgTTGGATCGGG

1261

gaggatcggagagtcttgatagtattaaggaagaaaattttactcttgttcactcttgaa

1321

gtgaacttgcacataggggttgatacttgataattgtgtgttaaattgtacgcattatg

1381

tttatgatgtaaatataatttcatattttccacggaaaaaaaaagaaaaaaaaaaaaaaa

2.6.2 5'RACE Reaksiyonları için İlk Zincir cDNA Sentezlenmesi

Stres verilmemiş ve 6 saat soğuk stresi verilmiş bitki RNA'larından Clontech Smarter RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde 1 µg RNA kullanılarak ilk zincir cDNA sentezi yapıldı. RNA'ya 5'- CDS primer A (0,6 µM) ve su eklenerek 72 °C'de 3 dakika ve 42 °C'de 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışıma 1 µl SMARTer II A Oligonükleotid eklendi. Aynı bir tüpte 5x İlk Zincir Tamponu, DTT (5 mM), dNTP karışımı (1 mM) bir araya getirildi. İki tüpün içeriği birleştirilerek 20 U RNaz İnhibitör ve 200 U SMARTScribe Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 42 °C'de 90 dakika ve 70 °C'de 10 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi ve cDNA -20 °C'de saklandı.

2.6.3 PZR Reaksiyonu

İlk zincir cDNA sentezinden sonra PZR reaksiyonları Bioline MyFi DNA Polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. 200 µl'lik PZR tüpü içerisinde, 1 µl kalıp cDNA, 5X MyFi Reaksiyon Tamponu, LRR1 primeri (0,2 µM) ve UPM primeri (0,2 µM), 2 U MyFi DNA Polimeraz enzimi ve H₂O koyulup 50 µl'ye tamamlandı.

PZR reaksiyonu LRR1 primeri kullanılarak 55 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirildi. PZR döngüsü ise şöyledir. 94 °C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 94 °C'de 40 saniye denatürasyon, 55 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dakika uzama aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dk son uzama yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp (-20) °C de saklandı.

2.6.4 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz

PZR reaksiyonlarının çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi. %1'lik jel hazırlamak için 0,4 g Agaroz (Aplichem), 40 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60°C'ye soğutulup içerisine EtBr boyası eklenerek jel tepsisine döküldü.

Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. 70 V'ta 60 dakika yürütüldü.

2.6.5 PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu

PZR ürünleri Bio Basic PCR Pürifikasyon Kiti kullanılarak pürifiye edildi. 40 µl PZR ürününe 3 katı kadar bağlanma tamponu eklenip kolon üzerine aktarıldı ve 2 dakika bekletildi. 2 dakika 10000 rpm’de santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atılıp kolonlara 750 µl Yıkama Tamponu eklenerek 2 dakika 10000 rpm’de santrifüj edildi. Alttaki sıvı uzaklaştırılıp yıkama işlemi tekrarlandı. 2 dakika santrifüjlenerek kurutma işlemi yapıldı. Son olarak 15 µl steril su eklenerek 2 dakika 55 °C’de bekletildi ve 2 dakika 10000 rpm’de santrifüjlenerek elüsyon yapıldı. Saflaştırılan PZR ürünlerinin konsantrasyonları nanospektrofotometrede ölçülerek belirlendi.

2.6.6 Vektör Ligasyonu ve Transformasyon

PZR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanılarak 2.5.6’da anlatıldığı şekilde yapıldı. Rekombinant vektörün DH5α kompetan hücrelerine aktarımı ve pozitif kolonilerin seçimi 2.5.8’de anlatıldığı şekilde yapıldı.

2.6.7 Plazmit İzolasyonu ve Dizi Analizi

Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plazmit İzolasyon Kiti kullanılarak 2.5.9’da belirtildiği şekilde yapıldı ve plazmitler dizi analizine gönderildi.

2.7 3’RACE ve 5’RACE Reaksiyonları ile Elde Edilen DNA Dizilerinin Biyoinformatik Analizleri

3’RACE ve 5’RACE reaksiyonları ile elde edilen DNA dizileri Emboss Merger Online Programı kullanılarak hizalanıp tek dizi olacak birleştirildi. Elde edilen tam uzunluktaki dizi kullanılarak NCBI veri tabanlarında BLASTn ve BLASTp analizleri yapılarak lipaz dizilerine olan nükleotid ve aminoasit dizi benzerlikleri incelendi. Tam uzunluktaki lipaz dizisi NCBI ORF Finder programı ile analiz edilerek okuma çerçevesi belirlendi.

2.8 Tam Uzunluktaki cDNA’nın Klonlanması

3’ ve 5’ RACE reaksiyonları ile elde edilen biyoinformatik olarak birleştirilmiş dizi kullanılarak tam uzunluktaki cDNA’nın bütün halinde klonlanabilmesi için LFF1 ve

LFF2 primeri tasarlanmıştır (Tablo 2.5). Primer tasarımı Primer3 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.5 Tam uzunlukta cDNA'nın klonlanması için tasarlanan primerler

LFF1	5'- ATGGAGCTTGCGGCGGCACA -3'
LFF2	5'- CGGTTCTTATCGGAAGACGA -3'

2.8.1 İlk Zincir cDNA Sentezlenmesi

Stres verilmemiş ve 4 saat soğuk stresi verilmiş zeytin RNA'larından Bio Rad iScript cDNA Sentez Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde 1 µg RNA kullanılarak ilk zincir cDNA sentezi yapıldı. RNA'ya 5x iScript Reaksiyon Karışımı, iScript Ters Transkriptaz ve su eklenerek reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 25 °C'de 5 dakika ve 46 °C'de 30 dakika inkübe edilerek ilk zincir cDNA sentezi gerçekleştirildi ve cDNA -20 °C'de saklandı.

2.8.2 PZR Reaksiyonu

İlk zincir cDNA sentezinden sonra PZR reaksiyonları Bioline MyFi DNA Polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. 200 µl'lik PZR tüpü içerisinde, 1 µl kalıp cDNA, 5X MyFi Reaksiyon Tamponu, LFF2 primeri (0,2 µM) ve Oligo-dT primeri (0,2 µM), 2 U MyFi DNA Polimeraz enzimi ve H₂O koyulup 50 µl'ye tamamlandı.

LFF2 primerleri kullanılarak PZR reaksiyonları 56 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirildi. PZR döngüsü ise şöyledir. 95 °C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 95 °C'de 40 saniye denatürasyon, 56 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dakika uzama aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dk son uzama yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp (-20) °C de saklandı.

2.8.3 İkincil PZR

PZR özgülüğünü arttırmak için LFF2 ile yapılan PZR kalıp olarak kullanılarak LFF1 primeri ile ikinci bir PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. İkinci PZR'da kullanılan enzim ve koşullar LFF1 primeri dışında aynıdır.

PZR ürünleri, agaroz jel üzerinde görüntülendi ve Bio Basic PZR Pürifikasyon Kiti kullanılarak pürifiye edildi.

2.8.4 Vektör Ligasyonu ve Transformasyon

PZR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanılarak 2.5.6'da anlatıldığı şekilde yapıldı. Rekombinant vektörün DH5 α kompetan hücrelerine aktarımı ve pozitif kolonilerin seçimi 2.5.8'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

2.8.5 Plazmit İzolasyonu ve Dizi Analizi

Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plazmit İzolasyon Kiti kullanılarak 2.5.9'da belirtildiği şekilde yapıldı. Plazmitleri istenilen DNA'yı içerdiği EcoRI ve PstI enzimleri ile kesilerek doğrulandı. Seçilen plazmitler dizi analizine gönderildi.

2.9 Filogenetik Analiz

Zeytin yaprak lipazının diğer lipazlarla olan akrabalığının incelenmesi için filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Analiz için lipazlara ait amino asit dizileri, BLASTp yapılarak seçilmiş ve ClustalW ile hizalanmıştır. Filogenetik ağaç, MEGA7 programı kullanılarak Neighbor-Joining (NJ) metodu ile 10000 tekrarlı olarak oluşturulmuştur.

2.10 Zeytin Yaprak Lipazının Soğuk Stresinde Ekspresyon Düzeylerinin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

Lipaz ekspresyon analizi için 2 yaşındaki zeytin fideleri 14 saat 4 °C'de aydınlık /10 saat 2 °C'de karanlık olmak üzere 10 gün boyunca soğuk stresine maruz bırakılmıştır. Yaprak örnekleri 0. dakika, 4. saat, 6. saat, 24. saat, 1. hafta ve 10. günde alınmış ve sıvı azot ile hemen dondurularak -80°C'de saklanmıştır. Yapraklardan Trizol ile total RNA çıkarılmıştır. Jena Bioscience SCRIPT cDNA Sentez Kiti kullanılarak 0,4 μ g total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonları, tüm zaman noktalarından iki tekrarlı olacak şekilde Jena Bioscience qPCR Green Master kiti ile gerçekleştirilmiştir. BioRad Connect Real-Time PCR Deteksiyon Sistemi kullanılmıştır.

Lipaz cDNA'sı LUF ileri primeri ve LUR geri primeri ile çoğaltılmıştır (Tablo 2.6). Sonuçların normalize edilebilmesi için GAPDH geni kontrol olarak çoğaltılmıştır. GAPDH cDNA'sı OGF ileri primeri ve OGR geri primeri kullanılarak çoğaltılmıştır (Tablo 2.6). PZR koşulları 3 dakika 50 °C, 2 dakika 95 °C'yi takiben 40 döngü 15 saniye 95 °C, 1 dakika 55 °C ve 30 saniye 72 °C olacak şekildedir. Rölatif mRNA miktarları $2^{-\Delta\Delta C}$ yöntemi ile hesaplanmıştır.

Tablo 2.6 Gerçek Zamanlı PZR primerleri

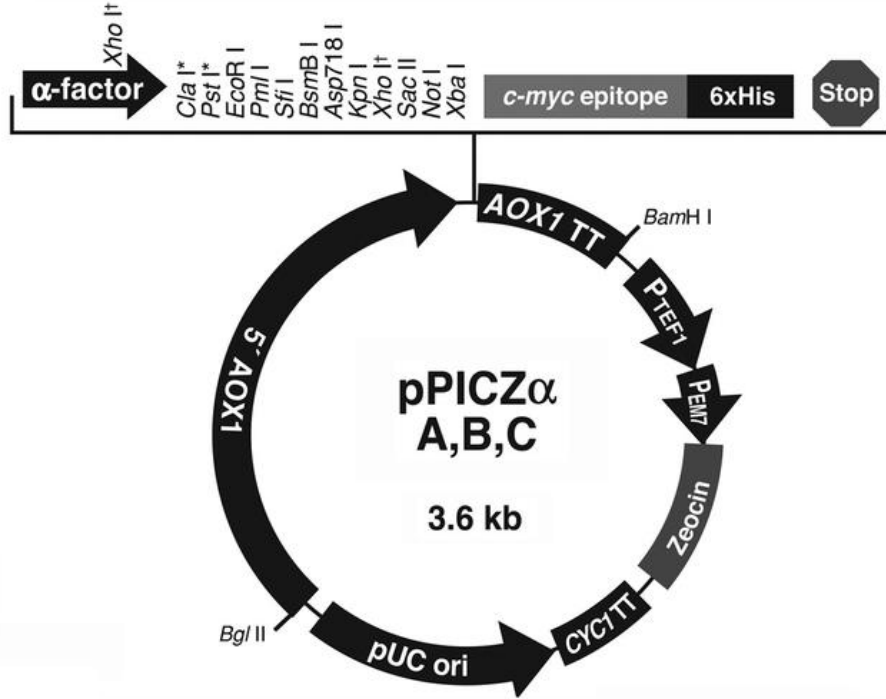
LUF	5'- TGAACCGCATCCATCATCTA -3'
LUR	5'- CTAAGGCATCATTCCCCGTA -3'
OGF	5'- ACAGCTCCTGGTAAGGGTGA -3'
OGR	5'- GGCTTGCGTCAAGAAGTCTC -3'

2.11 Zeytin Yaprak Lipazının *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu

2.11.1 Vektör Seçimi, Primer Tasarımı ve Lipaz cDNA'sının Çoğaltımı

Tam uzunlukta cDNA'sı elde edilen zeytin yaprak lipazının *Pichia pastoris*'te heterolog ekspresyonu için yabani tip olan X33 suşu ve Invitrogen pPICZαA vektörü (Şekil2.3) tercih edilmiştir.

pPICZα vektörleri AOX1 promotor bölgesi, C- ucunda çoklu histidin kuyruğu ve Zeocin direnç geni içerir. Ayrıca N- ucunda içerdiği *Saccharomyces cerevisiae* α faktörü salgı sinyali proteinin hücre dışına salınmasını sağlar. Lipaz dizisinin okuma çerçevesine uyduğu için pPICZαA vektörü seçilmiştir.



Şekil 2.3 pPICZαA vektör haritası

Vektörün çoklu klonlama bölgesinde içerdiği kesim enzimlerinden lipaz dizisini kesmeyenler seçilmiş ve bu diziler eklenerek LENSF2 ve LER2 primerleri tasarlanmıştır (Tablo 2.7). KpnI enzim kesim bölgesi LENSF2 ileri primerin 5' ucuna, NotI enzim kesim bölgesi ise geri primerin 5' ucuna eklenmiştir. Ayrıca ileri primer tasarlanırken lipaz dizisinin kendi sinyal dizisini içermeyecek şekilde tasarlanmıştır.

Tablo 2.7 pPICZαA vektörü ile ekspresyon için yeni primerler

LENSF2	<u>GGTACCTCAATCCTCCTGCGAAAGTC</u> <i>KpnI</i>
LER2	<u>GCGGCCGCTGACCACCGCTAAGTGTT</u> <i>NotI</i>

Tam uzunlukta elde edildiği doğrulanmış cDNA klonu kalıp olarak kullanılarak PZR reaksiyonu kuruldu. 200 µl'lik PZR tüpü içerisinde, 1 µl lipaz cDNA, 5X MyFi Reaksiyon Tamponu, LENSF2 ileri primeri (0,2 µM) ve LER geri primeri (0,2 µM), 2 U MyFi DNA Polimeraz enzimi ve H₂O koyulup 50 µl'ye tamamlandı.

PZR ürünleri agaroz jelden kesilerek Biomatik Spinclean Jel DNA Ekstraksiyon Kiti protokolüne göre izole edildi. Ligasyon ve transformasyon işlemleri yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Pozitif koloniler seçilip plazmit izolasyonu yapıldı.

Elde edilen plazmitler EcoRI ile kesildikten sonra pozitif görünen plazmitler Triogen firmasına dizin analizine gönderildi. P6 ve P8 olarak adlandırılan cDNA'ların dizin analizi sonuçları BLAST analizleri ve daha önce elde edilen tam uzunluktaki DNA dizisi ile karşılaştırılarak lipaza ait olduğu doğrulandı.

2.11.2 Lipaz cDNA'sının pPICZαA Vektörüne Aktarılması ve *E.coli*'de Çoğaltılması

2 µg pPICZαA vektörü ve 0,75 µg P8 cDNA'sı KpnI ve NotI kesim enzimleri ile kesildi. Promega Ligaz enzimi kullanılarak vektör ve cDNA'nın ligasyonları gerçekleştirildi. Rekombinant plazmit *Pichia pastoris*'e aktarılmadan önce *E.coli* DH5α hücrelerine daha önce anlatıldığı şartlarda transformasyonla aktararak çoğaltıldı.

Pozitif kolonilerden biri seçilerek plazmit izolasyonu için 25 µg/ml Zeocin içeren 10 ml LB besi yerinde 37 °C'de 220 RPM hızda 16 saat büyütüldü. Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerilen biçimde yapıldı. İzole edilen plazmit SacI ve XbaI enzimleri ile kesilerek insertün istenilen yönde aktarıldığı doğrulandı.

2.11.3 *Pichia pastoris* X33 Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi

Invitrogen Pichia EasyComp™ Transformation Kit protokolü uygulanarak *Pichia pastoris* X33 suşu hücreleri kompetent hale getirildi. YPD-Agar besi yerinde büyütülen kolonilerden bir tanesi seçilerek 10 ml YPD besi yerine ekildi ve 28°C'de gece boyu büyütüldü. Kültür OD'si 0,1-0,2 arasında olacak şekilde 10 ml YPD besi yerinde seyreltildi ve OD 0,6- 1 arasına gelene kadar 4-6 saat büyütüldü. Hücreler 500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 10 ml Solüsyon 1'de çözüldü ve tekrar 500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 1 ml Solüsyon 1'de çözülerek 50 mikrolitre ependorf tüplere paylaştırıldı. Tüpler kağıt havlulara sarılarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.11.4 Plazmitlerin *Pichia pastoris* X33 Hücrelerine Kimyasal Yolla

Transformasyonu

Lineer DNA, *Pichia pastoris* genomunda homoloji gösterdiği bölge ile homolog rekombinasyon yaparak kararlı transformantlar oluşturabilir. Gen insersiyonu, vektörün AOX1 promotoru ya da AOX1 TT (Transkripsiyon Sonlandırma) bölgelerinden biriyle *Pichia*'nın AOX1 lokusu arasında olur. Bu sayede vektörün bir veya daha fazla kopyası AOX1 geninin yukarı bölgesi veya aşağı bölgesine entegre olur.

X33 hücrelerine transformasyon için 2 µg rekombinant vektör SacI enzimi ile kesilerek lineerize edildi. Kit protokolüne uygun olarak 50 µL X33 hücresi ile lineer vektör karıştırılarak 1 ml Solüsyon 2 eklendi. Karışım 30°C'de 1 saat boyunca 15 dakikada bir vortekslenerek inkübe edildi. Hücelere 10 dakika 42°C'de ısı şoku verildi. Karışım iki tüpe bölünerek üzerine 1ml YPD besiyeri eklendi ve 1 saat 30°C'de Zeocin direnci gelişmesi için inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 3000xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılarak hücreler 500 µL Solüsyon 3 içinde çözündürüldü ve iki tüp birleştirildi. Hücreler tekrar 3000xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve sıvı uzaklaştırıldı. Son olarak hücreler 150 µL Solüsyon 3 içerisinde çözündürülerek 100 µg /ml Zeocin içeren YPDS-Agar besiyerine ekildi. Petri 28°C'de 3 gün boyunca inkübe edildi.

2.11.5 X33 Kolonilerinin Taranması

Aktarılan DNA'nın *P.pastoris* genomuna entegrasyonunun kontrolü için kolonilerden genomik DNA izolasyonu yapılarak PZR ile tarandı. Genomik DNA izolasyonu için kolonilerden steril tip ile alındı ve 100 µl 200mM LiOAc %1 SDS solüsyonu içerisine çözüldü. 70°C'de ısı bloğunda 5 dakika inkübe edildi ve 300 µl %96-100 etanol eklenerek otuz saniye vortekslendi. 15.000 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlendi. Hücre pelleti %70 etanol ile yıkandı. 15.000 x g'de 3 dakika boyunca santrifüjlendi. Hücre pelleti %100 etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl H₂O içerisinde pellet homojen hale getirildi. 15.000 x g'de 1 dakika santrifüjlenerek üst faz PZR'da kullanılmak üzere ayrıldı.

Genomik DNA'nın 1 µl'si kalıp olarak kullanılarak PZR yapıldı. 2× Qiagen PZR Mix, ileri primer 5'AOX1 (0,5 µg/µl) ve geri primer 3'AOX1 (0,5 µg/µl) koyulup 25 µl'ye su ile tamamlandı. PZR reaksiyonları 95 °C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 95 °C'de 40 saniye denatürasyon, 59 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dakika uzama aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dk son uzama yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp (-20) °C de saklandı. Daha sonra PZR ürünleri agaroz jel yürütülerek görüntülendi.

2.11.6 Tribütirin Petri Deneyi ile Kolonilerinde Aktivite Taranması

Kolonilerde aktivite taraması yapılarak daha yüksek aktiviteye sahip koloniler belirlenmesi için tribütirin petri deneyi yapıldı. Minimal metanol tribütirin besiyeri %1,34 YNB, %1 tribütirin, %1,5 agar ve %1 metanol içerecek şekilde hazırlandı. Pozitif 11 koloni ve insert içermeyen X-33 kolonileri tribütirin-agar petrilere spotlama yoluyla ekildi. 24 saatte bir metanol %1 olacak şekilde petri kapağına eklenerek 48 saat 28°C'de büyütüldü. Kolonilerin etrafında oluşan şeffaf bölgenin büyüklüğüne göre aktivitesi fazla olan koloniler seçildi.

2.12 Zeytin Lipaz cDNA'sının *P. pastoris*'te Küçük Ölçekli Ekspresyonu

Pozitif 11 koloni ve insert içermeyen *P. pastoris* X-33 kolonileri 10 ml BMGY besiyerine aşılandı. Kültürler 28°C ve 250 rpm'de bir gece boyunca inkübe edildi. Büyütülen önkültür, OD 600 nm'de ölçülen absorbansı 1 olacak şekilde 10 ml BMMY içeren iki adet besiyerine aşılanmıştır. Ekspresyonun indüklenmesi amacıyla her 24 saatte bir % 1 metanol ilavesi yapılmıştır. 72. Saat sonunda ekspresyon durduruldu ve hücreler 12000 xg'de çöktürüldü. Ekstraselüler sıvı temiz falcon tüplere alınarak -80°C'de donduruldu.

