

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus subtilis*'den α -AMİLAZ GENİNİN KLONLANMASI ve *Pichia pastoris*
MAYASINDA EKSPRESYONU**

Barçın KARAKAŞ

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2009

***Bacillus subtilis*'den α -AMİLAZ GENİNİN KLONLANMASI ve *Pichia pastoris*
MAYASINDA EKSPRESYONU**

Barçın KARAKAŞ

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı tarafından Doktora öğrencilerine yönelik 2214-Yurt Dışı Araştırma Bursu Programı kapsamında desteklenmiştir.

2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bacillus subtilis'den α -AMİLAZ GENİNİN KLONLANMASI ve *Pichia pastoris*
MAYASINDA EKSPRESYONU

Barçın KARAKAŞ

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 13/05/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Feramuz ÖZDEMİR

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Doç. Dr. Mustafa KARHAN

ÖZET

***Bacillus subtilis*'den α -AMİLAZ GENİNİN KLONLANMASI ve *Pichia pastoris* MAYASINDA EKSPRESYONU**

Barçın KARAKAŞ

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Mayıs 2009, 140 sayfa

Bu çalışmanın ilk bölümünde sünmüş ekmekten izole edilmiş olan *Bacillus subtilis* BK07 suşuna ait α -amilaz genini kodlayan DNA dizisi belirlenmek istenmiştir. Koloni hibridizasyonu, PCR ve kromozom yürüyüşü gibi çeşitli yöntemler kullanılarak ele alınan bu çalışmalarda genetik dizi büyük ölçüde belirlenebilmiş, ancak genin 5'-ucundaki bölgenin dizisi belirlenemediği için gen bir bütün olarak izole edilememiştir. Elde edilen diziler ancak ileride yapılabilecek kimerik enzim (füzyon proteini) tasarımları ve benzeri çalışmalarda kaynak veri olarak değerlendirilebilecek türden veriler olmuştur.

Çalışmalara başlanırken *B. subtilis* BK07 suşunun kesin tanınması gerçekleştirilmiş, optimum çoğalma sıcaklığı gibi bazı özellikleri de araştırılmıştır. Bu aşamalarda, *B. subtilis* BK07 suşuna ilaveten, çalışmalara kılavuzluk etmeleri bakımından aynı türden olduğu kesin olarak bilinen *B. subtilis* PY22, *B. subtilis* RSK 244 ve *B. subtilis* RSK 246 gibi başka bakteriler de analizlerde kullanılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, *B. subtilis* PY22 suşundan α -amilaz geni PCR yoluyla tasarlanmış primerler kullanılarak ve konukçu hücre içinde, Blunt-II Topo vektörü ile aktarıldığı *E. coli*'de çoğaltılarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu dizi, metanol tetiklemeli (indüksiyonlu) protein üretimini ve proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan pPICZ α A vektörü kullanılarak *Pichia pastoris* KM71H konukçu suşuna aktarılmıştır. Elde edilen seçilmiş klonların amilaz üretimleri

araştırılmış, taşıdıkları vektörlerde bulunan kopya sayıları belirlenmiştir. Geni 2 kopya olarak içeren klonların kültür sıvılarında amilaz aktivitesinin daha yüksek olduğu ve salgılama miktarının hücre dışı sıvıda 22 mg/mL gibi oldukça yüksek miktarlara ulaştığı görülmüştür. Rekombinant amilazın üretimi SDS-PAGE analizleri ile takip edilmiş ve N-glikozile olmuş proteinin *EndoH* enzimi ile muamelesi salgılanan rekombinant enzimin özgün moleküler ağırlığının 60 kDa civarında olduğunu göstermiştir.

Kültür sıvısında tespit edilen α -amilaz aktivitesi bakımından bir kıyaslama yapıldığında, *B. subtilis* PY22 ile yapılan üretimin 3. gününde aktivite değerinin 120 mU/mL civarında olduğu belirlenirken, *P. pastoris* ile rekombinant üretimde indüksiyonun başlatılmasını takip eden aynı süre içinde α -amilaz aktivitesinin 45 U/mL seviyesine çıktığı belirlenmiştir. Üretici organizmalar, besiyerileri, başlangıç hücre yoğunlukları ve üretim koşullarındaki farklılıklardan ötürü bire bir kıyaslamamanın yanıltıcı olabileceği gerçeği de göz önünde bulundurularak, aynı yöntemle belirlenen iki ölçüm arasında yaklaşık 370 kat artış olduğu görülmüştür.

Enzimi en yüksek miktarda üretebilen klon belirlendikten sonra 2 kopya sayılı bu klon kullanılarak enzim küçük ölçekte üretilmiş ve hücre dışına salgılanan enzim kısmi saflaştırma işleminden geçirilmiştir. Yaklaşık 32.5 kat saflaştırılan enzim kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda rekombinant α -amilazın en yüksek aktivitesini 60 °C’de ve pH 7’de gösterdiği ve bu ortam koşullarında 1 saat bekletilmesi sonrasında aktivitesini % 78 oranında koruduğu gözlenmiştir. Tepkime ortamda Ca^{++} iyonlarının varlığı amilaz aktivitesinde % 41 artışa sebep olmuştur.

Sonuç olarak α -amilaz üretmeyen *P. pastoris* mayasına bu enzimi kodlayan gen aktarılmış ve indüksiyonlu hücre dışı salgılama ile yüksek miktarda rekombinant protein üretimi sağlanabilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Bacillus subtilis*, α -amilaz, *Pichia pastoris*, ekspresyon

JÜRİ: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)
Prof. Dr. Feramuz ÖZDEMİR
Prof. Dr. Hüseyin BASIM
Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Doç. Dr. Mustafa KARHAN

ABSTRACT

STUDIES ON THE ISOLATION OF THE α -AMYLASE GENE FROM *Bacillus subtilis* AND α -AMYLASE EXPRESSION IN THE YEAST *Pichia pastoris*

Barçın KARAKAŞ

Ph.D. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

May 2009, 140 pages

In the first part of this study the objective was the sequencing of the α -amylase encoding gene of *Bacillus subtilis* BK07 isolated from rony bread. It was possible to determine a large portion of the sequence using techniques such as colony hybridization, PCR and chromosome walking however the gene as a whole could not be isolated due to not being able to determine the sequence at the 5'- end of the gene. The sequence information obtained in this part of the study could be used as source data in future applications involving designing of chimeric enzymes (fusion proteins) and similar studies.

At the initial stages of the study, the strain *B. subtilis* BK07 identified and the optimum growth temperature of the strain was investigated. At this stage of the study, other strains of known identification such as *B. subtilis* PY22, *B. subtilis* RSK 244, *B. subtilis* RSK 246 were also included in the analyses.

When comparing the α -amylase activity of culture supernatants, it was observed that a 3 day fermentation period for *B. subtilis* PY22 resulted in an activity value of 120 mU/mL whereas recombinant production with *P. pastoris* reached an activity of 45 U/mL in the culture supernatant at the same fermentation time following induction. It would be wise to keep in mind that a direct comparison might be misleading given the great variation in source organisms, culture media, starting cell densities, and

production conditions, however, the activity measurements made using the same method showed an increase in amylase activity of 370-fold.

In the second part of the study, the α -amylase gene from *B. subtilis* PY22 was amplified by PCR using degenerate primers and by Blunt-II Topo cloning in host *E. coli* followed by sequencing of the gene. The gene fragment was isolated, sequenced and transferred into the host strain *P. pastoris* KM71H using the vector pPICZ α A enabling methanol induction and extracellular secretion of the protein when transformed. Selected transformants were screened for amylase activity and the copy numbers of the gene were determined. Clones with 2 copy numbers of the gene showed the highest enzyme activity in culture supernatants and the levels of secretion were determined to be as high as 22 mg/mL in cell free supernatants. Recombinant amylase production was monitored by SDS-PAGE analyses and the N-glycosylated protein was treated with *EndoH* enzyme to reveal an approximate molecular weight of 60 kDa.

The 2 copy number clone which was determined to be the one with the highest potential for amylase secretion was propagated in shake flask cultures and the secreted amylase was partially purified approximately 32.5-fold from the cell free supernatant. The recombinant amylase showed optimum activity at neutral pH and 60 °C, retaining 78% of its activity when kept at these conditions for 1 hour. The addition of Ca⁺⁺ ions into the reaction medium resulted in a 41% increase in enzyme activity.

As a result of this study, a recombinant strain of the yeast *P. pastoris* was obtained and production of high levels of the recombinant protein was achieved by induced extracellular secretion.

KEY WORDS: *Bacillus subtilis*, α -amylase, *Pichia pastoris*, expression

COMMITTEE: Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Supervisor)
Prof. Dr. Feramuz ÖZDEMİR
Prof. Dr. Hüseyin BASIM
Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON
Assoc. Prof. Dr. Mustafa KARHAN

ÖNSÖZ

Biyoteknoloji günümüzde en hızlı gelişmekte olan sektörlerden biri durumundadır. Ancak henüz ülkemizde, gerek yasal düzenlemeler bakımından, gerek araştırma potansiyeli ve üretim hacmi olarak arzu edilen düzeylere ulaşamamıştır. Ülkemizin bu alanda dünya üreticileri ile rekabet edebilmesi için yerel biyolojik çeşitliliğin değerlendirilmesi, genetik tekniklerin uygulanması ve bu sayede üretim sektörlerine aktarılabilecek teknolojilerin geliştirilmesi amaçlanmalıdır.