11 koloniye ait ekstraselüler sıvıdaki proteinler %80 amonyum asetat ile 1 saat 4 C'de inkübe edilerek çöktürüldü. Protein pelleti, 200 µl 50 mM'lık potasyum tamponu içerisinde çözüldü.

2.12.1 SDS-PAGE Analizi

Tampon içerisindeki örnekler SDS-PAGE jeline yüklenmek üzere 4X yükleme tamponu ile karıştırılıp 5 dk kaynatılarak proteinlerin denatüre edilmesi sağlandı. %12'lik ayırıcı jel ve % 5'lik yükleme jeli şeklinde hazırlanan jele örnekler yüklendi. Elektroforez işlemi örnekler ayırma jeline ulaşana kadar 80 V, sonrasında boya jelden çıkana kadar 160 V'ta yürütüldü. Jel, boyama solüsyonunda gece boyu çalkalanarak boyandı. Jel yıkama solüsyonunda 30 dk bekletilerek fazla boya uzaklaştırıldı.

2.12.2 Enzim Aktivite Analizi

Lipaz aktivitesinin ölçümü için substrat olarak pNPP kullanılarak Gupta vd. tarafından önerildiği şekilde yapıldı [167]. pNPP 3 mg/ml olacak şekilde izopropanol içerisinde çözündürüldü ve 50 µl Triton-X eklendi. 0,1 mg/ml gum arabik içeren 50 mM fosfat tamponu hazırlandı. pNPP çözeltisi/tris çözeltisi 1/10 oranında karıştırılarak reaksiyon tamponu oluşturuldu. Protein çözeltisi/reaksiyon tamponu 1/10 oranında karıştırılarak 35 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 410 nm dalga boyunda OD'ler okundu. X33'ten elde edilen proteinler de kontrol olarak kullanıldı.

2.13 Zeytin Yaprak Lipazının *Pichia pastoris*'te Büyük Ölçekte Ekspresyonu

Enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu için yüksek hacimdeki besiyerlerinde ekspresyon denemeleri yapıldı. Aktivite testi sonucu koloniler içerisinde en yüksek aktivite gösterdiği için seçilen α 11 kolonisi kullanılarak deneyler gerçekleştirildi.

3 erlende 100 ml BMGY X33 hücreleri ve α 11 hücreleri ile aşılandı. Kültürler 28°C ve 250 rpm'de OD 600 nm'de ölçülen absorbansı OD 2'ye gelene kadar inkübe edildi. Büyütülen önkültürler 2500xg'de 5 dakika çöktürüldü ve pelletler OD 1 olacak şekilde 200'er ml BMMY besiyerinde çözündürüldü. Ekspresyonun indüklenmesi için her 24 saatte bir % 1 metanol eklendi. 72 saat sonunda inkübasyon durduruldu ve hücreler 10000 xg'de çöktürüldü. Ekstraselüler sıvı temiz falcon tüplere alınarak %80 amonyum sülfat ile çöktürüldü.

2.13.1 Ultrafiltrasyon ile Amonyum Sülfatın Uzaklaştırılması

Proteinler çöktürüldükten sonra amonyum sülfatın ortamdan uzaklaştırılması için ultrafiltrasyon yapıldı. Proteinler 15 ml 50mM'lık potasyum fosfat tamponunda çözüldü ve ultrafiltrasyon tüplerine aktarıldı. 4900 xg'de 40 dk merkezkaç edilerek alt sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak amonyum sülfat uzaklaştırıldı.

2.13.2 Protein Saflaştırma

Protein saflaştırma işlemi, PICZ α vektörü ile proteine eklenen His kuyruğundan faydalanarak Invitrogen Ni-Agar kullanılarak yapıldı. 250 μ l Ni-Agar 600 μ l steril distile su ile yıkandı ve 800 xg'de 1 dakika çöktürüldü. Distile su uzaklaştırılarak 600 μ l bağlanma tamponu ile 2 kez yıkandı ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Yaklaşık 600 μ l protein çözeltisi hazırlanan Ni-Agara eklendi ve buz üzerinde 30 dk çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 1 dakika 800 xg'de santrifüj edildi. Üst sıvı temiz bir tüpe alınarak +4 °C'de saklandı. Ni-Agar üzerine 800 μ l yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika 800 xg'de santrifüj edildi. Üst sıvı temiz bir tüpe alındı. İşlem 2 kez daha tekrarlandı. Yıkamadan sonra Ni-Agar üzerine 150 μ l elüsyon tamponu eklendi ve 1 dakika 800 xg'de santrifüj edildi. Üst sıvı temiz bir tüpe alındı. İşlem 3 kez daha tekrarlandı. Ayrılan tüm örnekler ve elüsyonlar SDS-PAGE jele yüklenerek incelendi. Saflaştırılan proteinin miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi ve pNPP ile aktivite testi yapılmıştır.

2.14 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu

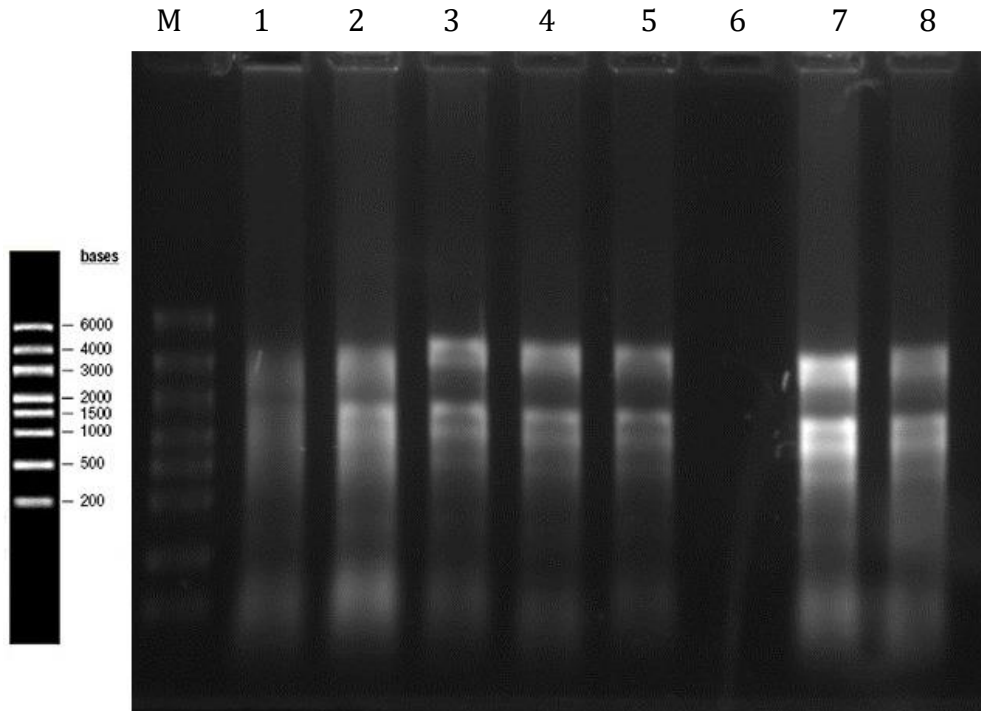
Aktivite analizleri için daha yüksek miktarda enzimin üretilmesi amacıyla ekspresyonun optimizasyonu için farklı şartlarda denemeler yapılmıştır. Bu denemelerden birinde hücreler 100 ml BMGY ön kültüründe OD yaklaşık 0,7'ye gelinceye kadar 28°C'de 250 rpm'de büyütüldü. Kültür çöktürülerek pelet 100 ml BMMY besiyerinde çözündürüldü. Besiyerine 100 μ l steril zeytinyağı eklendi. Metanol 12 saatte bir %0,25 olacak şekilde eklendi. Metanolle beraber metanol ağırlığının 1/5'i kadar maya özütü eklendi [168]. Kültürler havalandırmayı arttırmak için 1 litrelik erlenlerde erlenin ağzı iki kat tülbent ile kapatılarak büyütüldü. İnkübasyon 28°C'de 250 rpm'de 48 saat boyunca yapıldı. Her 24 saatte kültür OD'leri kaydedildi.

2.15 Aktivite Analizinin Optimizasyonu

pNPP aktivite analizi ile tutarlı sonuçlar alınamadığı için zeytinyağı ile titrasyon yöntemi farklı pH'larda denendi. 50 ml'lik erlende 1 ml 50mM Tris, 2,5 ml distile su, 3 ml zeytinyağı karıştırılarak 20 µl protein çözeltisinden eklendi. Karışım 30 dakika 35 °C'de bekletildi. Fenolftalein indikatör olarak kullanılarak 0,1 M NaOH ile titrasyon yapıldı.

3.1 RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra RNA'lar kalitesinin belirlenmesi için formaldehit agaroz jelde yürütölüp görüntölendi (Şekil 3.1).

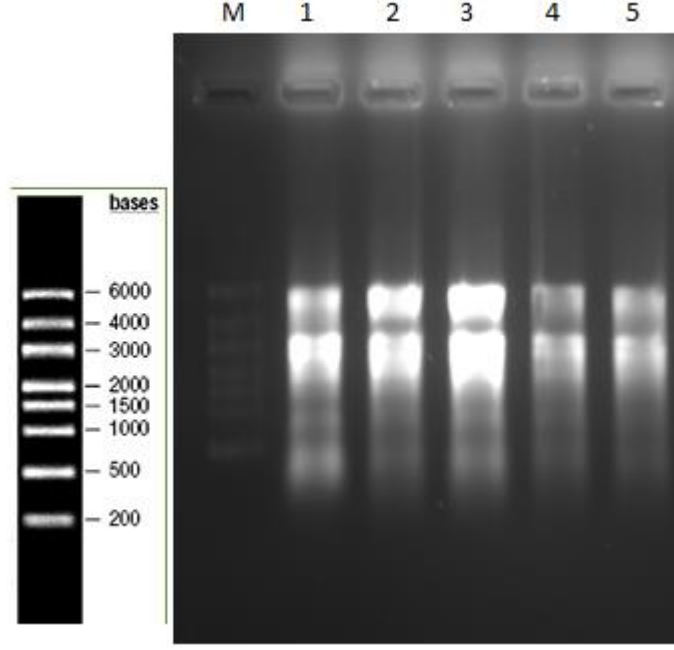


Şekil 3.1 RNA Formaldehit Jeli Görüntüsü

M: High Range RNA Ladder, 1. Stres verilmemiş RNA örneği, 2. Kontrol RNA örneği, 3. 4 saat soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 4. 4 saat soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 5. 6 saat soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 6. 6 saat soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 7. 1 gün soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 8. 1 gün soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı

3.2 RNA Temizleme

Qiagen RNeasy Plant Mini Kit kullanılarak temizlenen RNA'lar formaldehit agaroz jelde yürütölerek kontrol edildi (Şekil 3.2).



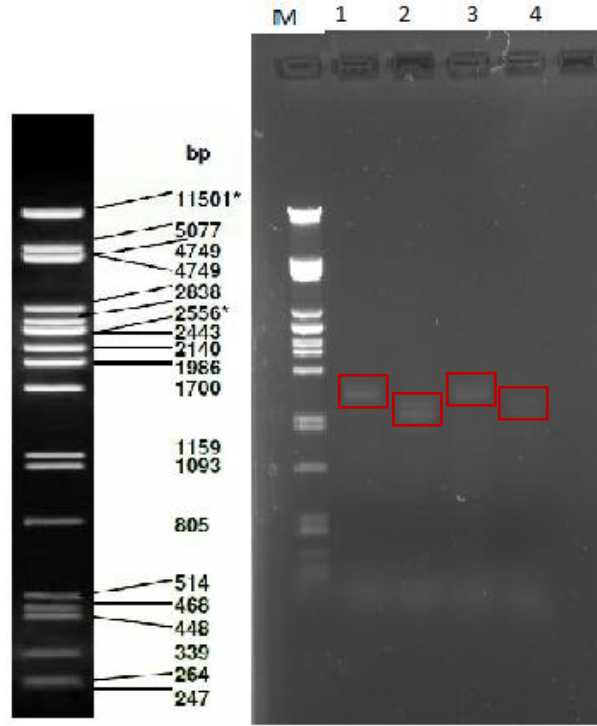
Şekil 3.2 RNA Formaldehit Jeli

M. RNA Ladder, 1. Stres verilmemiş RNAsı, 2. 4 saat soğuk stresi verilmiş bitki RNAsı, 3. 6 saat soğuk stresi verilmiş bitki RNAsı, 4. 1 gün soğuk stresi verilmiş bitki RNAsı, 5. 1 hafta soğuk stresi verilmiş bitki RNAsı

3.3 RACE Reaksiyonları

3.3.1 3' RACE Reaksiyonları ve Plazmit İzolasyonu

LEF1 ileri primeri ve Oligo dT geri primeri kullanılarak 55°C bağlanma sıcaklığında kontrol ve 6 saat cDNA'sı ile yapılan PZR sonucunda 1500-1600 bp civarında iki bant gözlemlenmiştir (Şekil 3.3). LEF2 ve Oligo dT geri primeri kullanılarak yapılan PZR'lar sonucu ise 1200-1300 bp civarında iki bant gözlemlenmiştir (Şekil 3.3).

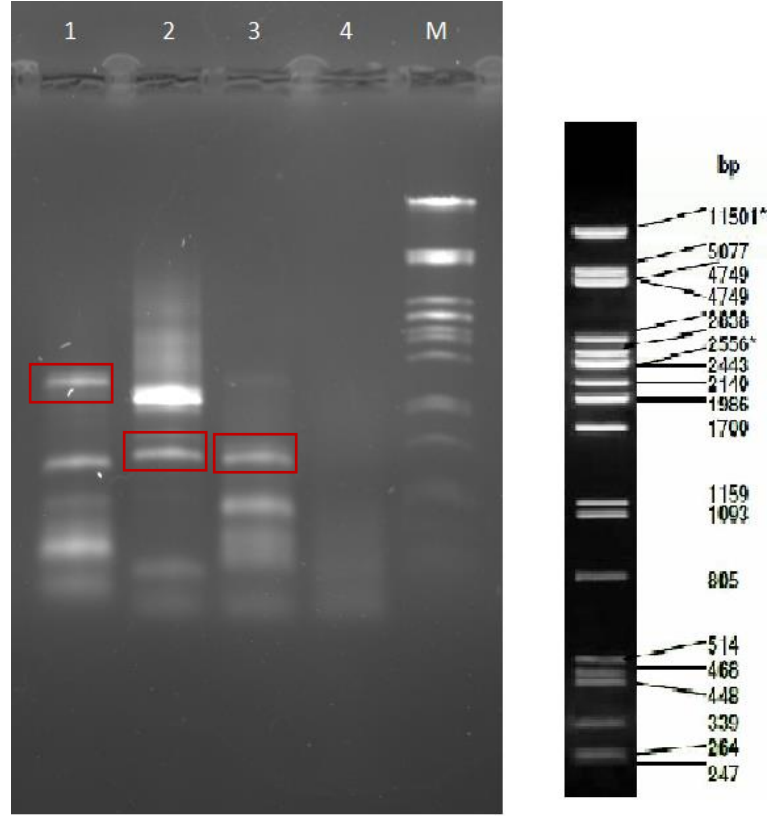


Şekil 3.3 3'RACE PZR ürünlerinin jel üzerinde görüntüsü

M. λ PstI Marker, 1. Stres verilmemiş örnek LEF1 primeri ile, 2. Stres verilmemiş örnek LEF2 primeri ile, 3. 6 saat soğuk stresi verilmiş örnek LEF1 primeri ile, 4. 6 saat soğuk stresi verilmiş örnek LEF2 primeri ile PZR

Özgüllüğü arttırmak için LEF1 ve LEF2 primerleri kullanılarak PZR ürünün 1 μ l'si kalıp olarak kullanılarak ikinci bir PZR gerçekleştirilmiştir. Bu PZR ürünleri de agaroz jel üzerinde görüntülendiğinde çok sayıda bant görülmüştür (Şekil 3.4).

PZR ürünleri, PZR saflaştırma kiti ile saflaştırıldı. Saflaştırılan PZR ürünlerinin konsantrasyonları KLEF1 (Stres verilmemiş örnek LEF1 primeri) 42 ng/ μ l, KLEF2 (Stres verilmemiş örnek LEF2) primeri 28 ng/ μ l, 6LEF1 (6 saat soğuk stresi verilmiş örnek LEF1 primeri) 28 ng/ μ l ve 6LEF2 (6 saat soğuk stresi verilmiş örnek LEF2 primeri) 56 ng/ μ l olarak belirlendi. Elüsyonlar ile ligasyon kurularak *E.coli*'ye transformasyonu yapıldı. Ancak pozitif koloni görülmeydi.

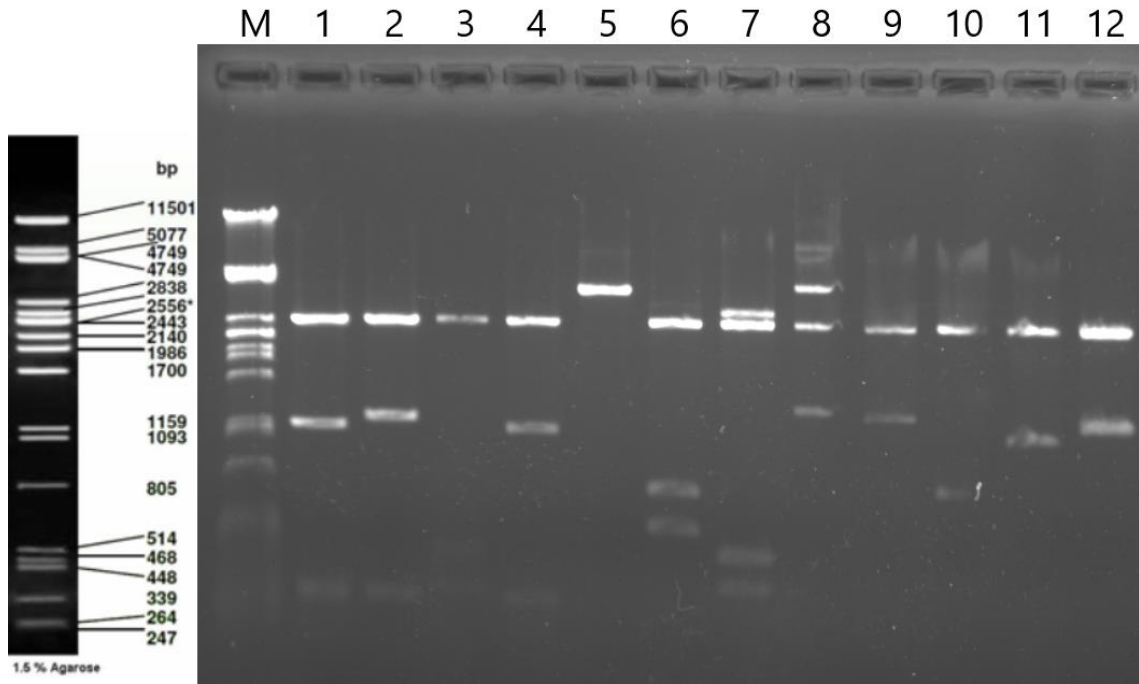


Şekil 3.4 İkincil PZR ürünlerinin jel üzerinde görüntüsü

1. Stres verilmemiş örnek LEF1 primeri ile, 2. Stres verilmemiş örnek LEF2 primeri ile, 3. 6 saat soğuk stresi verilmiş örnek LEF1 primeri ile, 4. 6 saat soğuk stresi verilmiş örnek LEF2 primeri ile PZR, M. λ PstI Marker

KLEF1-1500bp bandı, KLEF2-1200 bandı, 6LEF1-1200 bandı jelden kesilerek saflaştırıldı. Elüsyon konsantrasyonları sırası ile 10 ng, 50 ng, 20 ng olarak ölçüldü. Elüsyonlar ile ligasyon kurularak *E.coli*'ye transformasyonu yapıldı.

Pozitif olduğu koloni PZR ile belirlenen kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmitler, EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilerek insertü içerdiği doğrulandı (Şekil 3.5). Dizinin içinde EcoRI kesim bölgesi olduğu için bazı plazmitlerde çift bant görüldü.



Şekil 3.5 Plazmit kesim jel görüntüsü

M. λ PstI Marker, 1. KLEF1 koloni 3, 2. KLEF1 koloni 4, 3. KLEF1 koloni 6, 4. 6LEF1 koloni 1, 5. 6LEF1 koloni 3, 6. 6LEF1 koloni 5, 7. 6LEF1 koloni 6, 8. KLEF2 koloni 8, 9. KLEF2 koloni 11, 10. KLEF2 koloni 17, 11. KLEF2 koloni 20, 12. KLEF2 koloni 22

3.3.2 Dizin Analizi Sonuçları ve Benzerlik Analizleri

Pozitif kolonilerden KLEF1-3, KLEF1-4 ve KLEF2-22 seçilerek izole edilen plazmitler dizin analizine gönderildi. Dizi analizi sonucunda Poli-A kuyruğu içeren KLEF1-3 1392 bp uzunluğunda, KLEF1-4 1478 bp uzunluğunda ve KLEF2-22 1225 bp uzunluğunda dizi bilgileri elde edilmiştir. Bu dizilerin BLAST analizleri sonucunda en fazla susam, *Erythranthe guttatus*, patates ve diğer bitkilerin triaçil gliserol lipaz dizilerine benzerlik göstermiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Dizi analizi sonuçları

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
XM_011089900.1	PREDICTED: Sesamum indicum triacylglycerol lip...	989	0.0
XM_011089901.1	PREDICTED: Sesamum indicum triacylglycerol lip...	906	0.0
XM_012981444.1	PREDICTED: Erythranthe guttatus triacylglycero...	870	0.0
XM_006339325.2	PREDICTED: Solanum tuberosum triacylglycerol l...	839	0.0
XM_019378647.1	PREDICTED: Nicotiana attenuata triacylglycerol...	820	0.0
XM_019310866.1	PREDICTED: Ipomoea nil triacylglycerol lipase ...	807	0.0
XM_016606083.1	PREDICTED: Nicotiana tabacum triacylglycerol l...	807	0.0
XM_009793276.1	PREDICTED: Nicotiana sylvestris triacylglycero...	807	0.0
XM_015203415.1	PREDICTED: Solanum pennellii triacylglycerol l...	803	0.0
XM_004250606.3	PREDICTED: Solanum lycopersicum triacylglycero...	800	0.0

AK320362.1	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1008BE01, HT...	800	0.0
XM_016700931.1	PREDICTED: Capsicum annuum triacylglycerol lip...	798	0.0
XM_016606085.1	PREDICTED: Nicotiana tabacum triacylglycerol l...	751	0.0
XM_017374005.1	PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus triacy...	735	0.0
XM_018972166.1	PREDICTED: Juglans regia triacylglycerol lipas...	697	0.0
XM_018972164.1	PREDICTED: Juglans regia triacylglycerol lipas...	697	0.0
XM_018972163.1	PREDICTED: Juglans regia triacylglycerol lipas...	697	0.0
XM_018972162.1	PREDICTED: Juglans regia triacylglycerol lipas...	697	0.0
XM_007199826.1	Prunus persica hypothetical protein (PRUPE_ppa...	659	0.0
XM_008238161.2	PREDICTED: Prunus mume triacylglycerol lipase ...	655	0.0
XM_016037345.1	PREDICTED: Ziziphus jujuba triacylglycerol lip...	646	0.0

Elde edilen 3 dizi ClustalO programı ile hizalandığında dizilerin büyük oranda birbirine benzediği görülmüştür (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Hizalanmış diziler

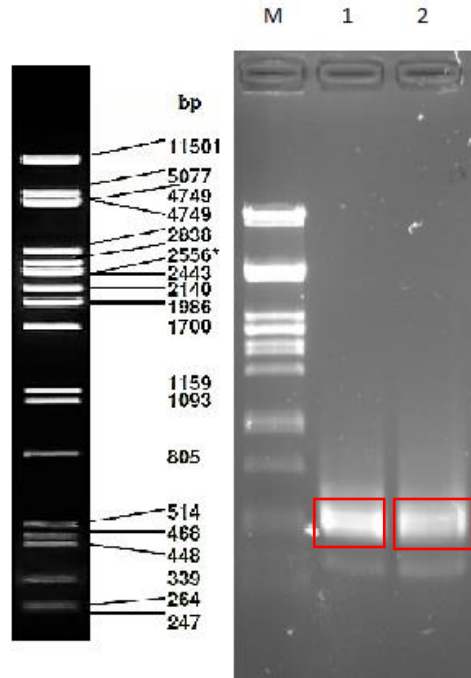
K2_21_M	-----
K1_3_M	cggtgaaagtggcgctcttaagtagtctcctcctgtccgccgtgaagtccgccgaagact
K14_M	cggtgaaagtggcgctcttaagtagtctcctcctgtccgccgtgaagtccgccgaagact
K2_21_M	-----
K1_3_M	tcaacgataccttaaaccctccggcaaaagtcacatgcagctggtctttgcgctcaactca
K14_M	tcaacgataccttaaaccctccggcaaaagtcacatgtagctggtctttgcgctcaactca
K2_21_M	-----
K1_3_M	tcgaacctgctggtttcccttgctcagaacacaatgctcaaacaaaagatggatttgtac
K14_M	tcgaacctgctggtttcccttgctcagaacacaatgctcaaacaaaagatggatttgtac
K2_21_M	-----cgcggtgtcatctagttcttggaatctcagaagacaaaaggggtcctccag
K1_3_M	tgggacttcaacgcgtgtcatctagttcttggaattctcagaagacaaaatgggcctcctg
K14_M	tgggacttcaacgcgtgtcatctagttcttggaattctcagaagacaaaatgggcctcccg *****
K2_21_M	ttctgcttattcatggactttttatggcaggtgatgcatggttcttggataacccaaatc
K1_3_M	ttctgcttatacatggactttttatggcaggtgatgcatggttcttggataacccaaatc
K14_M	ttctgcttatacatggactttttatggcaggtgatgcatggttcttggataacccaaatc *****
K2_21_M	agtccttggggtttatacttgcaaatcgtggttttgatgtctgggttggttaatgtgcgtg
K1_3_M	aatccttggggtttatccttgccaatcgtggttttgatgtctgggttggttaatgtgcgtg
K14_M	aatccttggggtttatccttgccaatcgtggttttgatgtctgggttggttaatgtgcgtg * *****
K2_21_M	ggacacgctggtgtcatggccatgtatctttatcagagaaaagatagggaattctgggatt
K1_3_M	ggacacgctggtgtcatggccatatactttatcagagaaaagataagaaattctgggatt
K14_M	ggacacgctggtgtcatggccatatactttatcagagaaaagataagaaattctgggatt *****
K2_21_M	ggagctggcaggattatgctctttacgacgtgcgagaaatgattcggttatatatacacAG
K1_3_M	ggagttggcaggaatatgctctttacgatctccaagaaatgattcggttatgtatatacac
K14_M	ggagttggcaggaatatgctctttacgatctccaagaaatgattcggttatgtatatacac **** *****
K2_21_M	TtacaaactcgagagtgttTGTCATtgacattctcaggaacaataatttctctggctg
K1_3_M	ttacaaactctagagtgtttgtcattggataattctcaggaacaatcatttctctggctg
K14_M	ttacAaactctagagtgtttgtcattggataTtctcaggaacaatcatttctctggctg *****

K2_21_M K1_3_M K14_M	ccttaactcaaccagacatagtagagatgggttgagcagctgcacttctttgtcctataa cctttactgaaccagatacagtacaaacgggttgagcagctgcgcttctttgtcctataa cctttactgaaccagatacagtacaaatgggttgagcagctgcgcttcTttgtcctataa **** *
K2_21_M K1_3_M K14_M	catatttgaatcatatcactgctagattgcctccttagattagttaaaatgcaccttgatc catatttgaatcatatgactgctcgattgcctccttagattagttaaaatgcaccttactc cataTttgaatcatatgactgctcgattgcctccttagattagttaaaatgcaccttactc ***** *
K2_21_M K1_3_M K14_M	agatttttcttgcaatgggcattcatgaactcaatttcaaaagtgactgggtgactcgca aggttttacttgcaatgggcattcatgaactcaatttcaaaagtgactgggtgactcgca aggttttacttgcaatgggcattcatgaactcaatttcaaaagtgactgggtgactcgca *
K2_21_M K1_3_M K14_M	tcatggatatgatgtgacgacgacatgtagattgtggtgacttgctaacttctgttacag tcatggaaatgatgtgacgacgacatgtagattgtggtgacttgctatcttctattacag tcatggaaatgatgtgacgacgacatgtagattgtggtgacttgctatcttctattacag ***** *
K2_21_M K1_3_M K14_M	ggaagaattgttgcttcaatagctctcggatcgatttctatcttgaatacgaaccgcac ggaagaattgttgcttcaatagctctcggatcgatttctatcttgaatacgaaccgcac ggaagaattgttgcttcaatagctctcggatcgatttctatcttgaatacgaaccgcac ***** *
K2_21_M K1_3_M K14_M	caacatctacaatgaatttgaatcacctctttcagatgatccgtgaaggtactttcgca catcatctacaaaaatttgaatcatctctttcagatgatccgaaaaggtacttttgca catcatctacaaaaatttgaatcatctctttcagatgatccgaaaaggtacttttgca *
K2_21_M K1_3_M K14_M	tgtacaaccatggaaggtggaaaaacatgtggcactatggccaactgaagccacaaaaat agtacgactatggattttggaagaactgaagcactacggccaactgaagccacaaagt agtacgactatggattttggaagaactgaagcactacggccaactgaagccaccaagtt *
K2_21_M K1_3_M K14_M	ttgatccttagccgaattcccagttccttaccattatggatgggatatGgggggaaatgac tcgatctaagccaaattcccagttcattaccattatggatggggtacggg--gaagtgat cgat-c-taagccaattcccagttcattaccattatggatggggtacgg---ggaatgat *
K2_21_M K1_3_M K14_M	gcgttagcagacattacagatttgcagcatactctcaaggaattacaatc-aagccagat gccttagcagacgtcacagatttgcagcatactccaagaaattacaatcaaagccagat gccttagcagacgtcacagATttgcagcatactctcaaggaattacaatcaaagccagat *
K2_21_M K1_3_M K14_M	ttgctctatcttgaaaattatgggtcatctagatttccttgtgagcacgagatcaaaggaa ttgctctatcttgaaaattatgggtcatctagatttcctttaaagcacaagagcaaaggaa ttgctctatcttgaaaattatgggtcatctagatttcctttaaagcacaagagcaaaggaa ***** *
K2_21_M K1_3_M K14_M	gatgtttatgacaaaatgcttgcatTTTTTcaactcactggaacacttagcggtagttact gatgtttatgacaaaatgcttgcatTTTTTcgattcattgggaacacacagcagtt--ct gatgtttatgacaaaatgcttgcatTTTTTcgattcattgggaacacacagcagtt--ct ***** *
K2_21_M K1_3_M K14_M	gattaactgcttgacgtgtgaactggacagcctcgatagtgttaaggaagaaaaaaag aaatgttgga---tcggggaggatcgagagtccttgatagtattaaggaagaaaatttta aaatgttgga---tcggggaggatcgagagtccttgatagtattaaggaagaaaatttta *
K2_21_M K1_3_M K14_M	ttaaaatccttattcattatactttctaataattgtgtatcaaaaaatgcacataggggtta c-----tcttggttcaact-----cttgaagtgaacttgacataggggttg c-----tcttggttcaact-----cttgaagtgaacttgacataggggttg *

K2_21_M	tgtaattgtctactttatcatctaaatttaccgtagtagttaatttaccattttaaagttaa
K1_3_M	tatacttgataaattgtgtgtaaattgtacgcatt----atgtttatgatgtaaataataa
K14_M	tatacttgataaattgtgtgtaaattgtacgcatt----atgtttatgatgtaaataataa
	* *
K2_21_M	tttcatacttttgatggact-----
K1_3_M	tttcataattttccacggaaaaaaag-----
K14_M	tttcataattttccacggattacttattttcagcgtctgtacactagcattgtaaataact
	***** * * * * *
K2_21_M	-----
K1_3_M	-----
K14_M	ttataatggtaacactctgccacaaaaattttaattaatatcttaaagttct

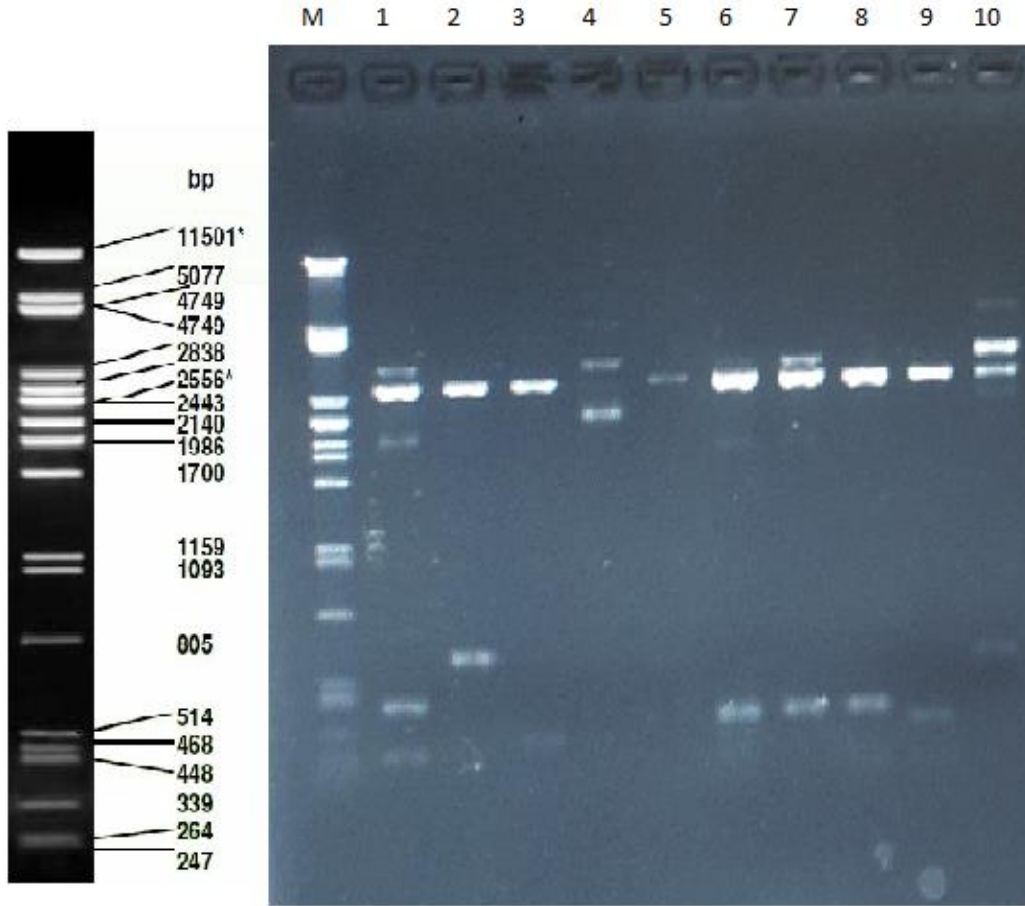
3.4 5'RACE Reaksiyonları

5'RACE reaksiyonları için KLEF1-3 dizi bilgisi kullanılarak dizinin iç kısmından Primer3 Programı kullanılarak LRR1 geri primeri tasarlandı. Clontech Smarter RACE kiti ile ilk zincir cDNA sentezlendikten sonra LRR1 primeri kullanılarak 2.6'da anlatıldığı şekilde PZR reaksiyonları gerçekleştirildi. PZR reaksiyonları agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 3.6). Yaklaşık 500 bp boyutunda bantlar gözlemlendi.



Şekil 3.6 5'RACE reaksiyonların jel üzerinde görüntüsü.
M. λ PstI Marker, 1. Stres verilmemiş LRR1 primeri ile, 2. 6 saat soğuk stresi LRR1 primeri.

PZR ürünleri, Biobasic PZR Pürifikasyon Kiti ile saflaştırılarak PGEMT Easy vektörüne ligasyonu yapıldı. Rekombinant plazmit *E.coli* DH5α kompetent hücrelerine transformasyon ile aktarıldı. Pozitif koloniler koloni PZR ile tarandı ve plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Plazmitler EcoRI enzimi ile kesilerek insert varlığı doğrulandı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Plazmit kesimlerin agaroz jel üzerinde görüntüsü.

M. λ PstI Marker, 1. Kontrol LRR1 koloni 2, 2. Kontrol LRR1 koloni 3, 3. Kontrol LRR1 koloni 4, 4. Kontrol LRR1 koloni 5, 5. Kontrol LRR1 koloni 17, 6. Kontrol LRR1 koloni 18; 7. 6 saat koloni 6, 8. 6 saat koloni 8, 9. 6 saat koloni 9, 10. 6 saat koloni 14.

3.4.1 5'RACE Dizin Analizi ve Benzerlik Analizi

Stres verilmemiş LRR1 koloni 3 (K3) seçilerek izole edilen plazmit dizi analizine gönderildi. K3 dizisinin okunması ile 599 bp uzunluğunda bir dizi bilgisi elde edilmiştir (Tablo 3.4). Dizi ile BLASTn ve BLASTp benzerlik analizleri yapılmıştır ve

dizinin *Solanum* türleri, *Nicotiana* türlerine ait lipaz dizilerine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 K3 dizisi ve BLASTn analizi sonuçları

>K3 ACATGGGGAAACGTGAAAACGGCAAAGCAAATCCACAAATTGTGGGGCGGATGAAATTAT CTGATCATCCTACATTTAACTGCTGTTACTGAAACCGTTGGAGATCTTCCCGCGGTTCTT ATCGGAAGACGATGGAGCTTGCGGCGGCACAGGCGGCGGTGATGATGTTTCTGTAAAGTA GTCTCATCCTGTCCGCCGTGAAGGCCGCCGAAGACTTCGATGGCGCCTCAATCCTCCTGC GAAAGTCACAGTCACCTGTAGCTGGGCTTTGCGCTCAACTCATCGAACCTTCTGGTTTCC CTTGCTCAGAACACAAAACACAAACAAAAGGTGGATTCACTACTGGGACTTCAGCGTGTGT CATCTAGCTCTGGAAATCTCAGAAGACAAAGGGGTCTCCAGTTCTGCTTATTCATGGAC TTTTATGGCAGGTGATGCATGGTTCTTGGATAACCCAAATCAGTCCTTGGGGTTTATAC TTGCAAATCGTGATTTTGTATGTCTGGGTTGGTAATGTGCGTGGGACACGCTGGTGTTCATG GCCATATATCTTTA		
Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 971536342 ref XM_006339325.2 PREDICTED: <i>Solanum tuberosum</i> ...	275	1e-69
gi 970063903 ref XM_015203415.1 PREDICTED: <i>Solanum pennellii</i> ...	268	1e-67
gi 225313218 dbj AK320362.1 <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone...	266	5e-67
gi 1111054743 ref XM_019378648.1 PREDICTED: <i>Nicotiana attenu</i> ...	264	2e-66
gi 1111054741 ref XM_019378647.1 PREDICTED: <i>Nicotiana attenu</i> ...	264	2e-66
gi 1104640579 ref XM_004250606.3 PREDICTED: <i>Solanum lycopers</i> ...	260	2e-65

3.5 3'RACE ve 5'RACE Reaksiyonları ile Elde Edilen DNA Dizilerinin Benzerlik Analizleri

3'RACE ve 5'RACE reaksiyonları ile elde edilen DNA dizileri Emboss Merger Online aracı kullanılarak hizalanmış ve 1554 bp'lık tek dizi olacak birleştirilmiştir. Elde edilen tam uzunluktaki bu dizi kullanılarak BLASTn ve BLASTp analizleri yapılmıştır. Blast analizleri, dizinin başta *Sesamum indicum*, *Erythranthe guttatus*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana attenuata* gibi bitkilerin lipazlarına benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 Birleştirilmiş DNA dizisi ve BLASTn analizi sonuçları