Bu çalışma ile endüstriyel olarak en yaygın kullanım alanına sahip olan, bakteriyel α -amilaz enzimi araştırılmış, bu enzimi kodlayan gen metilotrofik bir maya hücresine aktarılarak yüksek üretim potansiyeline sahip yeni bir suş elde edilmiştir. Araştırma sonuçlarının benzeri çalışmalara ışık tutmasını ve teknolojiye aktarılarak ülkemiz sanayisine ve dolayısıyla ekonomisine katkı sağlamasını dilerim.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muharrem CERTEL'e ve otoritesi altında bu çalışmayı tamamlama fırsatı veren Sayın Doç. Dr. Mehmet İNAN'a ne kadar teşekkür etsem azdır. Onların yönlendirmesi, teşvik ve destekleri olmaksızın bu çalışmanın gerçekleşmesi mümkün olamazdı.

Ayrıca Lincoln, Nebraska, ABD'de gerçekleştirdiğim laboratuvar çalışmalarım sırasında moleküler biyoloji yöntemlerinin uygulanmasında bana yardımcı olan ve teknik bilgilerini paylaşan Dr. Yogander KASHA'ya, yardımlarını benden esirgemeyen teknik personel Sarah PLAUTZ ve Sara CONRAD'a, ve diğer çalışma arkadaşlarıma desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın başından itibaren *Bacillus subtilis* BK07 izolatını sağlayarak bana yardımcı olan ve manevi destekte bulunan Araş. Gör. Fundagül EREM'e ve diğer mesai arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesinde bulunduğu süre içerisinde beni yönlendiren hocalarım Sayın Prof. Dr. Feramuz ÖZDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. Hüseyin BASIM'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için yurt dışında bulunmam hususunda gerekli görevlendirmenin yapılmasını sağlayan kurumum Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne ve yurt dışı ziyaretimi doktora öğrencilerine yönelik yurtdışı araştırma bursu ile destekleyerek katkıda bulunan TÜBİTAK-BİDEB'e ayrıca teşekkür ederim. Bu bursa başvuru için hazırlanan proje metninin gözden geçirilmesindeki desteğinden ötürü Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN hocama teşekkür ederim.

Benden, gerek maddi gerekse manevi, hiçbir desteğı esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGE ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	4
2.1. <i>Bacillus subtilis</i> ve Diğer <i>Bacillus</i> Türleri	4
2.2. α -Amilaz Enzimi ve Diğer Amilazlar	5
2.2.1. α -Amilaz ile ilgili çalışmaların tarihi gelişimi	5
2.2.2. Yeni enzimlerin buluşu için geliştirilen teknolojiler	6
2.2.3. Amilaz grubu enzimler	7
2.2.4. α -Amilazın yapısı, etki ve salgılanma mekanizması	10
2.3. <i>Bacillus</i> α -Amilazları ve Özellikleri	13
2.4. α -Amilaz Enzimi Substratı – Nişasta	17
2.5. Endüstriyel Enzim Uygulamaları ve Gıda Endüstrisinde α -Amilaz Kullanımı	19
2.6. Konukçu Suş Olarak <i>Pichia pastoris</i>	21
2.6.1. <i>Pichia pastoris</i> ile rekombinant α -amilaz üretim çalışmaları ...	23
3. MATERYAL ve METOT	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Çalışmalarda kullanılan bakteri ve maya suşları	25
3.1.1.1. <i>Bacillus subtilis</i> BK07 izolasyonu ve ön tanılama çalışmaları	25
3.1.1.2. <i>Bacillus subtilis</i> RSK-244, <i>B. subtilis</i> RSK-246 ve <i>B. subtilis</i> PY22	26
3.1.1.3. Konukçu suşlar ve taşıyıcı plazmidler	26
3.1.2. Kimyasallar ve enzimler	26

3.2. Metot	27
3.2.1. Temel Moleküler Biyoloji Yöntemleri.....	27
3.2.1.1. DNA izolasyonu	27
3.2.1.2. Polimeraz zincir tepkimesi (PCR).....	28
3.2.1.3. Agaroze jel elektroforezi ve jel görüntüleme.....	29
3.2.1.4. Ligasyon ve transformasyon	30
3.2.1.5. Dizi analizleri	31
3.2.1.6. Plazmid izolasyonu.....	31
3.2.1.7. Jel özütlemeye tekniği ile saflaştırma	31
3.2.1.8. SDS-PAGE analizi	32
3.2.1.9. DNA ve plazmidlerin temizlenmesi ve DNA miktarının tayini	33
3.2.1.10. Southern blot (emdirimi)	33
3.2.1.11. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi	35
3.2.2 Diğer biyokimyasal analizler.....	36
3.2.2.1. Amilaz aktivitesi tayinleri	36
3.2.2.2. Protein analizi.....	37
3.2.3. Doğal <i>Bacillus subtilis</i> BK07 suşunun kesin tanınması ve α -amilaz geninin izolasyonu çalışmaları	37
3.2.3.1. <i>Bacillus subtilis</i> BK07 16SRNA diziliminin ve izolatlarda AmyEF/R korunmuş bölgesinin PCR ile çoğaltılması	37
3.2.3.2. PCR ürünlerinin <i>E. coli</i> 'de klonlanarak çoğaltılması ve dizi analizi	38
3.2.3.3. AmyEF/R ampliconu ile amilaz genine duyarlı etiketleme ve tespit.....	40
3.2.3.4. <i>Bacillus subtilis</i> BK07 ve <i>B. subtilis</i> PY22 kromozomlarında amyE genini dışardan keserek ayırmasını sağlayacak enzimlerin belirlenmesi	40
3.2.3.5. DNA mini-kütüphanesinin oluşturulması	41
3.2.3.6. Kromozom yürüyüşü (chromosome walking).....	43
3.2.3.7. Ters PCR (inverse PCR).....	44

3.2.4. <i>Bacillus subtilis</i> PY22'den amyE geni izolasyonu, dizi analizi ve <i>Pichia pastoris</i> 'de ekspresyonu.....	46
3.2.4.1. <i>Bacillus subtilis</i> PY22'den amyE geni izolasyonu ve dizi analizi	46
3.2.4.2. amyE geninin <i>Pichia pastoris</i> 'e aktarımı	46
3.2.4.3. <i>Pichia pastoris</i> 'de ekspresyon.....	47
3.2.5. Seçilen klonlarda amyE kopya sayılarının belirlenmesi	48
3.2.6. Seçilen <i>Pichia pastoris</i> suşunun salgıladığı rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu.....	49
3.2.6.1. Rekombinant protein üretimi ve saflaştırması, proteinin analizi	49
3.2.6.2. EndoH ile deglikozilasyon	50
3.2.6.3. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi	50
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	51
4.1. Bakterilerin Optimum Çoğalma Sıcaklıklarının Tespiti	51
4.2. Bakterilerin Amilaz Üretme Potansiyelinin Kontrolü.....	53
4.3. Klonlama Çalışmaları.....	54
4.3.1. DNA İzolasyonu	54
4.3.2. PCR ile AmyEF/R ve 16S rDNA bölgelerinin izolasyonu ve değerlendirmeleri.....	55
4.3.3. DIG etiketli probun kontrolü ve Southern emdirim denemesi ...	58
4.3.4. <i>Bacillus subtilis</i> BK07 α -amilaz genini klonlama çalışmaları ...	60
4.3.4.1. Koloni hibridizasyon tekniği	60
4.3.4.2. PCR yoluyla gen amplifikasyon denemeleri	63
4.3.4.3. Kromozom yürüyüşü (chromosome walking) uygulaması.....	66
4.3.4.4. Ters (inverse) PCR denemesi	70
4.3.5. <i>Bacillus subtilis</i> PY22 α -amilaz geninin klonlanması.....	71
4.3.5.1. <i>Bacillus subtilis</i> PY22 α -amilaz geninin PCR yoluyla amplifikasyonu	71
4.3.5.2. PCR yoluyla çoğaltılan <i>Bacillus subtilis</i> PY22 α -amilaz geninin saflaştırılması ve klonlanması	72