<pre> >contig-k13 ACATGGGGAAACGTGAAAACGGCAAAGCAAATCCACAAATTGAGGGGCGGATGAAATTAT CTGATCATCCTACATTTAACTGCTGTTACTGAAACCGTTGGAGATCTTCCC GCGGTTCTT ATCGGAAGACGATGGAGCTTGCGGCGGCACAGGCGGCGGTGATGATGTTTCTGTTAAGTA GTCTCATCCTGTCCGCGCTGAAGGCCGCCGAAGACTTCGATGGCGCCTCAATCCTCCTGC GAAAGTCACAGTCACATGTAGCTGGGCTTTGCGCTCAACTCATCGAACCTGCTGGTTTCC CTTGCTCAGAACACAAAACACAAACAAAAGATGGATTCACTACTGGGACTTCAACGCGTGT CATCTAGCTCTGGAAATCTCAGAAGACAAAGGGGCCCTCCAGTTCTGCTTATACATGGAC TTTTTCATGGCAGGTGATGCATGGTTCTTGATAACCCAAATCAATCCTTGGGCTTTATAC TTGCAAATCGTGATTTTGTATGTCTGGGTGGTAATGTGCGTGGGACACGCTGGTGTCATG GCCATATATCTTTATCAGAGAAAGATAAGAAATTCTGGGATTGGAGTTGGCAGGAATATG CTCTTTACGATCTCCAAGAAATGATTCGTTATGTATATACAGTTACAACTCTAGAGTGT TTGTCATTGGATATTCTCAGGGAACAATCATTTCTCTGGCTGCCTTTACTGAACCAGATA CAGTACAAATGGTTGGAGCAGCTGCGCTTCTTTGTCTTATAACATATTTGAATCATATGA CTGCTCGATTGCCTCTTAGATTAGTTAAAATGCATCTTACTCAGGTTTTACTTGCAGTGG GCATTCATGAACTCAATTTCAAAGTGACTGGGGTACTCGCATCATGGAAATGATGTGCG ACAGACATGTAGATTGTGGTGACTTGCTATCTTCTATTACAGGGAAGAATTGTTGTTTCA ATAGCTCTCGGATTGATTTCTATCTTGAATATGAACCGCATCCATCATCTACAAAAAATT TGAATCATCTCTTTCAGATGATCCGAAAAGGTACTTTTGCGAAGTACGACTATGGATTTT GGAAGAACTTGAAGCACTACGGCCAACTGAAGCCACCAAAGTTCGATCTAAGCCAAATTC CCAGTTTCAATTACCATTATGGATGGGGTACGGGGGAAGTGATGCCTTAGCAGACGTCACAG ATTTGCAGCATACTCCCAAGAAATTACAATCAAAGCCAGATTTGCTCTATCTTGAAAATT ATGGTCATCTAGATTTCTTTTAAGCACAAAGAGCAAAGGAAGATGTTTATGACAAAATGC TTGCATTTTTCGATTCATTGGGAACACACAGCAGTTACTAAATGTTGGATCGGGGAGGAT CGGAGAGTCTTGATAGTATTAAGGAAGAAAATTTTACTCTTGTTCACTCTTGAAGTGAAC TTGCACATAGGGGTTGTATACTTGTATAATTGTGTGTAAATTGTACGCATTATGTTTATG ATGTAAATATAATTTTCATATTTTCCACGGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA </pre>			
Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
XM_011089900.1	PREDICTED: Sesamum indicum triacylglycerol lip...	960	0.0
XM_011089901.1	PREDICTED: Sesamum indicum triacylglycerol lip...	877	0.0
XM_012981444.1	PREDICTED: Erythranthe guttatus triacylglycero...	857	0.0
XM_006339325.2	PREDICTED: Solanum tuberosum triacylglycerol l...	830	0.0
XM_019378647.1	PREDICTED: Nicotiana attenuata triacylglycerol...	809	0.0
XM_015203415.1	PREDICTED: Solanum pennellii triacylglycerol l...	798	0.0
XM_004250606.3	PREDICTED: Solanum lycopersicum triacylglycero...	796	0.0
XM_016606083.1	PREDICTED: Nicotiana tabacum triacylglycerol l...	796	0.0
XM_009793276.1	PREDICTED: Nicotiana glauca triacylglycero...	796	0.0
AK320362.1	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1008BE01, HT...	796	0.0
XM_016700931.1	PREDICTED: Capsicum annuum triacylglycerol lip...	792	0.0
XM_019310866.1	PREDICTED: Ipomoea nil triacylglycerol lipase ...	782	0.0
XM_016606085.1	PREDICTED: Nicotiana tabacum triacylglycerol l...	742	0.0
XM_017374005.1	PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus triacy...	722	0.0
XM_018972166.1	PREDICTED: Juglans regia triacylglycerol lipas...	706	0.0
XM_018972164.1	PREDICTED: Juglans regia triacylglycerol lipas...	706	0.0
XM_018972163.1	PREDICTED: Juglans regia triacylglycerol lipas...	706	0.0
XM_018972162.1	PREDICTED: Juglans regia triacylglycerol lipas...	706	0.0
XM_007199826.1	Prunus persica hypothetical protein (PRUPE_ppa...	668	0.0
XM_008238161.2	PREDICTED: Prunus mume triacylglycerol lipase ...	664	0.0
XM_016037345.1	PREDICTED: Ziziphus jujuba triacylglycerol lip...	650	0.0
XM_019219139.1	PREDICTED: Vitis vinifera triacylglycerol lipa...	639	6e-179
XR_002029838.1	PREDICTED: Vitis vinifera triacylglycerol lipa...	639	6e-179

Birleştirilen dizinin kodlayıcı kısmının bulunması için NCBI ORF Finder Programı kullanılmıştır. Program yardımıyla dizi içerisindeki başlangıç ve bitiş kodonları bulunarak okuma çerçevesi ve kodladığı aminoasit dizisi belirlemiştir (Tablo 3.5).

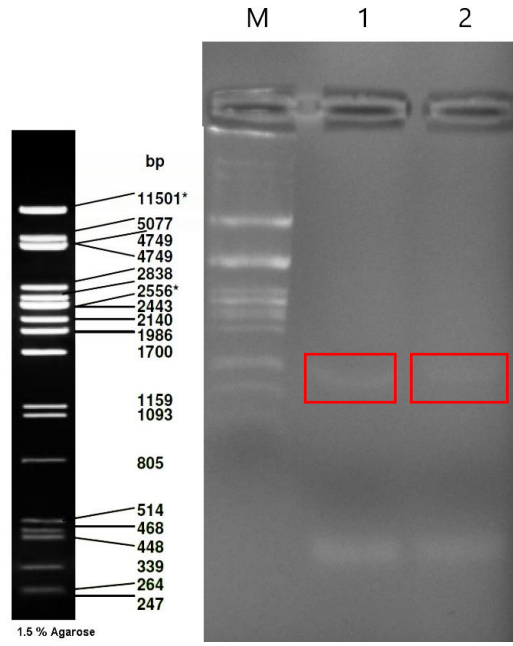
Tablo 3.5 Birleştirilen dizinin kodlayıcı kısmı ve amino asit dizisi.

```
>lcl|contig-k13:132-1361 ORF5 CDS
ATGGAGCTTGC GGCGGCACAGGCGGCGGTGATGATGTTTCTGTTAAGTAGTCTCATCCTGTCCGCCGTGA
AGGCCGCCGAAGACTTCGATGGCGCCTCAATCCTCCTGCGAAAGTCACAGTCACATGTAGCTGGGCTTTG
CGCTCAACTCATCGAACCTGCTGGTTTCCCTTGCTCAGAACACAAAACACAAAACAAAGATGGATTCTATA
CTGGGACTTCAACGCGTGTCTAGCTCTGGAATCTCAGAAGACAAAGGGGCCCTCCAGTTCTGCTTA
TACATGGACTTTTCATGGCAGGTGATGCATGGTTCTTGGATAACCCAAATCAATCCTTGGGCTTTTATACT
TGCAAATCGTGATTTTGATGTCTGGGTTGGTAATGTGCGTGGGACACGCTGGTGTCTATGGCCATATATCT
TTATCAGAGAAAAGATAAGAAATCTGGGATTGGAGTTGGCAGGAATATGCTCTTTACGATCTCCAAGAAA
TGATTCGTTATGTATATACAGTTACAAACTCTAGAGTGTGTTGTCATTGGATATTTCTCAGGGAACAATCAT
TTCTCTGGCTGCCTTTACTGAACCAGATACAGTACAAATGGTTGGAGCAGCTGCGCTTCTTTGTCCTATA
ACATATTTGAATCATATGACTGCTCGATTGCCTCTTAGATTAGTTAAAATGCATCTTACTCAGGTTTTAC
TTGCAGTGGGCATTCATGAACCTCAATTTCAAAAGTGAAGTGGGTTACTCGCATCATGGAAATGATGTGCGA
CAGACATGTAGATTGTGGTGAAGTGTCTATCTTCTATTACAGGGAAGAATTGTTGTTTCAATAGCTCTCGG
ATTGATTTCTATCTTGAATATGAACCGCATCCATCATCTACAAAAAATTTGAATCATCTCTTTCAGATGA
TCCGAAAAGGTACTTTTGCAGAGTACGACTATGGATTTTGAAGAAGTGAAGCACTACGGCCAACTGAA
GCCACCAAAGTTCGATCTAAGCCAAATCCCAGTTTATTACCATTATGGATGGGGTACGGGGGAAGTGAT
GCCTTAGCAGACGTACAGATTTGCAGCATACTCCCAAGAAATTACAATCAAAGCCAGATTTGCTCTATC
TTGAAAATTATGGTCATCTAGATTTTCTTTTAAAGCACAAGAGCAAAGGAAGATGTTTATGACAAAATGCT
TGCATTTTTCGATTCATTGGGAACACACAGCAGTTACTAA
```

```
>lcl|ORF5_contig-k13:132:1361 unnamed protein product
MELAAAQAAVMMFLLSSLILSAVKAEDFDGASILLRKSQSHVAGLCAQLIEPAGFPCSEHKTQTKDGF I
LGLQRVSSSSGNLRRQRGPPVLLIHGLFMAGDAWFLDNPNQSLGFILANRDFDVWGNVRGTRWCHGHIS
LSEKDKKFWDWSWQEYALYDLQEMIRYVYTVTNSRVFVIGYSQGTIIISLAAFTPEPTVQMVGAAALLCPI
TYLNHMTARLPLRLVKMHLTQVLLAVGIHELNFKSDWGTRIMEMMCDRHVDCGDLSSITGKNCCFNSSR
IDFYLEYEPHPSSTKNLNHLFQMIKGTFAKYDYGFWKNLKHGQLKPPKFDLSQIPSSLPLWMGYGGSD
ALADVTDLQHTPKKLQSKPDLLYLENYGHLDLFLSTRAKEDVYDKMLAFFDSLGHSSY
```

3.6 Tam Uzunluktaki cDNA'nın Klonlanması

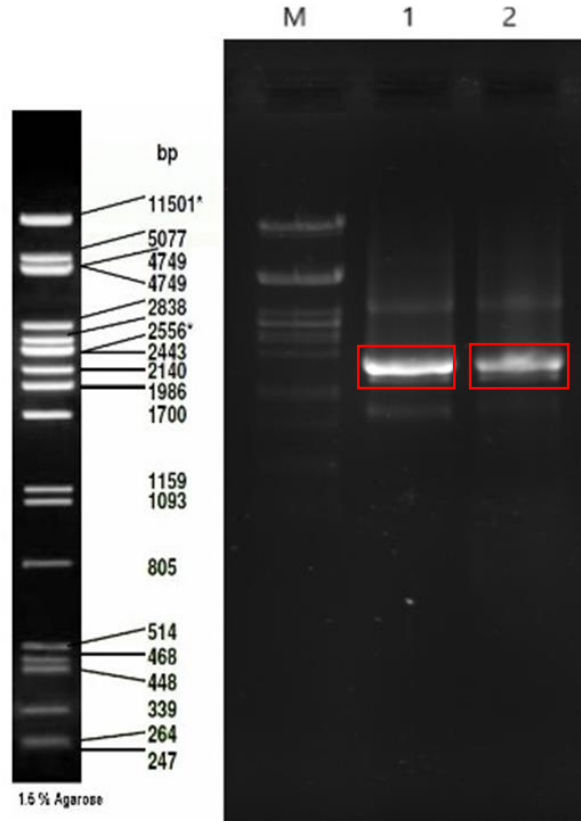
Tam uzunluktaki cDNA'nın bütün halinde klonlanabilmesi için birleştirilmiş dizinin 5' ucundan LFF1 ve LFF2 primeri tasarlanmıştır. LFF2 primeri ve Oligo dT primeri kullanılarak 2.8'de anlatıldığı şekilde ilk PZR yapıldı ve agaroz jel üzerinde görüntüldü (Şekil 3.8). Jelde 1100bp civarında bir bant görüldü.



Şekil 3.8 PZR ürünlerinin jel üzerinde görüntüsü.

M. Lambda PstI Marker, 1. Kontrol LFF2 primeri ile PZR, 2. 4 saat LFF2 primeri ile PZR.

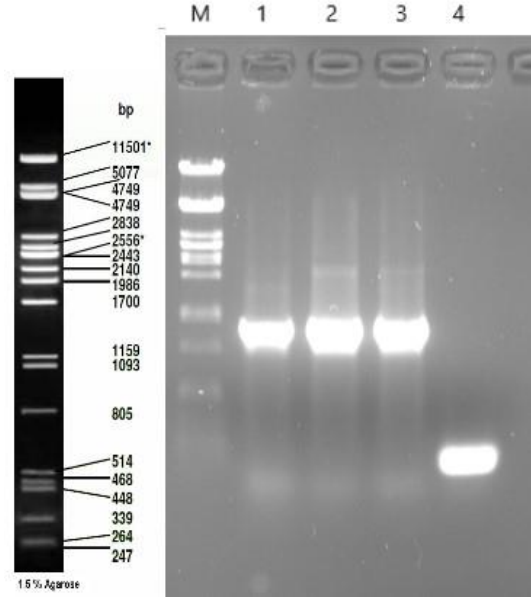
Özgüllüğü ve ürün konsantrasyonunu arttırmak için PZR ürünü kalıp olarak kullanılarak LFF1 primeri ile ikincil bir PZR yapıldı. PZR'ın agaroz jelinde 1300bp civarında parlak bir bant, 3000bp ve 900 bp civarı iki bant gözlemlendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 İkincil PZR ürünlerinin agaroz jel üzerinde görüntüsü.

M. Lambda PstI Marker, 1. Kontrol LFF1 primeri ile PCR, 2. 4 saat LFF1 primeri ile PZR.

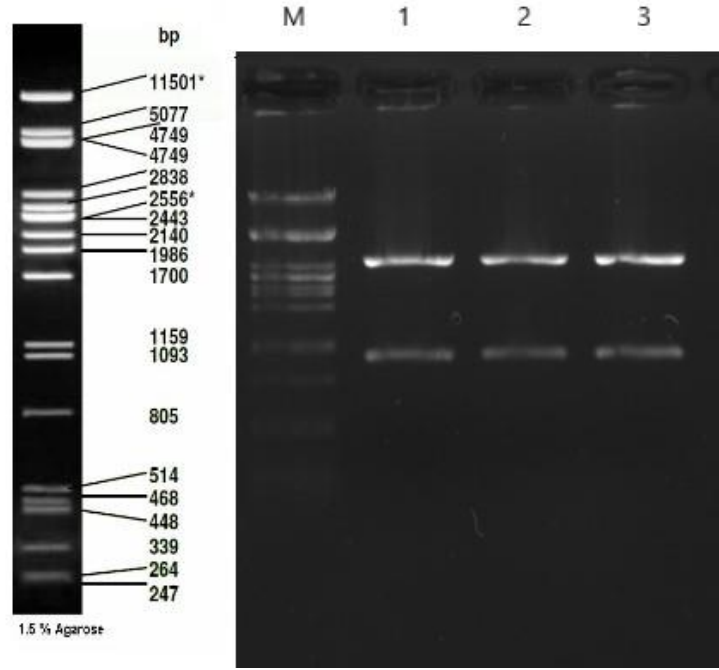
Parlak olan banda ait PZR ürünleri agaroz jelden kesilerek Biomatik Spinclean Jel DNA Ekstraksiyon Kiti ile saflaştırıldı ve PGEMT Easy vektörüne aktarıldı. Rekombinant vektörün kompetent DH5α hücrelerine transformasyonu yapılarak PZR ile koloniler tarandı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Koloni PZR agaroz jel görüntüsü

M. Lambda PstI Marker, 1. Stres verilmemiş örnek LFF1 primeri ile koloni 1, 2. Stres verilmemiş örnek LFF1 primeri ile koloni 3, 3. 4 saat soğuk stresi verilmiş LFF1 primeri ile koloni 4, 4. 4 saat soğuk stresi verilmiş LFF1 primeri ile koloni 5

Koloni PCR sonucunda pozitif görünen koloniler seçilerek bunlardan plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmitlerin insert cDNA'yı içerdiğini doğrulamak için plazmitler EcoRI ve PstI kesim enzimleri ile kesilip agaroz jel üzerinde kontrol edildi (Şekil 3.11). Pozitif görünen 3 plazmit de dizin analizine gönderildi.



Şekil 3.11 EcoRI ve PstI enzimleri ile kesilen plazmitlerin agaroz jel görüntüsü
M. λ PstI Marker ,1. Stres verilmemiş örnek LFF1 primeri ile plazmit 1, 2. Stres verilmemiş örnek LFF1 primeri ile plazmit 3, 3. 4 saat soğuk stresi verilmiş örnek LFF1 primeri ile plazmit 8

3.7 Tam Uzunluktaki cDNA Dizisinin Biyoinformatik Analizleri

Dizi analizi sonucunda KLFF1-3 dizisinin 1561 bp uzunluğunda ve 4SLFF1-8 dizisinin 1546 bp uzunluğunda olduğu görülmüştür. İki dizinin hizalanması sonucu birkaç nükleotidlik fark dışında aynı oldukları görülmüştür (Tablo 3.6). Bu farklılık dizi okuma hatalarından kaynaklanıyor olabilir.

Tablo 3.6 Tam uzunlukta klonlanan dizilerin hizalama analizi

K1-3: Stres verilmemiş örnek LFF1 primeri ile koloni 3, 4S-8: 4 saat soğuk stresi verilmiş örnek LFF1 primeri ile koloni 8'e ait dizi.

K1-3	cgattatggagcttgccggcgccacagcgccggtgatgatgtttctgttaagtagtctca	60
4S-8	-----ATGGAGCTTGCGGCGGCACAGCGCGGTGATGATGTTCTGTAAAGTAGTCTCA	55

K1-3	tccctgtccgcccgtgaaggccgccaagacttcgatggcgccctcaatcctcctgcgaaagt	120
4S-8	TCCTGTCCGCCGTGAAGGCCGCCGAAGACTTCGATGGCGCCTCAATCCTCCTGCGAAAGT	115

K1-3	cacagtcacctgtagctgggctttgcgctcaactcatcgaaccttctggtttcccttgct	180
4S-8	CACAGTCACCGTAGCTGGGCTTTGCGCTCAACTCATCGAACCTTCTGGTTTCCCTTGCT	175

K1-3	cagaacacaaaacacaaaacaaaagatggattcatactgggacttcagcgtgtgtcatcta	240
4S-8	CAGAACACAAAACACAAAAGATGGATTCACTACTGGGACTTCAGCGTGTGTCATCTA	235

K1-3	gctctggaaatctcagaagacaaaggggtcctccagttctgcttattcatggacttttta	300
4S-8	GCTCTGGAAATCTCAGAAGACAAAGGGGTCTCCAGTTCTGCTTATTCATGGACTTTTTA	295

K1-3	tggcaggtgatgcatggttcttggataacccaaatcagtccttggggtttatacttgcaa	360
4S-8	TGGCAGGTGATGCATGGTCTTGGATAACCCAAATCAGTCCTTGGGGTTTATACTTGCAA	355

K1-3	atcgtgattttgatgtctgggttggtaatgtgctgggacacgctggtgtcatggccatg	420
4S-8	ATCGTGATTTTGATGTCTGGGTGGTAATGTGCGTGGGACACGCTGGTGTCATGGCCATG	415

K1-3	tatctttatcagagaaagatagggaaattctgggattggagctggcaggattatgctcttt	480
4S-8	TATCTTTATCAGAGAAAGATAGGGAATTCTGGGATTGGAGCTGGCAGGATTATGCTCTTT	475

K1-3	acgatgtgcgagaaatgattcgttatatatacacagttacaaactcgagagtgtttgtca	540
4S-8	ACGATGTGCGAGAAATGATTCGTTATATACACAGTTACAACTCGAGAGTGTTTGTCA	535

K1-3	ttggacattctcaggaacaataatttctctggctgccttaactcaaccagacatagtag	600
4S-8	TGGACATTCTCAGGGAACAATAATTCTCTGGCTGCCTTAACTCAACCAGACATAGTAG	595

K1-3	agatgGTtggagcagctgcacttcttctgtcctatAacatatttgaatcatatcactgcta	660
4S-8	AGATGTTTGGAGCAGCTGCACCTCTTGTCTTATAACATATTGAATCATATCACTGCTA	655

K1-3	gattgcctcttagattagttaaaatgcaccttgatcagggttttcttgcaatgggcattc	720
4S-8	GATTACCTCTTAGATTAGTTAAAATGCACCTTGATCAGGTTTTCTTGCAATGGGCATTC	715
	**** *****	
K1-3	atgaactcaattccaaaagtgactggtgtactcgcacatcatggatatgatgtgcgacggac	780
4S-8	ATGAACCTCAATTCAAAAGTGACTGGGTACTCGCATCATGGATATGATGTGCGACGGAC	775
	***** *****	
K1-3	atgtagattgtggtgacttgctaacttctgttacaggaagaattggtgcttcaatagct	840
4S-8	ATGTAGATTGTGGTGACTIONGCTAACTCTGTATAGGAAGAATTGTTGCTTCAATAGCT	835
	***** *****	
K1-3	ctcggatcgatttctatcttgaatacgaaccgcatccaacatctacaatgaatttgaatc	900
4S-8	CTCGGATCGATTTCTATCTTGAATACGAACCGCATCCAACATCTACAATGAATTGAATC	895

K1-3	atctctttcagatgatccgtgaaggtactttcgcgatgtacaacctatggaaggtgaaaa	960
4S-8	ATCTCTTTCAGATGATCCGTGAAGGTACTTTGCGGATGTACAACCATGGAAGGTGAAAA	955

K1-3	acatgtggcactatgtccaactgaagccaccaaatttgatcttagccgaattcccagtt	1020
4S-8	ACATGTGGCACTATGGCCAACGAAGCCACCAAAATTGATCTTAGCCGAATCCCAGTT	1015

K1-3	ccttaccattatggatgggatatgggggaaatgacgcgttagcagacattacagatttgc	1080
4S-8	CCTTACCATTATGGAGGGGATATGGGGGAAATGACGCGTTAGCAGACATTACAGATTGTC	1075

K1-3	agcatactctcaaggaattacgatcaaagccagatttgctctatcttgaaaattatggtc	1140
4S-8	AGCATACTCTCAAGGAATTACGATCAAAGCCAGATTGCTCTATCTTGAAAATTATGGTC	1135

K1-3	atctagatttcttctgtgagcagagatcaaaggaagatgtttatgacaaaatgcttgcat	1200
4S-8	ATCTAGATTTCCTTGTGAGCAGAGATCAAAGGAAGATGTTTATGACAAAATGCTTGCAT	1195

K1-3	ttttcaactcactggaacacttagcgggtggtcactgattaactgcttggacgggtgaact	1260
4S-8	TTTTCAACTCACTGGAACACTTAGCGGTGGTCACTGATTAAGTCTTGACGGGTGAAC	1255

K1-3	ggacagcctcgatagtgttaaggaagaaaaaaattaaaatcttattcattatactttt	1320
4S-8	GGACAGCCTCGATAGTGTTAAGGAAGAAAAAAATTAATCTTATTCATTATACCTTT	1315

K1-3	ctaataattgtgtatcaaaaaatgcacataggggtaattgtagttgtctacttatcatctaa	1380
4S-8	CTAATATTGTGTAACAAAAATGCACATAGGGTAATGTAGTTGTCTACTTATCATCTAA	1375

K1-3	atttaccgtagtagttaatttaccatttaaatgtaatttcatacttttgatggactactt	1440
4S-8	ATTTACCGTAGTAGTTAATTTACCATTTAAATGTAATTCATACTTTTGGTGGACTACTT	1435

K1-3	gttgctcagtgctctctacacgagtagttgtaaataactttataatggtaatggattatcac	1500
4S-8	GTTGCTCAGTGCTCTCTACACGAGTATTGTAATAACTTTATAATGGTAATGGATTATCAC	1495

K1-3	caaatttcaataaagtagtttgaagttttgtttcaaaaaaaagaaaaaaaaaaaaa	1560
4S-8	CAAATTTCAATAAAGTATTTGAAAGTTTGTGTTTAAAAAATAAAAAA-----	1546

K1-3	a	1561
4S-8	-	1546

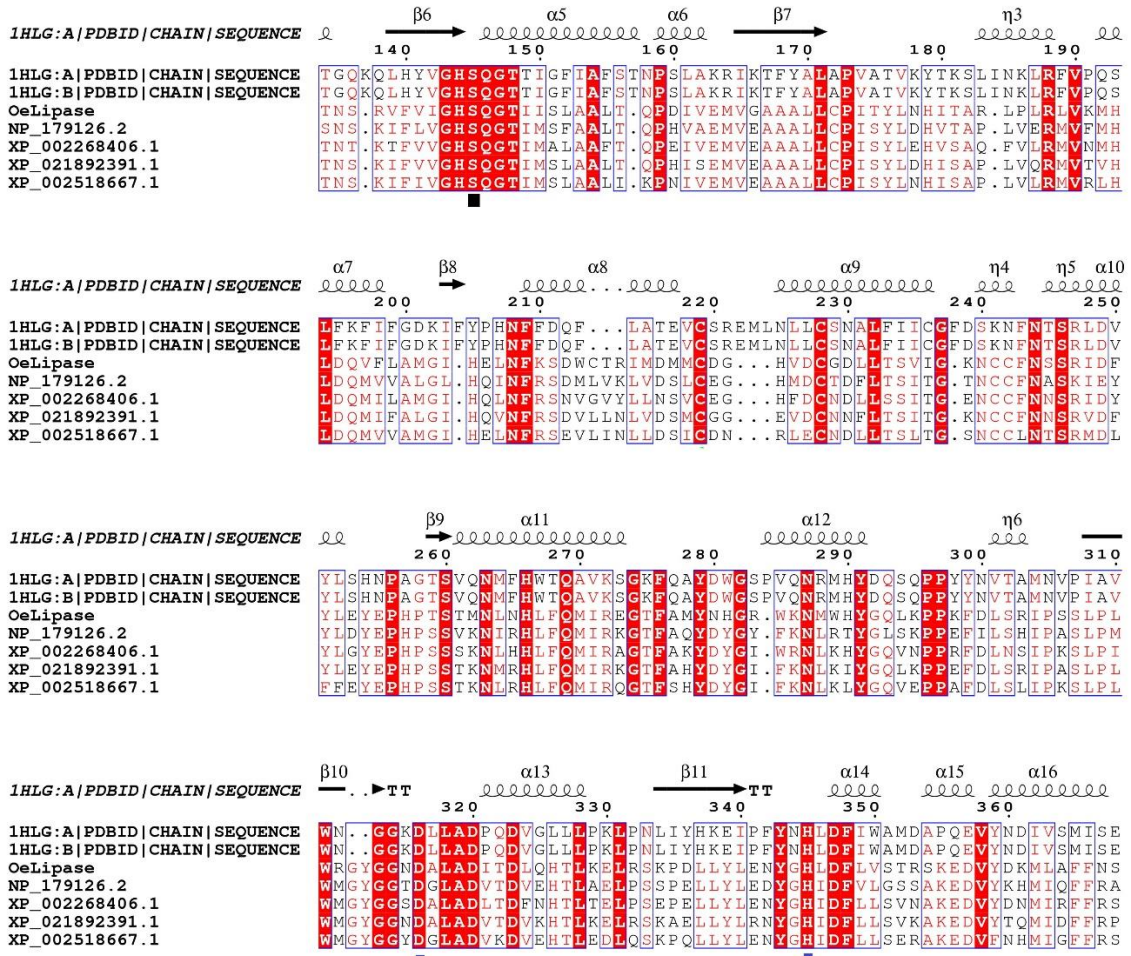
Tam uzunluktaki cDNA'nın okuma çerçevesi 1236 bp uzunluğundadır ve 412 amino asitlik bir kod içermektedir (Tablo 3.7). Dizi nükleotid bilgisi MG663218.2 ve amino asit dizisi AZP23792.2 erişim numarası ile NCBI veritabanlarına giriş yapılmıştır. *Olea europaea* var. *europaea* yaprak lipazına ait nükleotid dizisi Kasım 2017 NCBI veri tabanına girişi yapılan *Olea europaea* var. *sylvestris* triaçil gliserol lipaz 1'in üç transkript varyantına %84,67-89,41 benzerlik göstermektedir [150]. En fazla transkript varyant X3'e benzemektedir.

Tablo 3.7 Tam uzunlukta klonlanan dizinin okuma çerçevesi

ATGGAGCTTGCGGCGGCACAGGCGCGGTGATGATGTTTCTGTAAAGTAGTCTCATCCTG	60
M E L A A A Q A A V M M F L L S S L I L	
TCCGCCGTGAAGGCCGCCGAAGACTTCGATGGCGCCTCAATCCTCCTGCGAAAGTCACAG	120
S A V K A A E D F D G A S I L L R K S Q	
TCACCCGTAGCTGGGCTTTGCGCTCAACTCATCGAACCTTCTGGTTTCCCTTGCTCAGAA	180
S P V A G L C A Q L I E P S G F P C S E	
CACAAAACACAAACAAAGATGGATTCTACTGGGACTTCAGCGTGTGTCTAGCTCT	240
H K T Q T K D G F I L G L Q R V S S S S	
GGAAATCTCAGAAGACAAAGGGTCCTCCAGTTCTGCTTATTCATGGACTTTTTATGGCA	300
G N L R R Q R G P P V L L I H G L F M A	
GGTGATGCATGGTTCTTGGATAACCCAAATCAGTCCTTGGGGTTTATACTTGCAAATCGT	360
G D A W F L D N P N Q S L G F I L A N R	
GATTTTGATGTCTGGGTTGGTAATGTGCGTGGGACACGCTGGTGTCTATGGCCATGTATCT	420
D F D V W V G N V R G T R W C H G H V S	
TTATCAGAGAAAGATAGGGAATTCTGGGATTGGAGCTGGCAGGATTATGCTCTTTACGAT	480
L S E K D R E F W D W S W Q D Y A L Y D	
GTGCGAGAAATGATTCGTTATATATACACAGTTACAACTCGAGAGTGTGTCATTGGA	540
V R E M I R Y I Y T V T N S R V F V I G	

CATTCTCAGGGAACAATAATTTCTCTGGCTGCCTTAACTCAACCAGACATAGTAGAGATG	600
H S Q G T I I S L A A L T Q P D I V E M	
GTTGGAGCAGCTGCACTTCTTTGTCTATAACATATTTGAATCATATCACTGCTAGATTA	660
V G A A A L L C P I T Y L N H I T A R L	
CCTCTTAGATTAGTTAAAATGCACCTTGATCAGGTTTTTCTTGCAATGGGCATTCATGAA	720
P L R L V K M H L D Q V F L A M G I H E	
CTCAATTTCAAAGTGACTGGTGTACTCGCATCATGGATATGATGTGCGACGGACATGTA	780
L N F K S D W C T R I M D M M C D G H V	
GATTGTGGTGACTTGCTAACTTCTGTTATAGGGAAGAATTGTTGCTTCAATAGCTCTCGG	840
D C G D L L T S V I G K N C C F N S S R	
ATCGATTTCTATCTTGAATACGAACCGCATCCAACATCTACAATGAATTTGAATCATCTC	900
I D F Y L E Y E P H P T S T M N L N H L	
TTTCAGATGATCCGTGAAGGTACTTTTCGCGATGTACAACCATGGAAGGTGGAAAAACATG	960
F Q M I R E G T F A M Y N H G R W K N M	
TGGCACTATGGCCAACTGAAGCCACCAAAATTTGATCTTAGCCGAATCCCAGTTCCTTA	1020
W H Y G Q L K P P K F D L S R I P S S L	
CCATTATGGAGGGGATATGGGGGAAATGACGCGTTAGCAGACATTACAGATTTGCAGCAT	1080
P L W R G Y G G N D A L A D I T D L Q H	
ACTCTCAAGGAATTACGATCAAAGCCAGATTTGCTCTATCTTGAAAATTATGGTCATCTA	1140
T L K E L R S K P D L L Y L E N Y G H L	
GATTTCTTGTGAGCACGAGATCAAAGGAAGATGTTTATGACAAAATGCTTGCAATTTTTC	1200
D F L V S T R S K E D V Y D K M L A F F	
AACTCACTGGAACACTTAGCGGTGGTCACTGATTA	1236
N S L E H L A V V T D *	

Lipazlar taşıdıkları korunmuş diziye göre GX SXG ve GDSL lipazları olmak üzere ikiye ayrılır [24], [25]. Zeytin yaprak lipazının taşıdığı GHSQG motifi nedeni ile GX SXG lipaz ailesine dahil olduğu görülmüştür (Şekil 3.12). Bu pentapetidin ortasında bulunan Serin-182 katalitik üçlünden biridir. Histidin-379 ve Aspartik asit-350 katalitik üçlünün diğer üyeleridir.

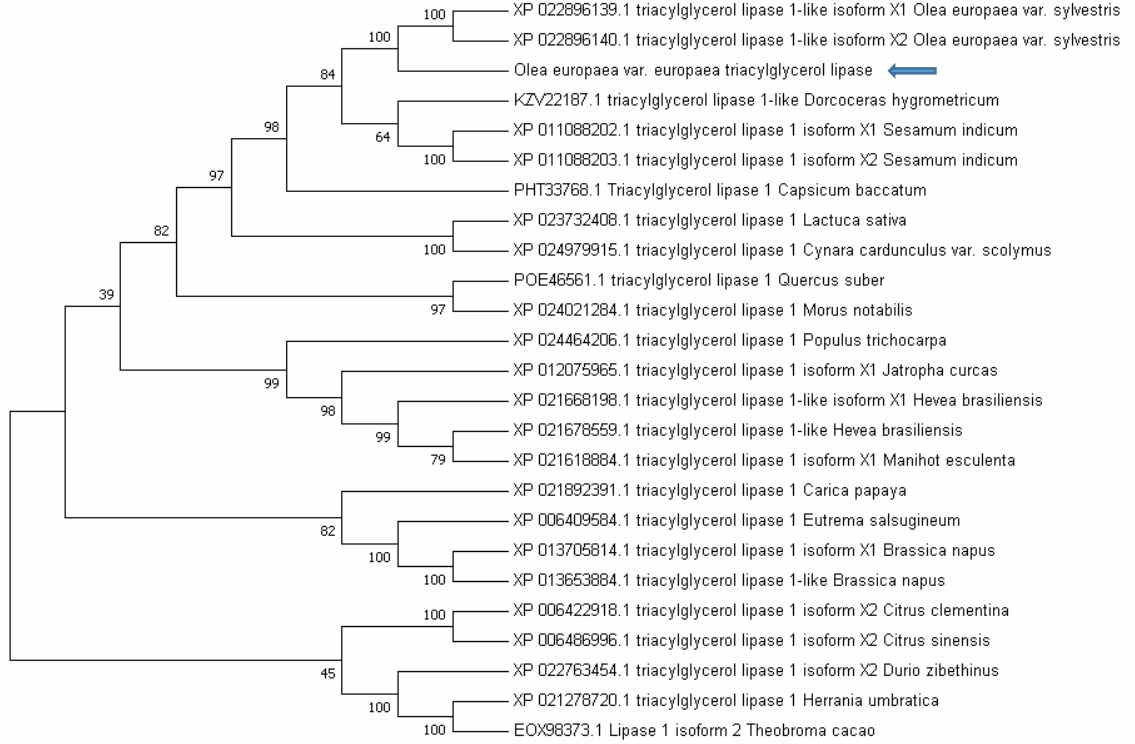


Şekil 3.12 Hizalanmış lipaz dizileri ve Espiript programı ile tahmin edilen ikincil yapılar

Katalitik üçlüdeki Ser-182 siyak kare ile işaretli, His-379 ve Asp-350 mavi kare işaretli. (NP_179126.2 *Arabidopsis thaliana*, XP_002268406.1 *Vitis vinifera*, XP_021892391.1 *Carica papaya*, XP_002518667.1 *Ricinus communis*)

3.8 Filogenetik Analiz

Filogenetik ağaç, NCBI veritabanından alınan 25 aminoasit dizisi ile oluşturulmuştur (Şekil 3.13). En yakın akraba olan lipazlar yabani zeytine ait lipaz 1 varyantlarıdır. Bunların Gemlik kültürü yaprak lipazına benzerliği %98,05-85,19 arasında değişmektedir. Bir yağ bitkisi olan susama ait lipaz 1 izoformları zeytin lipazına en yakın akraba olan lipazlardır. Bunların benzerliği %74,75-72,48 arasındadır. Diğer yakın bir akraba *Dorcoceras hygrometricum* lipaz 1 proteinidir. Zeytin yaprak lipazının *Carica papaya* ve *Brassica napus* lipazlarına da akrabalık gösterdiği görülmektedir.

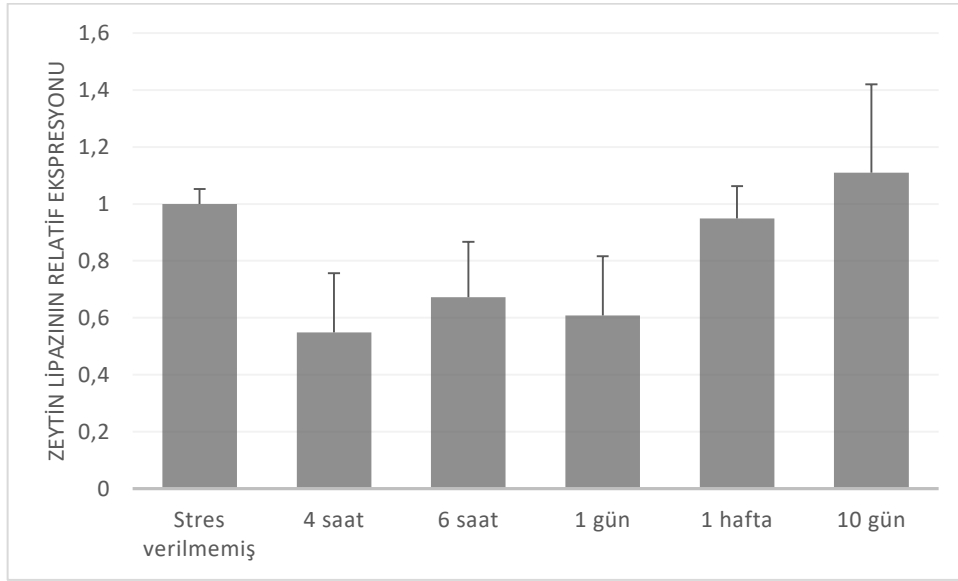


Şekil 3.13 MEGA7 programı ile oluşturulan filogenetik ağaç

3.9 Zeytin Yaprak Lipazının Soğuk Stresinde Ekspresyon Düzeylerinin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

Lipazın, 10 güne kadar uygulanan soğuk stresindeki ekspresyon profili Gerçek Zamanlı PZR ile analiz edilmiştir. Lipaz ekspresyon düzeylerinde ilk 4 saatte düşüş görülmektedir (Tablo 3.6). Ekspresyon düzeyinin altıncı saatte artıp 24 saat sonunda tekrar düşmüş olduğu görülmektedir. Uzun vadede ise ekspresyon düzeyi artarak stres öncesi seviyenin üzerine çıkmaktadır.

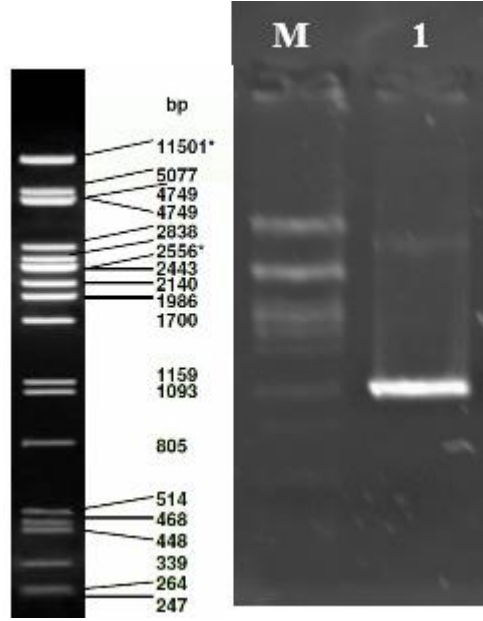
Tablo 3.8 Zeytin yaprak lipazının rölatif ekspresyon düzeyleri



3.10 Zeytin Yaprak Lipazının *Pichia pastoris*'te Ekspresyonu

3.10.1 Lipaz cDNA'sının Ekspresyon Vektörleri ile çoğaltımı

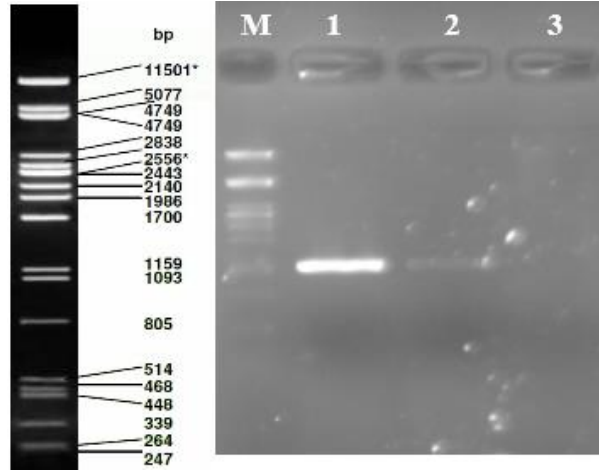
Lipaz cDNA'sı, enzim kesim bölgeleri içeren LENSF2 ve LER primerleri kullanılarak 2.11 bölümünde anlatıldığı şekilde PCR ile  o altılmı tır. Şekil 3.14'te görülen PCR  r nleri agaroz jelden kesilerek safla tırılmı tır.



Şekil 3.14 LENSF2 ve LER primerleri ile çoğaltılan cDNA'nın agaroz jel üzerinde görüntüsü

M. λ PstI Marker, 1. LENSF2 ve LER primerleri ile çoğaltılan PCR ürünü

İzole edilen cDNA'nın PGEMT Easy vektörüne ligasyonu yapılarak DH5 α *E.coli* hücrelerine aktarıldı. Koloniler koloni PCR ile tarandı (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 Koloni PCR jel görüntüsü.