4.3.5.3. <i>Bacillus subtilis</i> PY22 amyE genine ait nükleotid dizisi ..	74
4.3.5.4. PY22-AmyE fragmanının PPicZaA vektörüne bağlanması, vektörün kontrolü	79
4.3.5.5. Konukçu <i>Pichia pastorise</i> 'e transformasyonu ve amyE ⁺ rekombinant klonların eldesi	82
<i>Klonların amilaz salgılama yeteneklerinin belirlenmesi</i>	83
<i>Klonların amilaz geni kopya sayılarının belirlenmesi ...</i>	86
4.3.5.6. Rekombinant amilaz üretimi ve kaynak suşun salgılama potansiyeli ile kıyaslama	88
4.3.5.7. Rekombinant enzimin saflaştırılması	92
4.3.5.8. Rekombinant enzimin karakterizasyonu	93
5. SONUÇ	100
6. KAYNAKLAR	102
7. EKLER	113
Ek-1. Çalışmalarda kullanılan çeşitli endonükleaz enzimleri ve bunlar için üretici firmanın tavsiye ettiği tepkime koşulları.....	113
Ek-2 Tez çalışması süresince çeşitli PCR denemeleri için kullanılan primerler ve özellikleri	114
Ek-3 EnzCheck enzimatik analiz kiti ile gerçekleştirilen fluorometrik amilaz aktivitesi analizi için elde edilen standart eğriye bir örnek ..	115
Ek-4 DNSA yöntemine uygun olarak gerçekleştirilen spektrofotometrik amilaz aktivitesi tayinleri için farklı derişimlerde maltoz çözeltileri ile hazırlanan standart eğriye bir örnek (a) ve okumanın gerçekleştirildiği analiz çözeltilerinin görüntüsü (b).....	116
Ek-5 BCA protein tayini için kullanılan standart eğri için bir örnek (a) ve okumanın gerçekleştirildiği analiz çözeltilerinin görüntüsü (b) ..	117
Ek-6 DNA dizilerinde bulunan 64 kodon ve bunların kodladığı amino Asitler	118
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

bç	baz çifti
d	devir
dak	dakika
e	Euler sabiti (yaklaşık değeri 2.71828'dir)
F	Faraday
kbç	kilo baz çifti
L	litre
μ	büyüme katsayısı
μ	mikro (10^{-6})
m	mili
M	molar
n	nano (10^{-9})
Ω	ohm
OD	optik yoğunluk (optical density)
ref	göreceli santriüj kuvveti (relative centrifugal force, G)
s	saniye
t	süre (saat cinsinden)
T_m	erime sıcaklığı (melting temperature)
T_D	katlanma süresi
U	ünite, enzim ünitesi
x_0	başlangıç hücre yoğunluğu
x_t	t süresi sonunda ölçülen hücre yoğunluğu
∞	sonsuz
#	numara

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Amp	ampisilin
amyE	α -amilaz geni
BCA	bisikolinik asit (bicicholinic acid)
BMGY	tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri (buffered glycerol complex medium)
BMMY	tamponlanmış karmaşık metanol besiyeri (buffered methanol complex medium)
BSA	sığır serumu albumini (bovine serum albumen)
CIP	buzacı barsak fosfatazı (calf intestinal phosphatase)
DIG	digoksijenin (digoxigenin)
DNA	deoksiribonükleik asit
DNSA	dinitrosalisilik asit (dinitrosalicylic acid)
ESEM	çevresel taramalı elektron mikroskobu (environmental scanning electron microscopy)
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food & Drug Administration)
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Regarded As Safe)
IPTG	izopropil β -D-1-1tiyogalaktopiranozid (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
LB	Luria-Bertani
LMP	Low Melting Point
MA	molekül ağırlığı
MCS	çoklu klonama bölgesi (multiple cloning site)
MM	temel metanol (minimal methanol)
MOPS	3-(N-morfolino)propansülfonik asit (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)
NMR	nükleer manyetik rezonans
PAGE	poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	polimeraz zincir tepkimesi (polymerase chain reaction)
rDNA	ribozomal DNA

Kısaltmalar (devamı)

RNA	ribonükleik asit
SDS	sodyum dodesil sülfat
SSC	tuzlu sodyum sitrat (saline sodium citrate)
XrDNA	kromozom DNA'sı
YPD	maya pepton dekstroz (yeast peptone dextrose)
YSD	dekstrozlu sentetik maya besiyeri (yeast synthetic medium with dextrose)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Nişastanın enzimatik parçalanmasında görev alan çeşitli enzimler (van der Maarel vd 2002)	9
Şekil 2.2.	Triozfosfat izomerazın klasik paralel(β/α) ₈ -fiçısı yapısı (Horvátová vd 2001)	10
Şekil 2.3.	<i>B. subtilis</i> 'e ait protein molekülünün kristal yapısı. (a) β -yapraklarından oluşan TIM fiçısının görünümü, (b) enzim aktivitesi için gerekli olan 3 adet kalsiyum iyonunun bulunduğu (gri) ve aktif bölgesinde maltopentaoz (C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆) bulunan (kırmızı-gri) molekül kompleksi görüntüsü	11
Şekil 2.4.	Glikozit bağının kırılması sırasında gerçekleşen katalitik mekanizma (van der Maarel vd 2002).....	12
Şekil 2.5.	Nişasta moleküllerinin iki ana bileşeni olan (a) amiloz ve (b) amilopektinin kimyasal yapıları (BeMiller ve Whistler (1996)'dan uyarlanmıştır.).....	17
Şekil 2.6.	Dondurularak çatlatılmış, α -amilaz ile muamele edilmiş patates nişastası granülünün ESEM görüntüsü (A. M. Donald'ın katkısıyla)	18
Şekil 2.7.	Nişasta granülünde amiloz ve amilopektinin oluşturduğu yapının çeşitli düzeylerdeki şematik görünümü (Gallant vd 1997).....	19
Şekil 2.8.	<i>P. pastoris</i> 'in metanol metabolizması için gerçekleştirdiği biyokimyasal tepkimeler (Cereghino ve Cregg 2000).....	23
Şekil 3.1.	SDS-PAGE analizlerinde kullanılan Mini-Cell yürütme haznesi kesit görüntüsü	32
Şekil 3.2.	Agaroz jelde bulunan DNA iplikçiklerinin naylon membrana aktarılması için uygulanan Southern emdirim analizi düzeneğinin kesit görüntüsü	34
Şekil 3.3.	Küt uçlu PCR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan Blunt II Topo vektör kompleksi.....	39
Şekil 3.4.	pUC19 klonlama vektörü	41

Şekil 3.5.	Koloni kaldırma yönteminin ilk basamağı olarak uygulanan kolonileri membrana aktarma tekniği.....	43
Şekil 3.6.	<i>Hind</i> III endonükleazı ile kesilmiş DNA parçalarına bağlanan adaptörlerin şematik gösterimi	44
Şekil 3.7.	Ters PCR denemesindeki aşamaların şematik gösterimi.	45
Şekil 4.1.	<i>B. subtilis</i> BK07 (a) ve <i>B. subtilis</i> PY22 (b) suşlarına ait büyüme eğrileri	52
Şekil 4.2.	Saf kültürlerle aşılanan nişastalı agar plakalarının Lugol çözeltisi ile boyanmış görüntüleri (a): <i>B. subtilis</i> BK07; (b): <i>B. subtilis</i> PY22; (c) <i>B. subtilis</i> RSK244; (d) <i>B. subtilis</i> RSK246; (e) <i>E. coli</i> NEB Turbo	53
Şekil 4.3.	Elde edilen bakteriyel genom DNA'sı izolatlarının jel görüntüleri ve 1 µL örnekle yüklenen DNA miktarları, M: MA standardı; (a): <i>B. subtilis</i> RSK244 ; (b): <i>B. subtilis</i> RSK246; (c) <i>B. subtilis</i> BK07; (d-e) <i>B. subtilis</i> PY22	54
Şekil 4.4.	PCR ürünlerinin kontrolü	55
Şekil 4.5.	<i>B. subtilis</i> BK07 suşuna ait 16S rDNA spacer bölgesine ait bazı özellikler ve nükleotid dizisi	55
Şekil 4.6.	<i>B. subtilis</i> BK07 suşuna ait amilaz geninin orta bölgelerinde PCR yoluyla çoğaltılan AmyEF/R bölgesine ait bazı özellikler ve nükleotid dizisi	56
Şekil 4.7.	<i>B. subtilis</i> PY22 suşuna ait amilaz geninin orta bölgelerinde PCR yoluyla çoğaltılan AmyEF/R bölgesine ait bazı özellikler ve nükleotid dizisi	57
Şekil 4.8.	Bakterilerin birbiri ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç	57
Şekil 4.9.	DIG etiketli AmyEF/R probunun verimlilik testi (a) DIG etiketli AmyE/F probu (b) standart DIG probu	58
Şekil 4.10.	Southern blot analizinde kullanılmak üzere, çeşitli restriksiyon endonükleazları ile parçalanmış <i>B. subtilis</i> BK07 ve <i>B. subtilis</i> BK07 kromozom DNA'larının yürütüldüğü agaroz jeli görüntüsü	59

Şekil 4.11.	<i>B. subtilis</i> BK07 ve <i>B. subtilis</i> PY22 kromozom DNA'larının çeşitli restriksiyon endonükleazları ile parçalanarak gerçekleştirildiği Southern emdirimi - DIG etiketleme sonucu	60
Şekil 4.12.	Mavi-beyaz koloni oluşumu ile ligasyon transformasyon verimliliğinin gözlenebildiği plakalardan bir örnek.....	61
Şekil 4.13.	Transformasyon sonrası amyE probu kullanılarak yapılan taramada elde edilen kolonilerin aktarıldığı çizgi ekim plakası ve aynı plakadan elde edilen koloni hibridizasyon filmi görüntüsü	62
Şekil 4.14.	Kütüphane plakalarından belirlenen 9 adet klonun AmyEF/R fragmanının varlığı için PCR denemesi sonucu	62
Şekil 4.15.	Kütüphane plakalarından belirlenen 9 adet klonun AmyEF/R fragmanının varlığı için PCR denemesi sonucu	63
Şekil 4.16.	AmyFATG ve AmyRSTOP primer çifti ile PCR denemesi.....	64
Şekil 4.17.	AmyEF-AmyER primer çifti ile PCR denemesi	65
Şekil 4.18.	Bütün almaz geninin amplifikasyonu için PCR denemesi	65
Şekil 4.19.	Kromozom yürüyüşü için gerçekleştirilen PCR denemesi sonrasında yürütülen agaroz jeli görüntüsü	66
Şekil 4.20.	Kromozom yürüyüşü için tasarlanan primerlerle elde edilen ~1.3 kbç büyüklüğünde PCR ürünü için (a) yürütülen ve parçanın alındığı agaroz jeli ve (b) TopoII Blunt vektörü ile klonlanarak elde edilen 3 transformantın plazmid izolatlarının <i>EcoRI</i> ile kesilerek yürütülmüş jel görüntüleri.....	67
Şekil 4.21.	<i>B. subtilis</i> BK07 amyE geni orta bölgesinde belirlenen baz dizisi ve kodladığı aminoasit dizisi	68
Şekil 4.22.	<i>B. subtilis</i> BK07 amyE 3'- uç bölgesi için belirlenen baz ve kodladığı aminoasit dizisi.....	69
Şekil 4.23.	<i>Bacillus subtilis</i> BK07 suşuna ait amilaz genine ait belirlenen nükleotid dizisinin <i>B. subtilis</i> 168 suşuna ait amilaz geni dizisi ile eşleştirilmesinin şematik gösterimi	69

Şekil 4.24.	Ters PCR denemesi için gerçekleştirilen, kalıp olarak adaptör ilaveli kendi üzerine bağlanmış olan <i>Hind</i> III ile kesilmiş 4.5-5.5 kbç büyüklüğünde <i>B. subtilis</i> BK07 kromozom DNA'sı, primer çiftleri olarak da (a) INV1 ile INVR1 ve (b) INV2 ile INVR2'nin kullanıldığı PCR denemesi için yürütülen agaroz jeli görüntüsü	70
Şekil 4.25.	<i>B. subtilis</i> PY22 amilaz geninin PCR yoluyla çoğaltıldığı deneme sonrasında yürütülen agaroz jelde beklendiği gibi 2 kbç civarında görülen temel bantlar	71
Şekil 4.26.	<i>B. subtilis</i> PY22 amilazının AmyFPml ve AmyRKpn primerleri ile çoğaltıldığı parçanın (PY22-AmyE) saflaştırılması için yürütülen jelin görüntüsü (a) ve bu jelden 2 kbç büyüklüğündeki bant kesildikten sonraki görüntüsü	72
Şekil 4.27.	PY22AmyE fragmanını taşıdığı düşünülen plazmidlerin kontrolü için yürütülen agaroz jelinin görüntüsü	73
Şekil 4.28.	PY22AmyE fragmanını taşıyan Blunt II Topo vektörü ve üzerindeki <i>Eco</i> RI, <i>Pml</i> I ve <i>Kpn</i> I endonükleaz kesim yerleri	73
Şekil 4.29.	TopoII Blunt PY22-AmyE plazmidinin endonükleaz enzimleriyle kesilmesi sonucu oluşan jel deseni	74
Şekil 4.30.	PY22-AmyE fragmanının nükleotid dizisi ve kodladığı amino asit dizisi	75-76
Şekil 4.31.	<i>B. subtilis</i> 168, <i>B. subtilis</i> PY22 ve <i>B. subtilis</i> BK07 suşlarına ait α -amilaz genlerinin homolojisi	78
Şekil 4.32.	TopoII Blunt PY22-AmyE plazmidinin <i>Hind</i> III ve <i>Xho</i> I ile kesimi sonrası yürütülen jel ve 2098 bç büyüklüğündeki bandın jelden alınmış hali	79
Şekil 4.33.	pPicZ α AmyE plazmidi için elde edilen transformasyon plakasından seçilen 4 koloniden elde edilen plazmid izolatlarının ve bunların <i>Pml</i> I ve <i>Kpn</i> I enzimleri ile kesiminin jel elektroforez görüntüsü	80

Şekil 4.34.	pPicZaAmyE plazmidi için elde edilen transformasyon plakasından seçilen 2 klondan elde edilen plazmid izolatlarının <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> ve <i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i> enzimleriyle kesiminin jel elektroforez görüntüsü.....	81
Şekil 4.35.	pPicZaAmyE(1) plazmidi için genin tamamını ve içinden AmyEFR bölgesini amplifiye etmek için yapılmış PCR sonrası yürütülen agaroz jeli görüntüsü.....	81
Şekil 4.36.	pPicZaAmyE vektörü ile transforme edilen <i>P. pastoris</i> KM71H hücreleri için elde edilen plakalar.....	82
Şekil 4.37.	Seçilen <i>P. pastoris</i> KM71H transformantlarının amilaz salgılama yeteneğini doğrulama amacıyla nişatalı agarda üretilen 8 koloni ve transforme edilmemiş kontrol suşu	83
Şekil 4.38.	Elde edilen <i>P. pastoris</i> klonlarının 12 saatlik kültür süpernatantları ile hazırlanan örneklerin yürütüldüğü % 4-12'lik Bis-Tris SDS-PAGE jeli.....	85
Şekil 4.39.	Elde edilen <i>P. pastoris</i> klonlarının 24 saatlik kültür süpernatantları ile hazırlanan örneklerin yürütüldüğü % 4-12'lik Bis-Tris SDS-PAGE jeli.....	86
Şekil 4.40.	Seçilmiş 8 klonda amyE geni kopya sayılarını belirlemek için gerçekleştirilen Southern analizi ile elde edilen film görüntüsü.	87
Şekil 4.41.	amyE genini içeren klonların amilaz üretimleri	88
Şekil 4.42.	amyE genini içeren klonların gen kopya sayıları ve 3. gün itibarıyla amilaz üretimlerinin kıyaslaması	89
Şekil 4.43.	<i>Bacillus</i> suşları ile gerçekleştirilen 3 günlük fermantasyonda hücre dışı sıvıda tayin edilen amilaz aktiviteleri	90
Şekil 4.44.	amyE genini içeren klonların sırasıyla 24. 48. ve 72. saat fermantasyon örneklerinin SDS-PAGE analizi ile elde edilen jel görüntüleri	91
Şekil 4.45.	Saflaştırma işlemlerinin çeşitli aşamalarından alınan örneklerin SDS-PAGE (NuPAGE®, 10% Bis-Tris Gel) görüntüsü.....	93

Şekil 4.46.	Saflaştırma işlemlerinin çeşitli aşamalarından alınan örneklerin ve <i>EndoH</i> enzimi ile muamele edilen kısmi saflaştırılmış amilazın SDS-PAGE (NuPAGE®, 10% Bis-Tris Gel) görüntüsü.....	95
Şekil 4.47.	Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflaştırılan amilazın çeşitli pH'larda gösterdiği aktivite değerleri	96
Şekil 4.48.	Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflaştırılan amilazın çeşitli sıcaklıklarda gösterdiği aktivite değerleri.....	97
Şekil 4.49	Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflaştırılan amilazın pH 7'de ve değişen sıcaklık koşullarında sergilediği ısı kararlılık değerleri.....	98
Şekil 4.50.	Rekombinant amilazın pH'sı 6.9'a ayarlanmış olan 0.1 M MOPS çözeltisinde ve aynı çözeltide 0.1 M Ca^{++} varlığında aktivite değişimi	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Amilaz üretimi ile ilgili alınan ilk patentler (Neidleman 1991).....	6
Çizelge 2.2. Bilinen glikozil hidrolaz 13 ailesi enzimlerine örnekler	8
Çizelge 3.1. PCR ısı döngü programları.....	29
Çizelge 3.2. <i>B. subtilis</i> 'in α -amilaz geninin çoğaltılması için PCR denemesinde kullanılan ısı döngü programı.....	46
Çizelge 4.1. <i>B. subtilis</i> BK07 ve <i>B. subtilis</i> PY22 suşlarına ait büyüme fonksiyonları ve katlanma süreleri.	53
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan bakteriyel suşların birbirlerine yakınlıklarının yüzdesel olarak karşılaştırması	58
Çizelge 4.3. <i>B. subtilis</i> PY22 ve <i>B. subtilis</i> 168 suşlarında amyE nükleotid dizileri ve kodladıkları AmyE proteinlerinde amino asit dizileri arasında farklılık gösteren bölgenin kıyaslaması	77
Çizelge 4.4. Seçilmiş 8 adet transformant suş için geliştirilen indüksiyon kültürlerinin absorbans ve optik yoğunluk (OD) değerleri	84
Çizelge 4.5. Rekombinant amilazı kısmen saflaştırmak için uygulanan işlemlerden elde edilen bazı değerler	92

1. GİRİŞ

Enzimler, hücreler ve organizmalardaki reaksiyonları hızlı, seçici ve verimli olarak katalizleyen ve kontrol eden protein yapısında katalizörlerdir. Canlı hücre dışında da, uygun ortam koşulları var olduğunda enzimlerin fonksiyonlarını yerine getirdiği bilinmektedir. Günümüz endüstriyel üretimlerinde canlı hücre fermantasyonları kullanılabildiği gibi izole edilmiş enzimlerden faydalanan teknolojik üretim işlemleri de yaygın olarak mevcuttur.