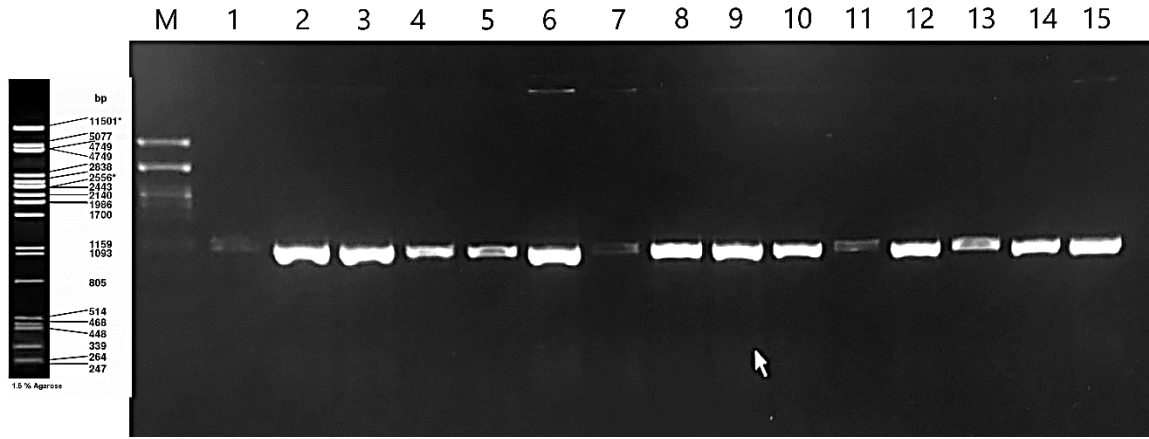
M. λ PstI Marker, 1. Koloni 6, 2. Koloni 8, 3. Koloni 9.

Pozitif görünen 6 ve 8 numaralı kolonilerden plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Plazmitler cDNA varlığını doğrulamak için EcoRI enzimi ile kesildi. Kesim sonucunda istenilen cDNA'yı taşıdığı düşünülen plazmitler P6 ve P8 adıyla dizi analizine gönderildi. P6 ve P8 dizilerinin lipaza ait olduğu doğrulandı. P6 dizisinde

kesim bölgesinde mutasyon olduğu görüldü. P8'de ise herhangi bir çerçeve kayması olmadığı doğrulandı.

3.10.2 Lipaz cDNA'sının pPICZαA Vektörüne Aktarılması ve *E.coli*'de Çoğaltılması

PGEMT Easy vektörü içindeki lipaz cDNA'sı KpnI ve NotI enzimleri ile kesilerek jele yüklendi. pPICZαA vektörü de KpnI ve NotI kesim enzimleri ile kesildi. cDNA ile vektörün 5:1 oranında ligasyonu yapıldı. Rekombinant plazmit *Pichia pastoris*'e aktarılmadan önce *E. coli* hücrelerine aktarıldı ve Zeocin içeren LB besiyerinde büyütüldü. Seçilen koloniler PCR ile tarandı (Şekil 3.16).

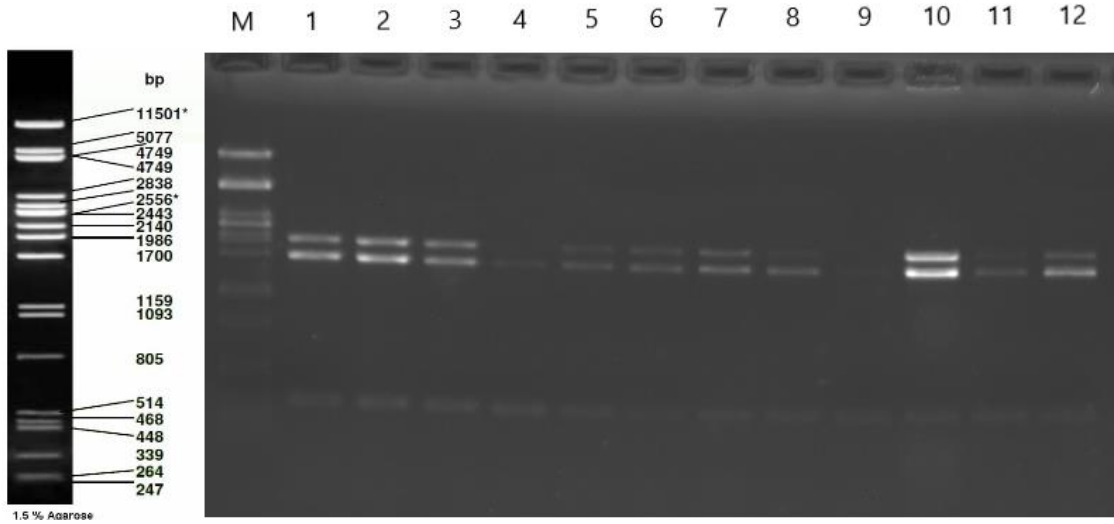


Şekil 3.16 Koloni PCR ürünlerinin jel üzerinde görüntüsü

M.Lambda PstI Marker, Koloni 1 PCR, Koloni 2 PCR, Koloni 3 PCR, Koloni 4 PCR, Koloni 5 PCR, Koloni 6 PCR, Koloni 7 PCR, Koloni 8 PCR, Koloni 9 PCR, Koloni 10 PCR, Koloni 11 PCR, Koloni 12 PCR, Koloni 13 PCR, Koloni 14 PCR, Koloni 15 PCR

3.10.3 Rekombinant pPICZαA Vektörün *Pichia pastoris*'e Genomuna Entegrasyonu

Koloni PCR sonrası seçilen 8 numaralı koloniden plazmit izole edilerek SacI enzimi ile kesilerek lineerize edildi. Lineer plazmit kimyasal yöntemle kompetent hale getirilen *P.pastoris* X33 hücrelerine transformasyonla aktarıldı. Transformasyon sonucu aktarılan DNA'nın *P.pastoris* genomuna entegrasyonunun kontrolü için kolonilerden genomik DNA izolasyonu yapılarak PCR ile tarandı (Şekil 3.17). PCR sonucunda *P.pastoris*'in kendi AOX1 genine ait yaklaşık 2.2 kb'lık bir bant ve AOX1 promotorunun önüne eklenen lipaz cDNA'sının oluşturduğu yaklaşık 1700 bp'lik bant tüm kolonilerde görülmüştür.

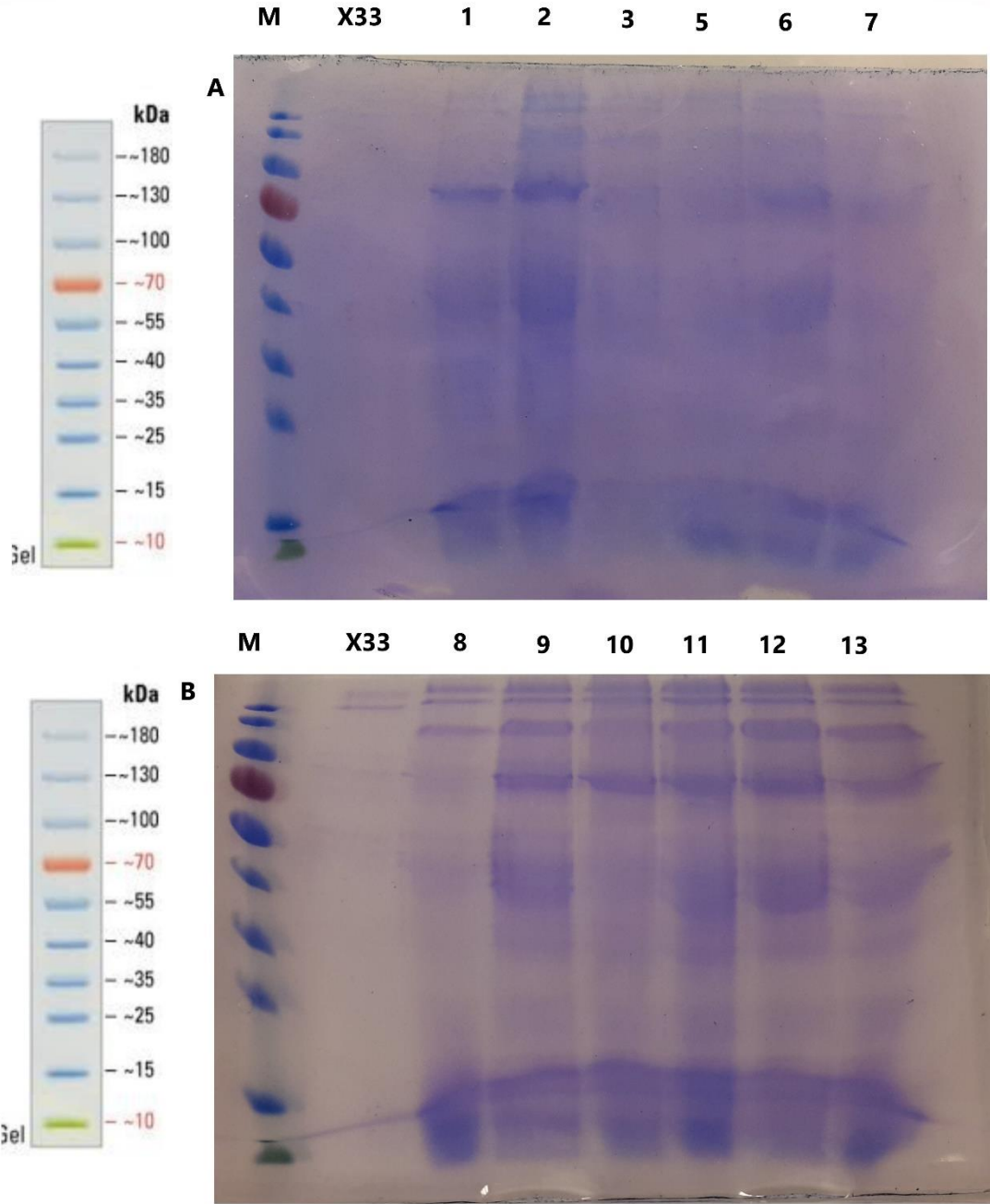


Şekil 3.17 Maya koloni PCR jel görüntüsü

M. Lambda PstI Marker, 1. Koloni 1 PCR, 2. Koloni 2 PCR, 3. Koloni 3 PCR, 4. Koloni 5 PCR, 5. Koloni 5 PCR, 6. Koloni 7 PCR, 7. Koloni 8 PCR, 8. Koloni 9 PCR, 9. Koloni 10 PCR, 10. Koloni 11 PCR, 11. Koloni 12 PCR, 12. Koloni 13 PCR

3.10.4 Zeytin Lipaz cDNA'sının *P. Pastoris*'te Küçük Ölçekli Ekspresyonu

P. pastoris X-33 kolonileri ve pozitif görünen 12 koloni BMMY besiyerinde 24 saatte bir metanol eklenerek 72 saat büyütülmüştür. 12 koloniye ait ekstraselüler sıvıdaki proteinler %80 amonyum asetat ile çöktürülmüş ve SDS-PAGE yapılarak yüksek miktarda eksprese olmuş bir bant olup olmadığı analiz edilmiştir (Şekil 3.18).

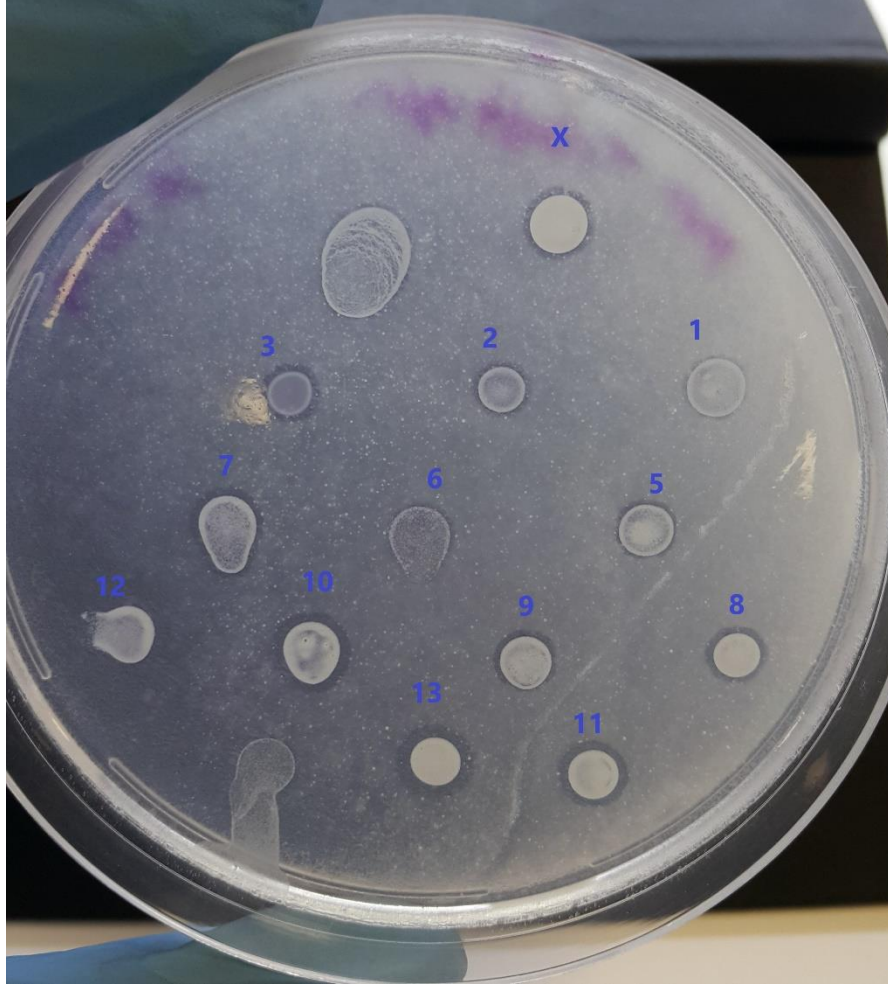


Şekil 3.18 SDS-PAGE üzerinde X33 ve pozitif kolonilerin ekstraselüler sıvısındaki proteinlerin karşılaştırılması

3.10.5 Tribütirin Petri Deneyi ile Kolonilerinde Aktivite Taranması

SDS-PAGE ile yüksek miktarda eksprese olan belirgin bir bant gözlemlenmediği için Tribütirin petri aktivite deneyi yapılarak yüksek aktivite gösteren koloniler tarandı. Lipaz tribütirini kullanarak kolonilerin etrafında şeffaf alanlar oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 3.19). Bu alanın fazla olması lipaz aktivitesinin daha yüksek

olduğunu göstermektedir. Tribütirinli besiyerinde 2, 3, 10, 11, 13 kolonilerinin aktivitesi daha yüksek görülmektedir.



Şekil 3.19 Tributirin petri aktivite deneyi

X, insert içermeyen X33 hücresi, insert içeren koloniler 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13

3.10.6 Protein Miktar Tayini

Tribütirin aktivite deneyi ile seçilen 2, 3, 10, 11, 13 numaralı koloniler ve insert içermeyen X33 hücreleri 10 ml BMMY'de tekrar 72 saat yukarıda belirtilen koşullarda büyütülmüştür. Hücreler çöktürülerek ekstraselüler sıvı temiz tüplere alınmıştır. Proteinler %80 amonyum sülfatta çöktürülmüş ve Tablo 3.9'da Bradford yöntemi ile protein miktarları verilmiştir.

Tablo 3.9 Bradford yöntemi ile protein miktar tayini

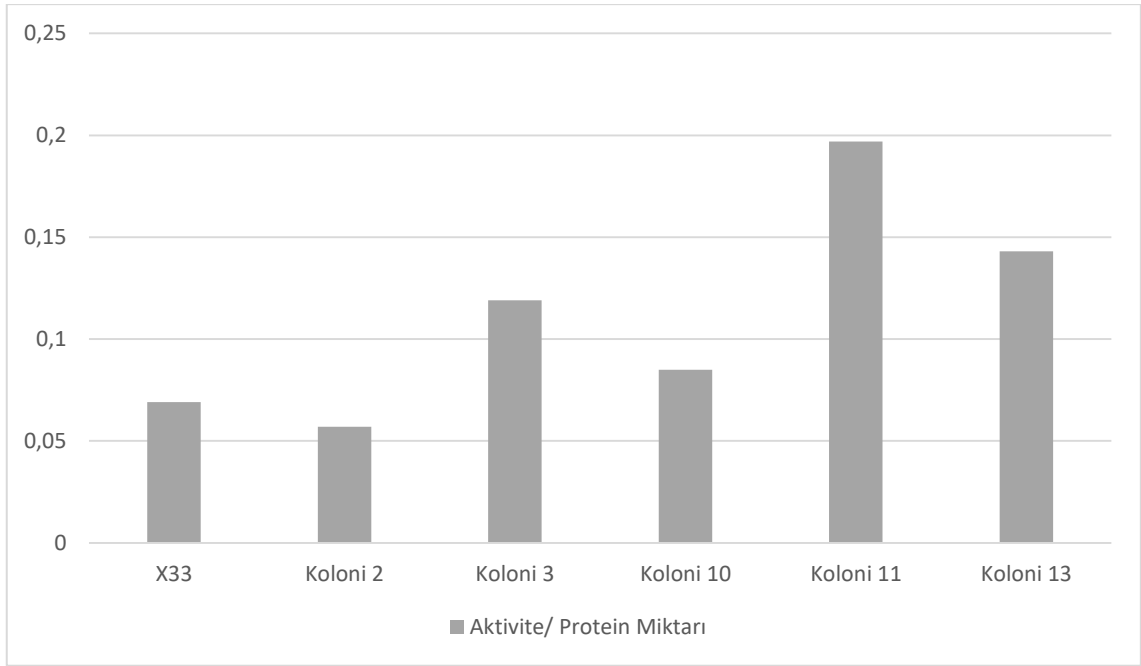
Koloniler	Miktar mg/ml
X33	0,347
Koloni 2	0,601
Koloni 3	0,141
Koloni 10	0,210
Koloni 11	0,161
Koloni 13	0,204

3.10.7 Enzim Aktivite Analizi

2, 3, 10, 11 numaralı koloniler ve insert içermeyen X33 hücrelerinden amonyum sülfatla çöktürülen proteinler ile pNPP substratı kullanılarak aktivite analizi yapılmış ve 410 nm’de OD’ler ölçülmüştür (Tablo 3.10). Protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Tablo 3.10). Aktiviteler protein miktarları ile oranlanarak karşılaştırma yapılmış ve sonuçlar Şekil 3.20’de gösterilmiştir. Bu oranlamaya göre en yüksek aktivitenin Koloni 11’de olduğu görülmüştür.