Dünya endüstriyel enzim piyasası hem sektörün mali geliri hem de üretim miktarları göze alındığında sürekli artan bir eğilim göstermektedir. Amilazlar, bu sektör içinde en önemli olan ve üretimi en eskilere dayanan enzim gruplarından biridir. Piyasada en yüksek talebe ve en büyük paya sahip olan α -amilaz enzimi nişastanın α -1-4 glikozidik bağlarını hidrolize eder ve ana kullanım alanı nişasta endüstrisinde olmakla birlikte fırın ürünlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Gupta vd 2003).

Türkiye’de gıda üretimlerine uygun saflıkta bakteriyel amilaz ve proteaz ürettiği bilinen çok az sayıda şirket mevcuttur. Gerçekleştirilen bilimsel araştırmalar ise ağırlıklı olarak tarımsal ürünlerin ve tarım endüstrilerinin atıklarının değerlendirilmesine veya üretilen mikrobiyal enzimlerin kinetik karakterizasyonuna veya sabitlenmesine (immobilizasyonuna) yönelik çalışmalar olmuştur (Özcengiz 1996).

Günümüzde biyoteknolojik alanda verimliliğin sağlanabilmesi ve enzim üretimlerinde lider durumunda olan büyük kuruluşlarla rekabet edilebilmesi için moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması şarttır (Olempska-Beer vd 2006). Bu yöntemler içinde rekombinasyon önemlidir ve rekombinant teknoloji ile üretilen enzimlerin pazar payının 1992 yılında %50 olduğu bildirilmiştir (Buchholtz vd 2005).

Amilazlar hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilebiliyor olsa da sanayi ölçeğindeki talepler ancak mikroorganizmalar kullanılarak üretilen mikrobiyal amilazlarca karşılanabilmektedir. Son 30 senedir moleküler biyoloji ve gen mühendisliği alanındaki gelişmeler sayesinde endüstriyel enzim üretiminde

kullanılabilecek suşların geliştirilmesi ve tasarlanmış proteinlerin üretimi için yeni fırsatlar doğmuştur (Kirk vd 2002). Biyoteknolojik üretimlerde birim maliyetin düşürülmesine yönelik olarak atılabilecek en etkin adım suşun geliştirilmesidir ki bunun da gerçekleşmesi üç işlemin gerçekleştirilmesi sayesinde olur; genetik değişiklik, fermentasyon ve analiz (Parekh vd 2000). Bu çalışmalarda gen kaynağı olarak kullanılacak organizmalar doğrudan doğal ortamlarından izole edilebildiği gibi çeşitli kültür koleksiyonlarına dahil edilmiş organizmalar da olabilmektedir.

Pichia pastoris de son 20 yıl süresince bu şekilde geliştirilen ve heterolog protein üretimi amaçlı gen aktarımları için tercih edilen konakçı organizmalardan biri haline gelen, metanolü karbon kaynağı olarak değerlendirebilen bir maya türüdür (Zhang vd 2005). *P. pastoris* kullanımının sağladığı bazı avantajlar şöyle sıralanabilir; (1) verimli ve sıkı denetim altında çalışan AOX1 promotörünün mevcut oluşu, (2) glikozilasyonun genellikle en fazla 20 adet kalıntı ile ve nispeten daha kısa zincirli N-bağlı yüksek-mannozlu oligosakaritlerle gerçekleşmesi, (3) entegrasyonu sağlanan genlerin çoklu kopyalar halinde bulunduğu kararlı yapıda transformantların elde edilebilmesi, (4) yabancı proteinleri yüksek seviyelerde salgılayabilme yeteneği, ve (5) yüksek hücre yoğunluklu üretime uygunluğu ve ölçek büyütmenin kolay oluşu (Demain 2005).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 2006 yılında özel bir şirket tarafından *P. pastoris*'de rekombinant olarak üretilen *B. subtilis* kaynaklı bir enzimin GRAS statüsünde değerlendirilmesi başvurusunu olumlu cevaplandırmıştır (Anonymous 2006).

Ülkemizde genetiği değiştirilmiş organizmalara ilişkin yasal düzenlemeler henüz tamamlanmamıştır. Konu, ağırlıklı olarak Avrupa Birliği'ne uyum sürecinde uygulanması düşünülen ulusal program kapsamında, genetiği değiştirilmiş organizmaların veya bunlar kullanılarak elde edilen ürünlerin etiketlenmesi hususunda değerlendirilmektedir (Anonim 2003). 2007-2013 yıllarını kapsayan IX. Beş Yıllık Kalkınma planında da belirtildiği gibi genetiği değiştirilmiş organizmaların ve biyoteknoloji ürünlerinin kullanımı ve dolaşımı konusunda standartların oluşturulma ihtiyacı halen devam etmektedir (Anonim 2006).

Bu çalışmanın öncelikli hedefi sanayinin pekçok dalında yaygın kullanımı olan α -amilaz enziminin rekombinant olarak yüksek verimlilikle üretebilecek ve ileride ticari olarak değerlendirilebilecek, genetiği değiştirilmiş bir maya suşunun geliştirilmesi ve böylece dünya çapında gerçekleştirilen enzim üretimi ile rekabet edebilme avantajını sağlayabilecek bir mikrobiyal kaynağın oluşturulmasıdır. Ayrıca, çalışmanın tamamlayıcı unsuru olarak üretilen rekobinant proteinin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, gen kaynağı olarak sünmüş ekmekten izole edilen ve *Bacillus subtilis* türünden olduğu doğrulanan doğal bir bakteri suşunun kullanılması düşünülmüştür. Ancak yoğun çabalara rağmen bu bakteride α -amilaz proteinini kodlayan DNA diziliminin proteinin N-terminus ucunu kodlayan bölgesi aydınlatılamamıştır. Bunun üzerine ikinci bir aşama olarak, çalışmalarda PCR yoluyla genin amplifikasyonunda başarı sağlanan *B. subtilis* PY22 suşu kullanılmıştır. *B. subtilis* PY22'e ait amilaz geni *P. pastoris* KM71H hücrelerine aktararak konukçu hücrede bulunan AOX1 promotörü ile çalışan metanol tetiklemeli (indüksiyonlu) ekspresyon sayesinde üretilen α -amilaz hücre dışı ortama salgılanmıştır. Elde edilen rekombinant *P. pastoris* suşu ile enzimin üretimi gerçekleştirilmiş ve enzim kısmen saflaştırılarak optimum çalışma koşulları, molekül ağırlığı ve glikozilasyonu gibi özellikleri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. *Bacillus subtilis* ve Diğer *Bacillus* Türleri

Bacillus cinsi endospor oluşturabilen, aerobik çubuk-şeklinde pek çok bakteri türünü barındıran kalabalık bir bakteri grubudur. *B. amiloliquefaciens*, *B. atropheus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* ssp. *subtilis*, *B. subtilis* ssp. *spizizenii*, ve *B. vallismortis* “subtilis” grubuna dahil olan 1 µm’den daha küçük çapı olan, sporanjiaları şişkin olmayan, elipsoidal sporları olan, prensipte mezofilik ve nötrofilik özellikte bakterilerdir. Bu organizmaların tamamı fizyolojik olarak birbirine çok benzer ve 16 rRNA/DNA 1. grubuna dahil edilmişlerdir (Fritze 2002).

İnsanoğlu çok eskilerden beri *Bacillus* türlerinden istifade etmiştir. Bu bakteriler, metabolik çeşitliliklerinden faydalanılarak muhtelif endüstriyel uygulamalarda kullanılmışlardır ve bunlar yardımıyla α-amilaz, alkalın proteazlar vb. hidrolitik enzimlerin, basitrasın, gramisidinler, polimiksinler vb. polipeptit antibiyotiklerin, δ-endotoksinler gibi böcek öldürücülerin ve D-riboz, pürin nükleotidleri vb. lezzet geliştiricilerin üretimi gerçekleştirilmektedir (Schallmey vd 2004).

B. subtilis 168 genomik karakterizasyon için öncelikli olarak seçilen bir organizma olmuştur ve Avrupalı, Japon ve ABD’li araştırma gruplarından oluşan bir konsorsiyumun projesi kapsamında 4,100 protein-kodlayan gen içeren genom dizisinin tamamı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar özet olarak Kunst vd (1997) tarafından yayınlanmıştır.

B. subtilis’in genetik dizisinin belirlenmesi öncesinde ve sonrasında yayınlanan, bu organizma üzerine yazılmış kapsamlı kitaplar mevcuttur (Sonenshein vd 2002, Sonenshein vd 1993).

B. subtilis, *B. licheniformis*, *B. megaterium* başta olmak üzere bazı *Bacillus* türleri ekmekte “sünme” olarak adlandırılan bir kusura sebep olduğu bilinmektedir

(Erem 2007). Sünme, pişirme aşamasında sporlu yapıları sayesinde hayatta kalabilen bakterilerin uygun sıcaklık ve nem ortamını bulduklarında çoğalmasıyla gelişir ve bu bakterilerin hücre dışına salgıladıkları proteolitik ve amilolitik enzimlerle ekmek içi yapışkan, kötü kokulu bir hale dönüştürerek tüketilemez hale gelir. Bu olgunun etmeni olan bakterilerin etkin amilaz ve proteaz enzimlerine sahip olması, ve organizmaların geliştiği ılıman ortamda bu enzimlerin yüksek aktivite göstermesi, sünme etmeni *Bacillus* türlerini α -amilaz için gen kaynağı olmaya aday organizmalar olarak karşımıza çıkarmıştır.

Bacillus türlerinin tanımlanmasında DNA dizi homolojisi kıymetli bir kriterdir. *B. subtilis* 168 (ATCC 6051), Marburg suşu olarak da bilinir ve 1936'da yeni bir *B. subtilis* suşu olarak tayin edilmiş ve böylece *B. cereus* ve *B. licheniformis* arasında oluşan karmaşanın giderilmesi sağlanmıştır. *B. subtilis* 168 ile homoloji olarak sırasıyla %70 ve %85 benzerlik gösteren iki diğer suş *B. natto* ve *B. amylosacchariticus*'dur. Bu üç bakteriye ait amilazların birbirine çok yakın diziye sahip olduğu bilinmektedir (Priest 1993).

2.2. α -Amilaz Enzimi ve Diğer Amilazlar

2.2.1. α -Amilaz ile ilgili çalışmaların tarihi gelişimi

Tarihte bir enzimin varlığı ilk olarak Payen ve Persoz (1833) tarafından malt özütünün alkol çöktisinde bulunan ve ısı etkisinde parçalanabilen bir maddenin nişastayı glikoza parçaladığını göstermeleri ile tespit edilmiştir. Bu maddeye (Yunancada fermentasyon anlamına gelen) “diastaz” adı verilmişti ancak bu enzim günümüzde amilaz olarak anılmaktadır.

Yarım asır kadar sonrasında Atkinson geleneksel bir Japon ürünü üzerine yazdığı bir inceleme yazısında işlenmiş pirinç tanelerine küf sporları aşıl原因arak 4 gün süren bir inkübasyonla üretilen “koji”nin amilaz aktivitesi üzerine araştırmalarını rapor etmiş, ve ürünün maltdan farklı bir ürün olduğuna vurgu yapmıştır (Atkinson 1881).

1890'lara gelindiğinde Takamine mikrobiyal amilaz izolasyonu çalışmalarına başlamış ve (günümüzde Genecor şirketinin büyesinde yer alan) Miles Laboratories şirketini kurmuştur (Poulsen ve Bucholz 2002). Bir Japon göçmeni olan Takamine, koji üretiminde olduğu gibi, amilazı haşlanmış tahıla *Aspergillus oryzae* aşılayarak yüzey fermentasyonu ile üretmiş ve 1894 yılında diastatik enzim üretimi üzerine, ABD tarihinde mikrobiyal enzim üretimi için alınan ilk patenti geliştirmiştir. Bu çalışmayı, ilerleyen yıllarda pek çok patent çalışması izlemiştir. Amilaz enzimi üretimi ile ilgili alınan ilk patentlerin bir listesi Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Amilaz üretimi ile ilgili alınan ilk patentler (Neidleman 1991)

<i>Buluş Sahibi</i>	<i>Patent Yılı</i>	<i>Patent Başlığı</i>
J. Takamine	1894	Diastatik enzim üretim işlemi
J. Takamine	1906	Diastatik madde ve üretim işlemi
J. Takamine	1911	Enzim
J. Takamine	1911	Amilolitik enzim
S. Frankel	1915	Diastaz imalatı
I. Pollak	1915	Diastaz preparatları ve üretim işlemi
I. Pollak	1915	Malt özütü ve üretim işlemi
A. Biodin / J. Effront	1917	Amilazımsı karışımın muamelesi işlemi
A. Biodin / J. Effront	1917	Fermentların oksidasyonu ile diastazların ve toksinlerin üretimi

Avrupa Patent Bürosu (European Patent Office) web sitesinde (<http://ep.espacenet.com/>) dünya patent veritabanı kullanılarak gerçekleştirilen ve son 20 seneyi kapsayan güncel bir taramada başlığında “alfa” ve “amilaz” amilaz sözcüklerinin geçtiği 1,300'den fazla patent alındığı görülmüştür (Anonymous 2009a).

2.2.2. Yeni enzimlerin buluşu için geliştirilen teknolojiler

Doğal mikroorganizmalar yıllardan beridir enzim çeşitliliğini temin eden vazgeçilemez bir kaynak olmuştur. Biyoinformatik alanındaki gelişmeler ve dizi verilerinin ulaşılabilirliği ilgi duyulan bir genin doğadan izolasyonunu kolaylaştırmıştır. 1980'lerden itibaren, akılcı protein mühendisliği ile proteinlerin yapısında

oluşturulabilen değişimler ve dolayısı ile proteinin biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerinin değiştirilebilmesi enzim optimizasyonu açısından önemli bir araç olmuştur (Kirk vd 2002). Daha yeni olarak kullanılan teknolojik araçlardan biri yönlendirilmiş evrimdir (Johannes ve Zhao 2006) ve bu şekilde arpa amilazının aktivitesini yükselten çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Textor vd 1998, Wong vd 2004).

α -Amilazların pH profillerinin ve termostabilitelerinin kullanılacakları uygulamaya uygun olması gereklidir. Dolayısıyla, uygulamaların çeşitliliği yeni ve özellikleri geliştirilmiş α -amilazlar için ihtiyaç yaratmaktadır (Sivaramakrishnan vd 2006). Yeni enzimlerin tanılanması, klonlanması ve endüstriyel ölçekte üretme kabiliyetinin geliştirilmesiyle kimya ve gıda endüstrileri için yeni uygulama ve biyolojik işleme alanları geliştirilmesine olanak sağlanmaktadır (Jarnagin ve Ferrari 1992). Nişastaya-etki eden yeni enzimlerin tanılanmasında kısa zamanda, en yüksek sayıda gen veya organizma verisi sağlayabilecek hassas ve verimli stratejilerin uygulanması şarttır. Bunun bir yolu enzim aktivitesinin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilen taramalardır. Alternatif ve daha yeni uygulanan bir yöntem ise doğadan organizmalardan ziyade doğrudan kromozomların örneklenerek dejenere primer çiftleri yardımıyla belirli genlerin klonlanmasıdır (Butler vd 2004).

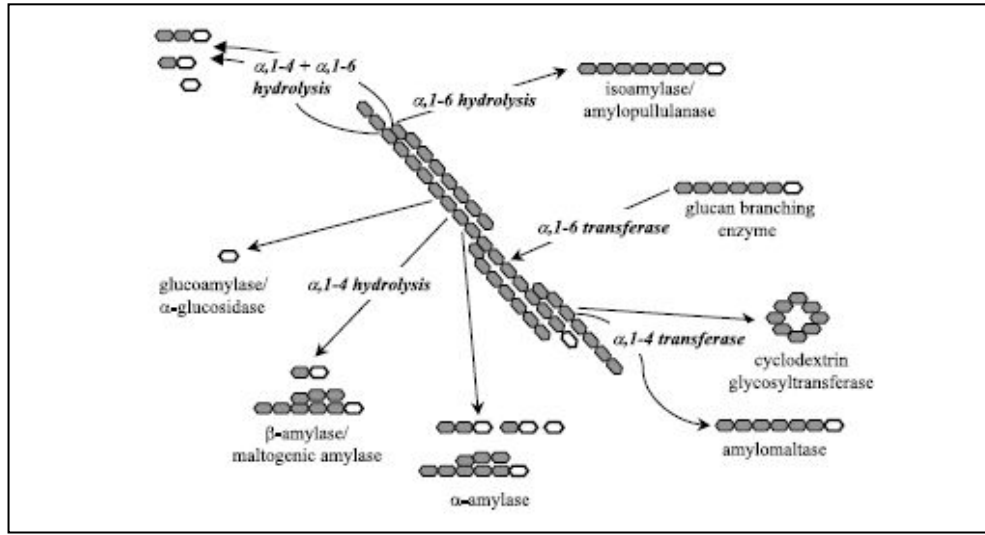
2.2.3. Amilaz grubu enzimler

Amilazlar nişasta moleküllerini hidrolize ederek dekstrinleri ve daha düşük sayıda glikoz biriminden müteşekkil polimerlerin oluşmasını sağlayan enzimlerdir (Windish ve Mhatre 1965). α -Amilaz glikoz moleküllerinin oluşturduğu polimerleri belirli özgülükte (specificity, spesifisite), α -1-1, α -1-4 ve α -1-6 bağ noktalarından etki eden ve ortak özellikleri bulunan çeşitli enzimlerin ait olduğu bir enzim ailesidir. Nişastanın hidrolizini sağlayabilen enzimlerin çoğu aminoasit dizilerine göre gerçekleştirilen sınıflandırmaya göre glikozil hidrolaz 13 ailesine üyedir (Reddy vd 2003). Aile 13'e üye glikozil hidrolazlar UniProt (The Uniprot Consortium, 2008) veritabanı (Anonymous 2009b) kullanılarak Çizelge2.2'de derlenmiştir. Bu tabloda da görülebildiği üzere bu enzimler en az 21 farklı tipte reaksiyonu katalize edebilmektedir.