Tablo 3.10 Enzim aktivitesi ve protein miktarı

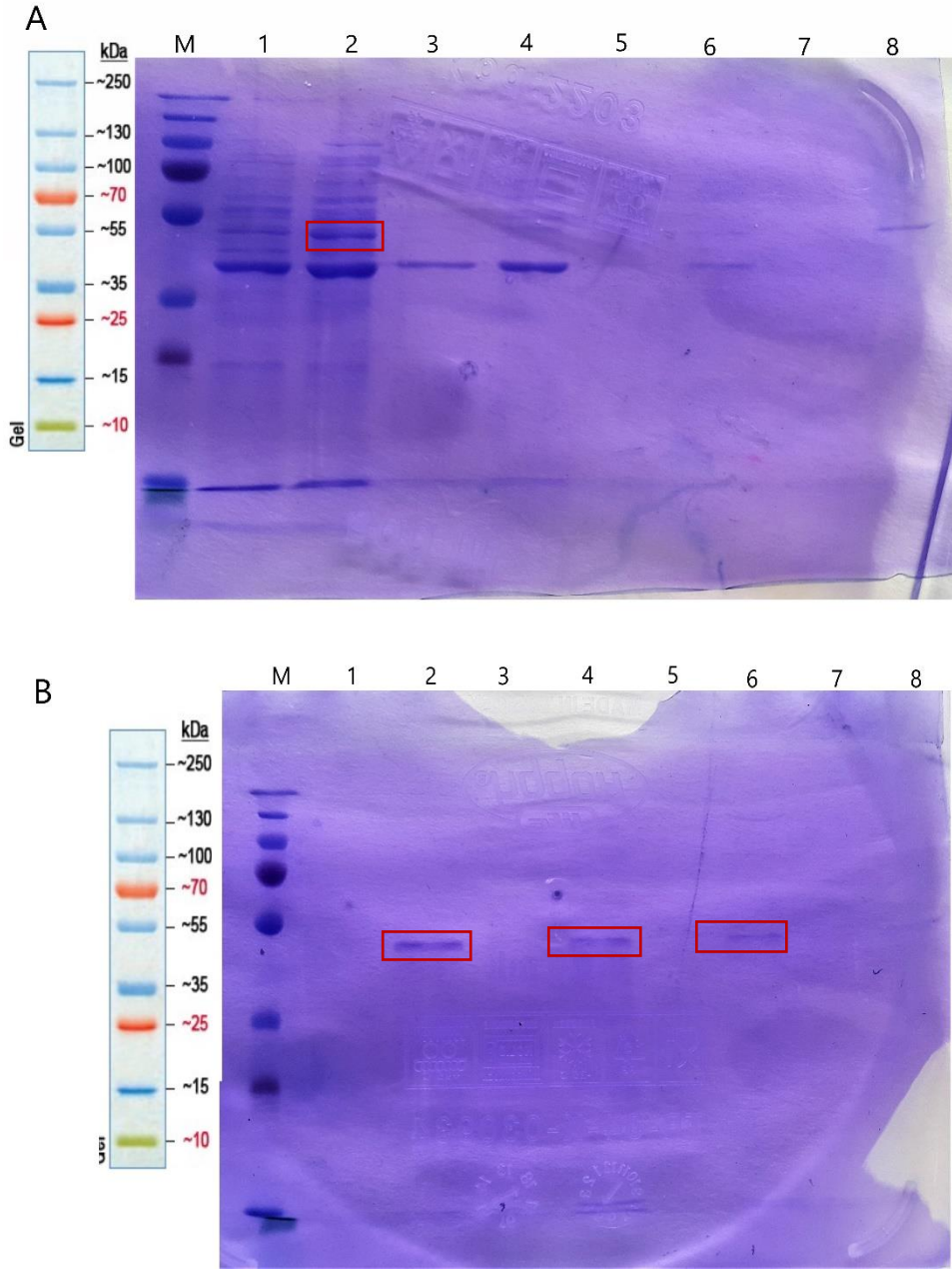
	Aktivite (410nm OD)	Miktar mg/ml
x33	0,024	0,347
Koloni 2	0,034	0,601
Koloni 3	0,017	0,141
Koloni 10	0,018	0,210
Koloni 11	0,032	0,161
Koloni 13	0,033	0,230



Şekil 3.20 Koloniler arasında enzim aktivitesinin karşılaştırılması

3.10.8 Zeytin Lipaz cDNA'sının *P. pastoris*'te Büyük Ölçekte Ekspresyonu

Toplam 600 ml kültürden elde edilen protein Ni-Agar ile saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE'de görüntülendi (Şekil 3.21). Saflaştırma sonucu yaklaşık 45kDa'luk bir protein elde edildi. Protein elüsyonları birleştirilerek 50mM'lık potasyum fosfat tamponuna ultrafiltrasyon ile aktarılmıştır. Protein miktarı Bradford yöntemi ile 0,109 mg/ml olarak bulunmuştur. pNPP ile aktivite testi yapılmış ve OD 0,058 olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.21 Protein saflaştırma SDS-PAGE jel görüntüsü

M. Pageruler Plus Prestained Marker. A: 1. X33 ekstraktı, 2. α 11 ekstraktı, 3. X33 Yıkama 1, 4. α 11 Yıkama 1, 5. X33 Yıkama 2, 6. α 11 Yıkama 2, 7. X33 Yıkama 3, 8. α 11 Yıkama 3. B: 1. X33 Elüsyon 1, 2. α 11 Elüsyon 1, 3. X33 Elüsyon 2, 4. α 11 Elüsyon 2, 5. X33 Elüsyon 3, 6. α 11 Elüsyon 3, 7. X33 Elüsyon 4, 8. α 11 Elüsyon 4

3.10.9 Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu

Saflaştırma sonucu enzim miktarı ve aktivitesinin düşük olması sebebiyle protein ekspresyonunun optimizasyonu amaçlandı. Yapılan denemelerde en başarılı sonuç zeytinyağı eklenmiş kültüre 12 saatte bir metanol ve maya özütü eklenerek elde

edildi. Ekstraselüler sıvıdaki protein %80 amonyum sülfat ile çöktürüldü. Amonyum sülfat ultrafiltrasyon ile uzaklaştırıldı. Proteinler SDS jelde analiz edildiğinde $\alpha 11$ örneklerinde X33 örneklerinden farklı belirgin bir bant görüldü (Şekil 3.22).



Şekil 3.22 SDS-PAGE üzerinde X33 ve pozitif kolonilerin ekstraselüler sıvısındaki proteinlerin karşılaştırılması

M. Pageruler Unstained Marker, 1. X33 ekstraselüler protein, 2. $\alpha 11$ ekstraselüler protein

3.11 Aktivite Analizinin Optimizasyonu

Zeytinyağı ile farklı pH'larda yapılan aktivite analizinde titrasyon için kullanılan NaOH miktarları Tablo 3.11'de gösterilmiştir. Aktivite yalnızca pH 7'de görülmüştür.

Tablo 3.11 Titrasyonda kullanılan NaOH miktarları

	pH 8,00	pH 7,00	pH 6,00	pH 5,00
Blank	30 μ l	45 μ l	70 μ l	70 μ l
X33	30 μ l	45 μ l	70 μ l	70 μ l
$\alpha 11$	30 μ l	60 μ l	70 μ l	70 μ l

3.12 Tartışma ve Öneriler

Bu çalışmada zeytin Gemlik kùltivarına (*Olea europaea* L. *europaea* cv. Gemlik) ait yaprak lipazının cDNA'sı ilk defa klonlanmıştır. Klonlama için PCR temelli RACE yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak 3'RACE ile cDNA'nın 3' ucu çoğaltılmıştır. Buradan elde edilen dizi bilgisi ile 5'RACE primeri tasarlanmış ve cDNA'nın 5' ucu çoğaltılmıştır. RACE sonucu elde edilen dizi bilgileri biyoinformatik programlar yardımı ile hizalanıp birleştirilmiştir. Bu dizi kullanılarak lipaz kodlayan tam uzunlukta cDNA'nın klonlanması için yeni primerler tasarlanmıştır. Zeytin yaprak lipazının kodlayıcı bölgesi 1236 bp uzunluğundadır ve 412 amino asitlik bir kod içermektedir. Katalitik serini çevreleyen GHSQG motifi nedeniyle GX SXG grubu lipazların karakteristiklerine uymaktadır. Katalitik üçlüyü oluşturan serin 182, histidin 379 ve aspartik asit 350 numaralı pozisyonda yer almaktadır.

Zeytin yaprak lipazının nükleotid ve amino asit dizileri farklı bitkisel lipazlara %60 üzerinde benzerlik göstermektedir. Amino asit dizileri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç, yaprak lipazının yabani zeytin dışında en yakın akrabasının bir yağ bitkisi olan susama ait lipazlar olduğunu göstermektedir. Susam lipaz dizileri genomik dizileme ile elde edilmiş ve karakterize edilmemiştir. Diğer bir yakın akraba ise *Dorcoceas hygrometrica* (*Boea hygrometrica*) olarak gör÷lmektedir. Bu bitkide fosfolipaz D'nin kuruma stresinde artan bir ekspresyon profili sergilediğı gör÷lmüştür. Ancak diğer lipazları karakterize edilmemiştir. Zeytin lipazı *Jatropha curcas* (hint fıstığı) lipazına da benzerlik göstermektedir. Hint fıstığı lipazları biyodizel üretimi [57] ve organik sentezde kullanım potansiyeli [169] ile dikkat çekmektedir.

Soğuk stresi uygulaması ile yapraklardaki lipaz ekspresyonunun ilk gün içerisinde dalgalanmakla beraber kontrole göre azaldığı gör÷lmüştür. Bu durum yaprak lipazının stresle indüklenen sinyal mekanizmalarında yer almadığını düşündürmektedir. Bir hafta sonunda ekspresyon düzeyi artarak kontrole yaklaşmış, 10 günün sonunda ise kontrolü geçmiştir. Uzun vadede soğuga adaptasyon sırasında meydana gelen değişimler nedeniyle lipaz seviyesinin de artmış olması mümkündür.

Pichia’da rekombinant ekspresyon için yapılan çalışmalarda tekrarlanabilir bir lipaz ekspresyonu sağlanamamıştır. Aynı şartlar altında ekspresyon tekrarlandığı halde ekspresyon profili her seferinde değişikliğe uğramıştır. Ekspresyonun optimizasyonu için planlanan çalışmalardan biri pPICZA vektörü kullanılarak hücre içi ekspresyon denenmesidir. Planlanan diğer bir çalışma da konstütatif ekspresyon sağlayan PGAP vektörü kullanılarak ekspresyonun denenmesidir. Bu çalışmaların başarısız olması durumunda Pichia kodon kullanımına uygun olacak şekilde zeytin lipaz dizisi değiştirilmesiyle sentetik gen kullanımı denenebilir.

- [1] R. Sharma, Y. Chisti, ve U. Chand, "Production, purification, characterization, and Applications of Lipases," *Biotechnol. Adv.*, vol. 19, pp. 627–662, 2001.
- [2] A. C. R. De Romo ve J. Borgstein, "Claude Bernard and pancreatic function revisited after 150 years," pp. 18–24, 1999.
- [3] T. Corring, C. Juste, T. Corring, C. Juste, ve C. S. Digestive, "Digestive enzymes in the germ-free animal," *Reproduction Nutr. Développement*, vol. 21, no. 3, pp. 355–370, 1981.
- [4] L. Sarda ve P. Desnuelle, "Translated abstract of: Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion," *BBA - Biochim. Biophys. Acta*, vol. 30, no. 3, pp. 513–521, 1958.
- [5] Konwar B. K. ve Sagar, *Lipase: An industrial enzyme through metagenomics*. Toronto: Apple Academic Press Inc., 2018.
- [6] R. Zechner *et al.*, "Fat signals - Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling," *Cell Metab.*, vol. 15, no. 3, pp. 279–291, 2012.
- [7] K. R. Vijayakumar ve L. R. Gowda, "Rice (*Oryza sativa*) lipase: Molecular cloning, functional expression and substrate specificity," *Protein Expr. Purif.*, vol. 88, no. 1, pp. 67–79, 2013.
- [8] A. Glogauer *et al.*, "Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach," *Microb. Cell Fact.*, vol. 10, pp. 1–15, 2011.
- [9] A. V. De Paula, G. F. M. Nunes, J. D. L. Silva, H. F. De Castro, ve J. C. Dos Santos, "Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 160, no. 4, pp. 1146–1156, Feb. 2010.
- [10] M. L. Foresti ve M. L. Ferreira, "Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 46, no. 6, pp. 419–429, 2010.
- [11] J. Polaina ve A. P. MacCabe, Eds., *Industrial Enzymes*. Dordrecht: Springer, 2007.
- [12] A. A. Mendes, P. C. Oliveira, ve H. F. De Castro, "Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 78, pp. 119–134, 2012.
- [13] N. N. Gandhi, "Applications of lipase," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 74, no. 6, pp. 621–634, 1997.
- [14] D. Rooney ve L. R. Weatherley, "The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor," *Process Biochem.*, vol. 36, no. 10, pp. 947–953, 2001.
- [15] M. C. Brahimi-Horn, M. L. Guglielmino, ve L. G. Sparrow, "Wax esterase activity

- in a commercially available source of lipase from *Candida cylindracea*," *J. Biotechnol.*, vol. 12, no. 3–4, pp. 299–306, 1989.
- [16] Y. P. Yong ve B. Al-Duri, "Kinetic studies on immobilised lipase esterification of oleic acid and octanol," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 65, no. 3, pp. 239–248, 1996.
 - [17] K. Y. I *et al.*, "Applied microbiology and biotechnology application of immobilized lipase to regio-specific interesterification of triglyceride in organic solvent," *Optimization*, pp. 1–5, 1982.
 - [18] M. Mittelbach, "Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 67, no. 3, pp. 168–170, 1990.
 - [19] E. C. G. Aguiéiras, E. D. Cavalcanti-oliveira, A. M. De Castro, M. A. P. Langone, ve D. M. G. Freire, "Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme / enzyme) hydroesterification process : Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts," *FUEL*, vol. 135, pp. 315–321, 2014.
 - [20] C. H. Kuo, L. T. Peng, S. C. Kan, Y. C. Liu, ve C. J. Shieh, "Lipase-immobilized biocatalytic membranes for biodiesel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 145, pp. 229–232, 2013.
 - [21] I. H. Kim, H. Kim, K. T. Lee, S. H. Chung, ve S. N. Ko, "Lipase-catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids," *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 79, no. 4, pp. 363–367, 2002.
 - [22] H. Zhao, Z. Lu, X. Bie, F. Lu, ve Z. Liu, "Lipase catalyzed acidolysis of lard with capric acid in organic solvent," *J. Food Eng.*, vol. 78, no. 1, pp. 41–46, 2007.
 - [23] L. Couturier, D. Taupin, ve F. Yvergnaux, "Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 56, no. 1, pp. 29–33, 2009.
 - [24] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, ve T. a Jones, "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*," *Structure*, vol. 2, pp. 293–308, 1994.
 - [25] D. J. Brick *et al.*, "A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize," *FEBS Lett.*, vol. 377, no. 3, pp. 475–480, 1995.
 - [26] Mikleušević, "Arab-1 , a GDSL Lipase from the Model Plant , *Arabidopsis thaliana* (L .)," *Croat. Chem. Acta*, vol. 82, no. 2, pp. 439–447, 2009.
 - [27] I. Glaied Ghram *et al.*, "Cloning, sequence analysis and expression patterns during seed germination of a rapeseed (*Brassica napus* L.) G-x-S-x-G-motif lipase gene," *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, vol. 44, no. 2, p. 435, 2016.
 - [28] C. C. Akoh, G. C. Lee, Y. C. Liaw, T. H. Huang, ve J. F. Shaw, "GDSL family of serine esterases/lipases," *Prog. Lipid Res.*, vol. 43, no. 6, pp. 534–552, 2004.
 - [29] C. Upton ve J. T. Buckley, "A new family of lipolytic enzymes," *Trends Biochem.*, pp. 178–179, 1995.
 - [30] M. Matori, T. Asahara, ve Y. Ota, "Positional specificity of microbial lipases," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 72, no. 5, pp. 397–398, 1991.

- [31] X. Tong, P. K. Busk, ve L. Lange, "Characterization of a new sn-1,3-regioselective triacylglycerol lipase from *Malbranchea cinnamomea*," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 63, no. 4, pp. 471–478, 2016.
- [32] B. Cambou ve A. M. Klivanov, "Comparison of different strategies for the lipase-catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohols: Asymmetric hydrolysis, esterification, and transesterification," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 26, no. 12, pp. 1449–1454, 1984.
- [33] A. G. MARANGONI, "Candida and Pseudomonas lipase-catalyzed hydrolysis of butteroil in the absence of organic solvents," *J. Food Sci.*, vol. 59, no. 5, pp. 1096–1099, 1994.
- [34] H. Lazreg-Aref, H. Mosbah, A. Fekih, M. Mars, ve K. Said, "Purification and biochemical characterization of lipase from *Ficus carica* latex of tunisian east coast zidi variety," *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 89, no. 10, pp. 1847–1855, 2012.
- [35] A. R. Macrae, "Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 60, no. 2, pp. 291–294, 1983.
- [36] S. Lang, C. Syltatk, ve U. Rau, *Enzymes in lipid modification*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000.
- [37] T. Ke ve A. M. Klivanov, "Markedly enhancing enzymatic enantioselectivity in organic solvents by forming substrate salts," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 14, pp. 3334–3340, 1999.
- [38] E. Jurado, M. García-Román, G. Luzón, D. Altmajer-Vaz, ve J. L. Jiménez-Pérez, "Optimization of lipase performance in detergent formulations for hard surfaces," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 50, no. 20, pp. 11502–11510, Oct. 2011.
- [39] A. Pandey, S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, ve V. T. Soccol, "The realm of microbial lipases in biotechnology," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 29 (Pt 2), pp. 119–31, 1999.
- [40] M. Cao, L. M. Fonseca, T. C. Schoenfuss, ve S. A. Rankin, "Homogenization and lipase treatment of milk and resulting methyl ketone generation in blue cheese," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 25, pp. 5726–5733, 2014.
- [41] Â. Samir *et al.*, "Enzymes in Bakery: Current and Future Trends," 2013.
- [42] M. A. P. C. Celligoi, C. Baldo, M. R. De Melo, F. G. M. Gasparin, T. A. Marques, ve M. De Barros, "Lipase properties, functions and food applications," *Microb. Enzym. Technol. Food Appl.*, no. December, pp. 214–240, 2017.
- [43] W. M. Willis ve A. G. Marangoni, "Assessment of lipase- and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids," *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 76, no. 4, pp. 443–450, 1999.
- [44] P. Villeneuve, E. J. Lipid, ve S. Technol, "Plant lipases and their applications in oils and fats modification," vol. 105, pp. 308–317, 2003.
- [45] Y. Wang, L. Xia, X. Xu, L. Xie, ve Z. Duan, "Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids," *Food Bioprod. Process.*, vol. 90, no. 4, pp. 707–712, 2012.

- [46] Y. H. Wang, X. L. Qin, Q. S. Zhu, R. Zhou, B. Yang, ve L. Li, "Lipase-catalyzed acidolysis of lard for the production of human milk fat substitute," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 230, no. 5, pp. 769–777, 2010.
- [47] P. Pinyaphong ve S. Phutrakul, "Synthesis of cocoa butter equivalent from palm oil by *Carica papaya* lipase-catalyzed interesterification," *Chiang Mai J. Sci.*, vol. 36, no. 3, pp. 359–368, 2009.
- [48] W. Abdelmoez ve A. Mustafa, "Oleochemical Industry Future through Biotechnology," vol. 554, no. 6, pp. 545–554, 2014.
- [49] C. O. Akerman, Y. Gaber, N. A. Ghani, M. Lämsä, ve R. Hatti-Kaul, "Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 72, no. 3–4, pp. 263–269, 2011.
- [50] Z. Ziobrowski, K. Kiss, A. Rotkegel, N. Nemestóthy, R. Krupiczka, ve L. Gubicza, "Pervaporation aided enzymatic production of glycerol monostearate in organic solvents," *Desalination*, vol. 241, no. 1–3, pp. 212–217, 2009.
- [51] L. Poisson *et al.*, "Lipase-catalyzed synthesis of waxes from milk fat and oleyl alcohol," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 76, no. 9, pp. 1017–1021, 1999.
- [52] A. Ghanem ve H. Y. Aboul-Enein, "Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents," *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 15, no. 21, pp. 3331–3351, 2004.
- [53] B. Hu, J. Pan, H. L. Yu, J. W. Liu, ve J. H. Xu, "Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate," *Process Biochem.*, vol. 44, no. 9, pp. 1019–1024, 2009.
- [54] G. Hedström, M. Backlund, ve J. P. Slotte, "Enantioselective synthesis of ibuprofen esters in AOT/isooctane microemulsions by *Candida cylindracea* lipase," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 42, no. 5, pp. 618–624, Aug. 1993.
- [55] A. Ducret, M. Trani, ve R. Lortie, "Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 22, no. 4, pp. 212–216, 1998.
- [56] J. C. Chen ve S. W. Tsai, "Enantioselective synthesis of (s)-ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on Accurel MP1000," *Biotechnol. Prog.*, vol. 16, no. 6, pp. 986–992, 2000.
- [57] J. S. de Sousa, E. d. A. Cavalcanti-Oliveira, D. A. G. Aranda, ve D. M. G. Freire, "Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 65, no. 1–4, pp. 133–137, 2010.
- [58] S. Suwanno *et al.*, "The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst," *Fuel*, vol. 195, no. 2017, pp. 82–87, 2017.
- [59] W. Du, Y. Xu, D. Liu, ve J. Zeng, "Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl

- acceptors," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 30, no. 3–4, pp. 125–129, 2004.
- [60] S. H. Ha, M. N. Lan, S. H. Lee, S. M. Hwang, ve Y. M. Koo, "Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 41, no. 4, pp. 480–483, 2007.
- [61] H. Gu, Y. Jiang, L. Zhou, ve J. Gao, "Reactive extraction and in situ self-catalyzed methanolysis of germinated oilseed for biodiesel production," *Energy Environ. Sci.*, vol. 4, no. 4, p. 1337, 2011.
- [62] L. Wang, W. Du, D. Liu, L. Li, ve N. Dai, "Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 43, no. 1–4, pp. 29–32, 2006.
- [63] M. Kaieda *et al.*, "Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 88, no. 6, pp. 627–631, 1999.
- [64] C. W. Garner, L. C. Smith, ve F. Smith, "Porcine pancreatic lipase," *J. Biol. Chem.*, vol. 247, no. 2, pp. 561–565, 1971.
- [65] L. I. Gidez, "Purification of rat pancreatic lipase," vol. 9, pp. 0–4, 1968.
- [66] K. N. Kilcawley, M. G. Wilkinson, ve P. F. Fox, "Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 31, no. 3, pp. 310–320, 2002.
- [67] J. Steiner, "Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas," *Biochimie*, vol. 84, no. 12, pp. 1243–1251, 2003.
- [68] B. Lindkvist, "Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency," *World J. Gastroenterol.*, vol. 19, no. 42, pp. 7258–7266, 2013.
- [69] G. M. Borrelli ve D. Trono, "Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 9, pp. 20774–20840, 2015.
- [70] J. L. Arpigny ve K. Jaeger, "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties," vol. 183, pp. 177–183, 1999.
- [71] M. H. Lee, C. H. Lee, T. K. Oh, J. K. Song, ve J. H. Yoon, "Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: Evidence for a new family of bacterial lipases," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 11, pp. 7406–7409, 2006.
- [72] M. Li, L. R. Yang, G. Xu, ve J. P. Wu, "Cloning and characterization of a novel lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* GS11: The first member of a new bacterial lipase family XVI," *J. Biotechnol.*, vol. 228, pp. 30–36, 2016.
- [73] A. Castilla *et al.*, "A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII)," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 98, pp. 86–95, 2017.
- [74] P. Gowland, M. Kernick, ve T. K. Sundaram, "Thermophilic bacterial isolates producing lipase," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 48, no. 3, pp. 339–343, 1987.
- [75] A. Castilla *et al.*, "A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter*

- sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII)," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 98, pp. 86–95, 2017.
- [76] D. Pérez *et al.*, "A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA)," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, pp. 1–11, 2011.
 - [77] E. H. Ghanem, H. A. Al-Sayed, ve K. M. Saleh, "An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 16, no. 5, pp. 459–464, 2000.
 - [78] M. C. T. Damaso, M. A. Passianoto, S. C. De Freitas, D. M. G. Freire, R. C. A. Lago, ve S. Couri, "Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 39, no. 4, pp. 676–681, 2008.
 - [79] A. Kunamneni, K. V. V. S. N. B. Raju, M. I. Zargar, R. B. Devi, P. J. Lakshmi, ve P. Ellaiah, "Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species," *Indian J. Biotechnol.*, vol. 3, no. February, pp. 65–69, 2015.
 - [80] M. B. Palma *et al.*, "Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 84, no. 1, pp. 1137–1145, Mar. 2000.
 - [81] R. Ben Salah, H. Mosbah, A. Fendri, A. Gargouri, Y. Gargouri, ve H. Mejdoub, "Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 260, no. 2, pp. 241–248, 2006.
 - [82] J. C. Rotticci-Mulder, M. Gustavsson, M. Holmquist, K. Hult, ve M. Martinelle, "Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain.," *Protein Expr. Purif.*, vol. 21, no. 3, pp. 386–392, 2001.
 - [83] A. Mehta, U. Bodh, ve R. Gupta, "Fungal lipases: A review," *J. Biotech Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 58–77, 2017.
 - [84] Y. Ota, K. Gomi, S. Kato, T. Sugiura, ve Y. Minoda, "Purification and some properties of cell-bound lipase from *saccharomycopsis lipolytica*," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 46, no. 12, pp. 2885–2893, 1982.
 - [85] J. Huang *et al.*, "A novel mono- and diacylglycerol lipase highly expressed in *Pichia pastoris* and its application for food emulsifier preparation," *Process Biochem.*, vol. 48, no. 12, pp. 1899–1904, Dec. 2013.
 - [86] S. C. B. Gopinath, P. Anbu, ve A. Hilda, "Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments," *Mycoscience*, vol. 46, no. 2, pp. 119–126, 2005.
 - [87] G. D. Yadav ve S. D. Shinde, "Kinetic modeling and optimization of immobilized *Candida antarctica* lipase B catalysed synthesis of butyl-4-methyl-3-oxopentanoate using response surface methodology," *Int. J. Chem. React. Eng.*, vol. 10, no. 1, 2012.
 - [88] L. A. Nelson, T. A. Foglia, ve W. N. Marmer, "Lipase-catalyzed production of

- biodiesel," vol. 73, no. 8, pp. 1191–1195, 1996.
- [89] H. Zhang, J. Zhou, X. Zheng, Z. Zhang, Z. Wang, ve X. Tan, "Characterization of a desiccation stress induced lipase gene from *Brassica napus* L.," vol. 18, pp. 1129–1141, 2016.
 - [90] S.-S. B, "Arab-1 , a GDSL Lipase from the model plant, *Arabidopsis thaliana* L.," *Croat. Chem. Acta*, vol. 82, no. 2, pp. 439–447, 2009.
 - [91] Y. Hong, T. W. Wang, K. a Hudak, F. Schade, C. D. Froese, ve J. E. Thompson, "An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 15, pp. 8717–8722, 2000.
 - [92] J. Thompson, C. Taylor, ve T. W. Wang, "Altered membrane lipase expression delays leaf senescence," *Biochem Soc Trans*, vol. 28, no. 6, pp. 775–777, 2000.
 - [93] J. V. Da Silva, A. W. Naylor, ve P. J. Kramer, "Some ultrastructural and enzymatic effects of water stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 71, no. 8, pp. 3243–3247, 2006.
 - [94] G. Jakab, A. Manrique, L. Zimmerli, J. Me, ve B. Mauch-mani, "Molecular characterization of a novel lipase-like pathogen-inducible gene family of *Arabidopsis*," *Plant Physiol.*, vol. 132, no. August 2003, pp. 2230–2239, 2007.
 - [95] M. Lo, "Characterization of an ultraviolet B-induced lipase in *Arabidopsis*," *Plant Physiol.*, vol. 135, no. 2, pp. 947–958, 2004.
 - [96] P. Di Santo Meztler, M. E. Fait, M. L. Foresti, ve S. R. Morcelle, "Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in *Araujia sericifera* Brot. (Apocynaceae) latex," *Catal. Sci. Technol.*, vol. 4, no. 5, p. 1386, 2014.
 - [97] P. Villeneuve *et al.*, "Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 37, no. 1, pp. 150–155, 2005.
 - [98] R. J. A. Tavener ve D. L. Laidman, "The induction of lipase activity in the germinating wheat grain," *Phytochemistry*, vol. 11, no. 3, pp. 989–997, 1972.
 - [99] B. Ekstrand, I. Gangby, ve G. Akersson, "Lipase activity in oats - distribution, pH dependance and heat inactivation," *Cereal Chemistry*, vol. 69, no. 4. pp. 379–381, 1992.
 - [100] B. Ekstrand, I. Gangby, G. Åkesson, U. Stöllman, H. Lingnert, ve S. Dahl, "Lipase activity and development of rancidity in oats and oat products related to heat treatment during processing," *Journal of Cereal Science*, vol. 17, no. 3. pp. 247–254, 1993.
 - [101] J. O'Connor, H. J. Perry, ve J. L. Harwood, "A comparison of lipase activity in various cereal grains," *J. Cereal Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 153–163, 1992.
 - [102] Y. Kim, "Cloning and expression of a lipase gene from rice (*Oryza sativa* cv. Dongjin).," *Mol. Cells*, vol. 18, no. 1, pp. 40–5, 2004.
 - [103] M. Funatsu, Y. Aizono, K. Hayashi, M. Watanabe, ve M. Eto, "Biochemical studies on rice bran lipase: Part I. Purification and physical properties," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 35, no. 5, pp. 734–742, 1971.

- [104] Y. Aizono, M. Funatsu, Y. Fujiki, ve M. Watanabe, "Purification and characterization of rice bran lipase II," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 40, no. 2, pp. 317–324, 1976.
- [105] G. J. Tiwari, M. Y. Chiang, J. R. De Silva, B. K. Song, Y. L. Lau, ve S. Rahman, "Lipase genes expressed in rice bran: LOC_Os11g43510 encodes a novel rice lipase," *J. Cereal Sci.*, vol. 71, pp. 43–52, 2016.
- [106] E. D. C. Cavalcanti, F. M. Maciel, P. Villeneuve, R. C. A. Lago, O. L. T. Machado, ve D. M. G. Freire, "Acetone Powder From Dormant Seeds of *Ricinus communis* L," vol. 136, pp. 57–65, 2007.
- [107] P. J. Eastmond, "Cloning and characterization of the acid lipase from Castor beans," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 44, pp. 45540–45545, 2004.
- [108] S. Muto ve H. Beevers, "Lipase Activities in castor bean endosperm during germination," *Plant Physiol.*, vol. 54, no. 1, pp. 23–28, 1974.
- [109] I. Rivera, M. Robles, J. C. Mateos-Díaz, A. Gutierrez-Ortega, ve G. Sandoval, "Functional expression, extracellular production, purification, structure modeling and biochemical characterization of *Carica papaya* lipase 1," *Process Biochem.*, 2017.
- [110] K. Matsui, S. Fukutomi, M. Ishii, ve T. Kajiwara, "A tomato lipase homologous to DAD1 (LeLID1) is induced in post-germinative growing stage and encodes a triacylglycerol lipase," *FEBS Lett.*, vol. 569, no. 1–3, pp. 195–200, 2004.
- [111] S. O. O. Eze ve B. O. Ezema, "Purification and characterization of lipase (EC-3.1.1.3) from the seeds of *cucumeropsis manni* (white melon)," *Thai J. Agric. Sci.*, vol. 45, no. 2, pp. 115–120, 2012.
- [112] S. S. Isbilir, H. M. Ozcan, ve H. Yagar, "Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis* L.) seeds," *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 85, no. 3, pp. 227–233, 2008.
- [113] J. K. Hong *et al.*, "Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance," *Planta*, vol. 227, no. 3, pp. 539–558, 2008.
- [114] J. M. Olías, "Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the 'green' odor notes," *J. Agric. food Chem.*, vol. 41, no. 12, pp. 2368–2373, 1993.
- [115] S. Panzanaro, E. Nutricati, A. Miceli, ve L. De Bellis, "Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.)," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 48, no. 9, pp. 741–745, 2010.
- [116] B. B. C. Nwanguma, M. O. Eze, ve O. O. Ezenowa, "Changes in activity of sorghum lipase during malting and mashing," *J. Inst. Brew.*, vol. 102, no. July 1995, pp. 39–41, 1996.
- [117] L. R. Wetter, "Some properties of the lipase present in germinating rapeseed," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 34, no. 2, pp. 66–70, 1957.
- [118] E. M. H. ve R. K. S. N.K. Sana, I. Hossin, "Identification, purification and characterization of lipase form germinating oil seeds (*Brassica napus* L.)." pp. 246–525, 2004.

- [119] H. E. Longenecker ve D. E. Haley, "Ricinus Lipase, its Nature and Specificity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 57, no. 11, pp. 2019–2021, 1935.
- [120] R. L. Ory, "Acid lipase of the castor bean," *Lipids*, vol. 4, no. 3, pp. 177–185, 1969.
- [121] M. Tüter, "Castor bean lipase as a biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol," *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 75, no. 3, pp. 417–420, 1998.
- [122] M. H. M. Avelar, D. M. J. Cassimiro, K. C. Santos, R. C. C. Domingues, H. F. de Castro, ve A. A. Mendes, "Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds," *Ind. Crops Prod.*, vol. 44, pp. 452–458, Jan. 2013.
- [123] R. Giordani, A. Moulin, ve R. Verger, "Tributyrolylglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other latices," *Phytochemistry*, vol. 30, no. 4, pp. 1069–1072, 1991.
- [124] N. Barouh *et al.*, "*Carica papaya* lipase: A naturally immobilized enzyme with interesting biochemical properties," *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 66, no. 1, pp. 34–40, 2011.
- [125] E. Cambon *et al.*, "Characterization of typo-, regio-, and stereo-selectivities of babaco latex lipase in aqueous and organic media," *Biotechnol. Lett.*, vol. 30, no. 4, pp. 769–774, 2008.
- [126] P. You, J. Qiu, E. Su, ve D. Wei, "*Carica papaya* lipase catalysed resolution of β -amino esters for the highly enantioselective synthesis of (S)-dapoxetine," *European J. Org. Chem.*, no. 3, pp. 557–565, 2013.
- [127] N. N. Gandhi ve K. D. Mukherjee, "Synthesis of designer lipids using papaya (*Carica papaya*) latex lipase," *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 11, no. 4–6, pp. 271–277, 2001.
- [128] T. A. Foglia ve P. Villeneuve, "*Carica papaya* latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols," *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 74, no. 11, pp. 1447–1450, 1997.
- [129] K. D. Mukherjee ve I. Kiewitt, "Structured triacylglycerols resembling human milk fat by transesterification catalyzed by papaya (*Carica papaya*) latex," *Biotechnol. Lett.*, vol. 20, no. 6, pp. 613–616, 1998.
- [130] G. Sandoval *et al.*, "Identification, cloning and expression of a new GDGL lipase from *Carica papaya*," *Process Biochem.*, vol. 55, pp. 70–76, 2017.
- [131] P. Wanasundara, U. Wanasundara, ve F. Shahidi, "Lipolytic activity of enzymes from germinating seeds of sesame (*Sesamum indicum* L.) preparation of germinated sesame seeds," vol. 8, no. 709, pp. 75–84, 2001.
- [132] B. O. R. Bargmann ve T. Munnik, "The role of phospholipase D in plant stress responses," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 515–522, 2006.
- [133] R. a Creelman ve J. E. Mullet, "Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 10, pp. 4114–4119, 1995.

- [134] I. S. Oh, "Secretome Analysis Reveals an Arabidopsis Lipase involved in defense against alternaria Brassicicola," *Plant Cell Online*, vol. 17, no. 10, pp. 2832–2847, 2005.
- [135] G. Jakab, A. Manrique, L. Zimmerli, J. Me, ve B. Mauch-mani, "Molecular characterization of a novel lipase-like pathogen-inducible gene family of Arabidopsis," *Plant Physiol*, vol. 132, no. August 2003, pp. 2230–2239, 2007.
- [136] J. Louis, K. Lorenc-Kukula, V. Singh, J. Reese, G. Jander, ve J. Shah, "Antibiosis against the green peach aphid requires the Arabidopsis thaliana Myzus persicae-induced lipase1 gene," *Plant J*, vol. 64, no. 5, pp. 800–811, 2010.
- [137] M. Á. Naranjo, J. Forment, M. Roldán, R. Serrano, ve O. Vicente, "Overexpression of Arabidopsis thaliana LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants," *Plant, Cell Environ*, vol. 29, no. 10, pp. 1890–1900, 2006.
- [138] H. Zhang, J. Zhou, X. Zheng, Z. Zhang, Z. Wang, ve X. Tan, "Characterization of a desiccation stress induced lipase gene from Brassica napus L.," *J. Agric. Sci. Technol*, vol. 18, no. 4, pp. 1129–1141, 2016.
- [139] M. Lo, "Characterization of an ultraviolet B-induced lipase in Arabidopsis," *Plant Physiol*, vol. 135, no. 2, pp. 947–958, 2004.
- [140] E. Ergulen, M. T. Ozkaya, S. Ulger, ve N. Ozilbey, "Identification of some Turkish olive cultivars by using RAPD-PCR technique," *Acta Hortic*, no. 586, pp. 91–95, 2002.
- [141] R. Erel, U. Yermiyahu, J. Van Opstal, A. Ben-Gal, A. Schwartz, ve A. Dag, "The importance of olive (*Olea europaea* L.) tree nutritional status on its productivity," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 159, pp. 8–18, 2013.
- [142] M. C. Combes *et al*, "Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species," *Mol. Ecol*, vol. 9, no. 8, pp. 1178–1180, 2000.
- [143] G. Elgin Cebe, S. Konyalıoğlu, ve U. Zeybek, "*Olea europaea* var. *europaea* (Zeytin) yaprak infüzyonunun antioksidan etkisi," *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg*, vol. 49, no. 3, pp. 209–212, 2012.
- [144] A. H. Stark ve Z. Madar, "Olive oil as a functional food: Nutritional and health benefits," *Handb. Olive Oil Anal. Prop*, vol. 60, no. 6, pp. 677–714, 2013.
- [145] G. K. Beauchamp *et al*, "Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil," *Nature*, vol. 437, no. 7055, pp. 45–46, 2005.
- [146] G. Corona, M. Deiana, A. Incani, D. Vauzour, M. Assunta Dessì, ve J. P. E. Spencer, "Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects," *Biochem. Biophys. Res. Commun*, vol. 362, no. 3, pp. 606–611, 2007.
- [147] K. M. Ahmed, "The effect of olive leaf extract in decreasing the expression of two pro-inflammatory cytokines in patients receiving chemotherapy for cancer. A randomized clinical trial," *Saudi Dent. J*, vol. 25, no. 4, pp. 141–147, 2013.
- [148] G. Besnard, a Berville, ve a Bervillé, "Multiple origins for Mediterranean olive

- (*Olea europaea* L-ssp *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms," *Comptes Rendus L Acad. Des Sci. Ser. Iii-Sciences La Vie-Life Sci.*, vol. 323, pp. 173–181, 2000.
- [149] A. Belaj, C. Muñoz-Diez, L. Baldoni, A. Porceddu, D. Barranco, ve Z. Satovic, "Genetic diversity and population structure of wild olives from the north-western Mediterranean assessed by SSR markers," *Ann. Bot.*, vol. 100, no. 3, pp. 449–458, 2007.
- [150] T. Unver *et al.*, "Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, p. 201708621, 2017.
- [151] E. Barghini *et al.*, "The peculiar landscape of repetitive sequences in the olive (*Olea europaea* L.) genome," *Genome Biol. Evol.*, vol. 6, no. 4, pp. 776–791, 2014.
- [152] F. Cruz *et al.*, "Genome sequence of the olive tree, *Olea europaea*," *Gigascience*, vol. 5, no. 1, 2016.
- [153] L. Baldoni *et al.*, "Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean Basin," *Ann. Bot.*, vol. 98, no. 5, pp. 935–942, 2006.
- [154] A. M. Bosabalidis ve G. Kofidis, "Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars," *Plant Sci.*, vol. 163, no. 2, pp. 375–379, 2002.
- [155] M. Ennajeh, T. Tounekti, A. M. Vadel, ve H. Khemira, "Water relations and drought-induced embolism in olive (*Olea*," *Tree Physiol.*, pp. 971–976, 2008.
- [156] B. Dichio, C. Xiloyannis, A. Sofo, ve G. Montanaro, "Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering," *Tree Physiol.*, vol. 26, no. 2, pp. 179–185, 2006.
- [157] K. S. Chartzoulakis, "Salinity and olive: Growth, salt tolerance, photosynthesis and yield," *Agric. Water Manag.*, vol. 78, no. 1–2, pp. 108–121, 2005.
- [158] M. Tattini, L. Lombardini, ve R. Gucci, "The effect of NaCl stress and relief on gas exchange properties of two olive cultivars differing in tolerance to salinity," *Plant Soil*, vol. 197, no. 1, pp. 87–93, 1997.
- [159] S. Goreta, V. Bučević-Popović, M. Pavela-Vrančić, ve S. Perica, "Salinity-induced changes in growth, superoxide dismutase activity, and ion content of two olive cultivars," *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, vol. 170, no. 3, pp. 398–403, 2007.
- [160] M. Gómez-del-Campo ve D. Barranco, "Field evaluation of frost tolerance in 10 olive cultivars," *Plant Genet. Resour. Charact. Util.*, vol. 3, no. 03, pp. 385–390, 2006.
- [161] S. D'Angeli ve M. M. Altamura, "Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization," *Planta*, vol. 225, no. 5, pp. 1147–1163, 2007.
- [162] S. D'Angeli, R. Malhó, ve M. M. Altamura, "Low-temperature sensing in olive tree: Calcium signalling and cold acclimation," *Plant Sci.*, vol. 165, no. 6, pp. 1303–1313, 2003.
- [163] M. Weidner, M. Taupp, ve S. J. Hallam, "Expression of recombinant proteins in

- the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *J. Vis. Exp.*, no. 36, pp. 1–5, 2010.
- [164] B. Byrne, "Pichia pastoris as an expression host for membrane protein structural biology," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 32, pp. 9–17, 2015.
- [165] M. A. Frohman, M. K. Dush, ve G. R. Martin, "Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 85, no. 23, pp. 8998–9002, 1988.
- [166] H. Inoue, H. Nojima, ve H. Okayama, "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids," *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 23–28, 1990.
- [167] N. Gupta, P. Rathi, ve R. Gupta, "Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases," *Anal. Biochem.*, vol. 311, no. 1, pp. 98–99, 2002.
- [168] O. E. Bankefa, M. Wang, T. Zhu, ve Y. Li, "Enhancing the secretion pathway maximizes the effects of mixed feeding strategy for glucose oxidase production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 5, no. 1, pp. 4–11, 2018.
- [169] R. Staubmann, I. Ncube, ve G. M. Gu, "Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds," vol. 75, pp. 117–126, 1999.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: mnsyurtsever@gmail.com

Makale

1. M. Yurtsever ve Ş. Vural Korkut, "Cloning of lipase cDNA from *Olea europaea* cv. Gemlik leaves and expression analysis in response to cold stress," *Turk. J. Botany*, vol. 43, no. 3, pp. 290–297, 2019.

Konferans Bildirileri

1. M. Yurtsever ve Ş. Vural Korkut, "Zeytin (*Olea europaea* L.) yapraklarında lipaz enzimini kodlayan genin klonlanması ve karakterizasyonu", *29. Ulusal Kimya Kongresi, Ankara, Türkiye, (Sözlü Sunum), 10-14 Eylül 2017, s.132.*

Projeler

1. Yürütücü: Ş. Vural Korkut, "Endüstriyel olarak kullanılabilecek lipazları kodlayan genlerin zeytinden (*Olea europaea* L.) klonlanması", *YTÜ BAP Doktora Projesi, 2015-01-07-DOP01.*

2. Yürütücü: M. Yurtsever, "Zeytin (*Olea europaea* L. cv. Gemlik) yaprağından klonlanmış lipaz enziminin *Pichia pastoris*'te ekspresyonu", *Tübitak 1002 Projesi, 217Z171.*