Çizelge 2.2. Bilinen glikozil hidrolaz 13 ailesi enzimlerine örnekler (Uni-Prot veri tabanı kullanılarak düzenlenmiştir)

Uni-prot kodu	Protein adi	Gen	Kaynak organizma	Protein Uzunluğu	EC numaraları
P00691	Alpha-amylase (1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase)	amyE	<i>Bacillus subtilis</i>	660	3.2.1.1
Q84HD6	Amylosucrase	ams	<i>Neisseria meningitidis</i>	636	2.4.1.4
O06994	Oligo-1,6-glucosidase (Oligosaccharide alpha-1,6-glucosidase) (Sucrase-isomaltase) (Isomaltase) (Dextrin 6-alpha-D-glucanohydrolase)	malL	<i>Bacillus subtilis</i>	561	3.2.1.10
P39118	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (Glycogen-branching enzyme) (1,4-alpha-D-glucan:1,4-alpha-D-glucan 6-glucosyl-transferase)	glgB	<i>Bacillus subtilis</i>	627	2.4.1.18
P17692	Cyclomaltodextrin glucanotransferase (Cyclodextrin-glycosyltransferase) (Raw-starch-digesting amylase)	cgt	<i>Bacillus</i> sp. (B1018)	713	2.4.1.19
P53341	Alpha-glucosidase MAL12 (Maltase)	MAL12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	584	3.2.1.20
P21517	Maltodextrin glucosidase (Alpha-glucosidase)	malZ	<i>Escherichia coli</i> (K12)	605	3.2.1.20
P80099	4-alpha-glucanotransferase (Amylomaltase) (Disproportionating enzyme)	mgtA	<i>Thermotoga maritima</i>	441	2.4.1.25
O33840	Pullulanase (Alpha-dextrin endo-1,6-alpha-glucosidase) (Pullulan 6-glucanohydrolase)	pulA	<i>Thermotoga maritima</i>	843	3.2.1.41
P38939	Amylopullulanase (Alpha-amylase/pullulanase) [Includes: Alpha-amylase (1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase); Pullulanase (1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase)]	apu	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	1481	3.2.1.1; 3.2.1.41
Q08341	Cyclomaltodextrinase (Cyclomaltodextrin hydrolase, decycling)		<i>Bacillus sphaericus</i>	591	3.2.1.54
P22963	Glucan 1,4-alpha-maltotetraohydrolase (Maltotetraose-forming amylase)	mta	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	551	3.2.1.60
O32611	Isoamylase	iam	<i>Flavobacterium</i> sp.	777	3.2.1.68
Q59905	Glucan 1,6-alpha-glucosidase (Dextran glucosidase) (Glucodextranase)	dexB	<i>Streptococcus equisimilis</i>	537	3.2.1.70
P39795	Trehalose-6-phosphate hydrolase (Alpha, alpha-phosphotrehalase)	treA	<i>Bacillus subtilis</i>	561	3.2.1.93
P19571	Glucan 1,4-alpha-maltohexaosidase (Maltohexaose-producing amylase)		<i>Bacillus</i> sp. (707)	518	3.2.1.98
Q8X6X8	Glycogen debranching enzyme (Glycogen operon protein glgX)	glgX	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	657	3.2.1.- 3.2.1.2; 3.2.1.1
P21543	Beta/alpha-amylase [Includes: Beta-amylase; Alpha-amylase]		<i>Paenibacillus polymyxa</i>	1196	3.2.1.1
Q44315	Maltotriose trehalase synthase ((1,4)-alpha-D-glucan 1-alpha-D-glucosylmutase)	treY	<i>Arthrobacter</i> sp. (Q36)	775	5.4.99.15
O06458	Trehalose synthase (Maltose alpha-D-glucosyltransferase)	treS	<i>Thermus thermophilus</i>	963	5.4.99.16
Q04977	Maltogenic alpha-amylase (Glucan 1,4-alpha-maltohydrolase)	blmA	<i>Bacillus licheniformis</i>	578	3.2.1.133
P38940	Neopullulanase	npIT	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	588	3.2.1.135
Q10769	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase (4-alpha-D-((1->4)-alpha-D-glucano)trehalose trehalohydrolase)	treZ	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	580	3.2.1.141

Substrat molekülünde kırdığı bağların pozisyonuna bağlı olarak amilazlar endo veya ekzo şeklinde kategorize edilebilirler. Beta-amilaz bir ekzo-enzimdir ve sadece nişasta molekülünün uç kısmını hedef alarak maltoz birimlerine hidrolize eder (Whitaker 1996, Wong ve Robertson 2002b). Endoamilazlar amiloz molekülünü rastgele bağ noktalarından hidrolize ederek son ürün olarak çeşitli uzunluklarda maltodekstrinleri oluştururlar. α -Amilaz en yaygın bakteri kaynaklı endo amilazdır ve son ürünlerin hidroliz noktasındaki glukoz biriminde bulunan 1 numaralı karbonu α -konfigürasyonunda bırakır (Vihinen ve Mäntsälä 1989). Şekil 2.1’de çeşitli amilazların nişasta molekülüne etki ettiği bağ noktaları ve parçalama ürünleri gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Nişastanın enzimatik parçalanmasında görev alan çeşitli enzimler (van der Maarel vd 2002). Açık renk altıgen glukoz polimerinin indirgen ucunu gösterir.

Endoamilazlar, enzimi karakterize etmek amacıyla uygulanan ilk metoda bağlı olarak α -amilaz, izoamilaz, pullulanaz, izopullulanaz, neopullulanaz, oligo-1,4-glukosidaz, oligo-1,6-glukosidaz veya siklodekstrin glukanotransferaz (CGTaz) olarak adlandırılmış olabilirler. Dallanmaları çözücü enzimler (izoamilazlar ve pullulanazlar) nişasta ve/veya pullulanda $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidik bağları kırabildikleri gibi kullanılan enzime, substrata ve tepkime koşullarına bağlı olarak α -amilaz gibi davranarak dahili $\alpha(1\rightarrow4)$ bağlarını da hidrolize edebilirler. Tanım olarak, pullulanazlar pullulanı hidrolize edebilirler (izoamilazlar bunu yapamaz); buna karşılık, izopullulanazlar ve neopullulanazlar sırasıyla pullulanda $\alpha(1\rightarrow6)$ dallanma noktalarının iki yanında bulunan

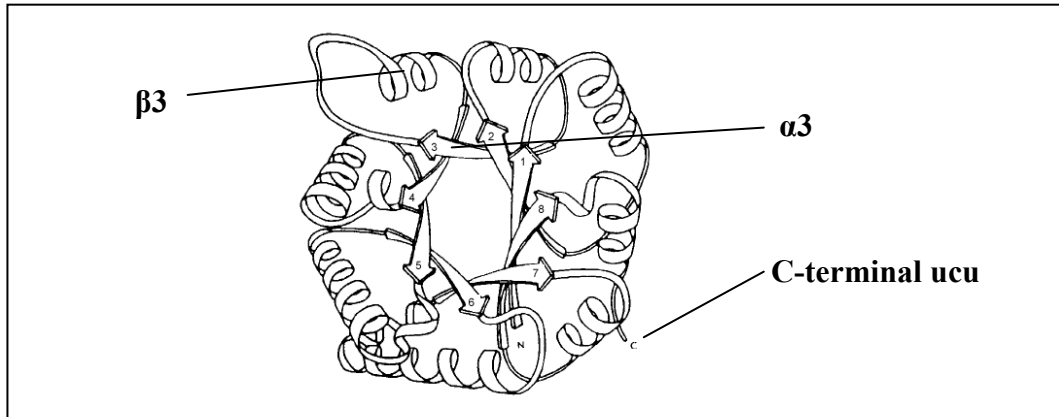
indirgen ve indirgen olmayan $\alpha(1\rightarrow4)$ bağlarını kırarlar. CGTazlar da nişastayı α -amilazlar gibi $\alpha(1\rightarrow4)$ bağlarından parçaladığı gibi önemli miktarlarda siklodekstrini de ürün olarak oluştururlar (Ferrari vd 1993).

α -Amilaz grubu enzimlerin ortak özellikleri Reddy vd (2003) tarafından şöyle özetlenmiştir:

- Bu enzimler, hidroliz aktivitesi göstererek etkili oldukları α -glikozidik bağların hidrolizini sağlayarak α -anomer mono- veya oligosakaritleri oluşturur veya transglikozilasyon aktivitesi göstererek α -1,4 veya α -1,6 glikozidik bağlarını kurar veya bu iki aktiviteyi eşzamanlı olarak gösterebilir.
- Bu enzimlerde katalitik bölge kalıntılarını içeren bir $(\beta/\alpha)_8$ veya TIM fiçisi (ing: barrel) yapısı bulunur.
- Primer dizilerinde 4 adet korunmuş bölge mevcuttur. Bu korunmuş aminoasitlerden bazıları katalitik bölgede bulunur, bazıları ise TIM fiçisi topolojisinin stabilitesinin sağlanmasıyla ilgilidir.

2.2.4. α -Amilazın yapısı, etki ve salgılanma mekanizması

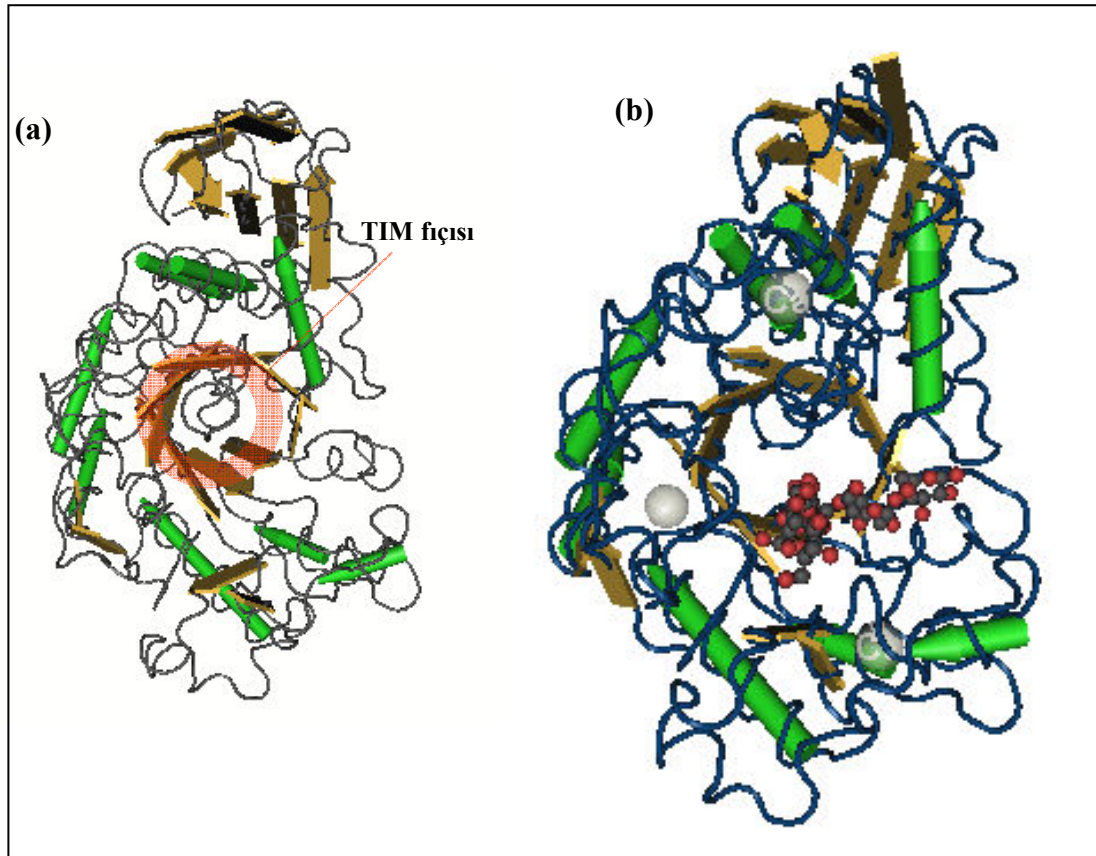
TIM fiçisi ilk olarak triozfosfat izomeraz enziminde belirlenmiş bir yapıdır (Banner vd 1975), dolayısıyla ismini de bu enzimden alır. Yapısal olarak, α -amilaz ailesi enzimlerin bütün üyelerinde bulunan bu yapı $(\beta/\alpha)_8$ fiçi katlanması ile oluşur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Triozfosfat izomerazın klasik paralel $(\beta/\alpha)_8$ -fiçisi yapısı (Horvátová vd 2001).

Katalitik bölgeyi oluşturan bu bölge A bölgesi (“domain A”) olarak adlandırılır (Horvátová vd 2001). Katalizin gerçekleştiği yer A bölgesindeki paralel β -fiçisinin sonunda proteinin C-terminal ucu tarafına doğru bulunan bir yuvadır (Matsuura vd 1984).

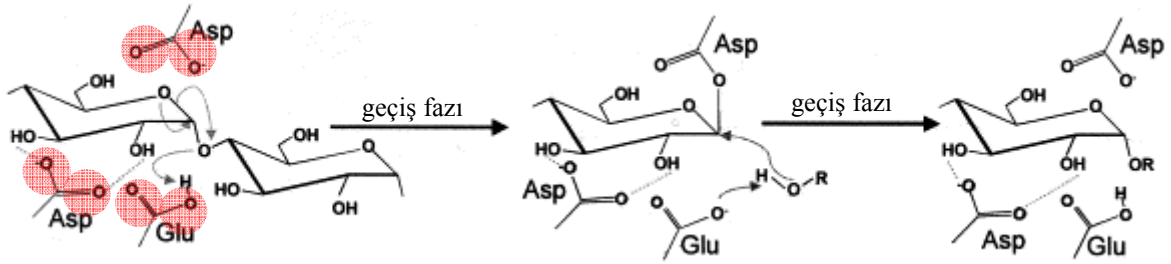
Fujimoto vd (1998) tarafından elde edilen *B. subtilis* α -amilazının üç boyutlu görünümü Şekil 2.3’de verilmiştir.



Şekil 2.3. *B. subtilis*’e ait protein molekülünün kristal yapısı. (a) β -yapraklarından oluşan TIM fiçisinin görünümü, (b) enzim aktivitesi için gerekli olan 3 adet kalsiyum iyonunun bulunduğu (gri) ve aktif bölgesinde maltopentaoz ($C_{30}H_{52}O_{26}$) bulunan (kırmızı-gri) molekül kompleksi görüntüsü (NCBI Blast veritabanı (Fujimoto vd 1998) ve Cn3D görüntüleme programı kullanılarak elde edilmiştir).

Yakın zamana kadar α -amilazın çalışma mekanizmasını açıklayıcı nükleofilik yer değiştirme, oksikarbonyum iyonu mekanizması ve halka açıcı tepkime gibi birkaç teori mevcut idi (Wong ve Robertson 2002a). Ancak van der Maarel vd (2002) α -amilaz

enziminin α yapısını koruyan, çift yer değiştirmeli bir tepkime mekanizması ile işlev gördüğünü bildirmiştir. Mekanizmanın işleyişi için aktif bölgede asit/baz katalizörü olarak glutamik asit ve nükleofil olarak aspartat kalıntıları bulunur. Amilazın işleyiş mekanizması şekil 2.4’de şematize edilmiştir.



şekil 2.4. Glikozit bağının kırılması sırasında gerçekleşen katalitik mekanizma (van der Maarel vd 2002).

Bakterilerde α -amilaz enziminin salgılanmasının kontrolü (regülasyonu) birbirinden farklı iki mekanizmanın altında gerçekleşir. Bunlardan ilki genin hidroliz ürünlerinin (katabolit) varlığında baskılanmasıyla, diğeri ise nihai olarak bakteride sporlaşmayı tetikleyen maddesel (temporal) bir işlem sonucu oluşur (Jarnagin ve Ferrari 1992). Katabolit baskılaması, transkripsiyona dayalı olarak, glikoz, gliserol, maltoz gibi kolay metabolize edilebilir karbon kaynaklarının besi ortamındaki çok miktarda bulunmasına tepki göstererek enzim salgılanmasının artması şeklinde çalışan bir mekanizmadır (Henkin vd 1991). *B. subtilis*’de logaritmik (vejettatif) fazdan durağan faza geçtikçe enzim salgılanmasında artış olur (Herbort vd 1999). *B. subtilis*’de amyE geni ekspresyonu besiyerinde yüksek oranda karbon kaynağı bulunmasına duyarlı olduğu gibi, sporlaşma işlemi de kolay metabolize edilebilir karbon kaynaklarının ortamda yetersiz oranda bulunmasına duyarlı transkripsiyona dayalı bir işlem olması bakımından bu iki mekanizma birbirine benzerlik gösteren ancak birbirinden ayrı işlemlerdir (Jarnagin ve Ferrari, 1992).

2.3. *Bacillus* α -Amilazları ve Özellikleri

Cho vd (2000) topraktan izole edilmiş *B. subtilis* SUH4-2 suşunun sitoplazmasında, muhtemelen karbonhidrat metabolizmasında görev aldığını belirttikleri, maltoz oluşturun (maltojenik) bir amilazı izole ederek buna ait çeşitli özellikleri belirlemiştir.

Nagarajan vd (2006) topraktan izole edilmiş bir *B. subtilis* suşundan diğer *Bacillus* türlerindeki amilaz üretimlerinden farklı olarak hidroliz ürünleriyle (katabolit) baskılanmayan, 60-70 °C’de ve pH 5-7’de optimum aktivite gösteren, 53 kDa ağırlığında maltojenik bir α -amilazı izole etmişlerdir.

Sajedi vd (2005) topraktan izole ettikleri 18 bakteri suşunu kullanarak yaptıkları bir taramada *Bacillus* sp. KR-8104 olarak adlandırılan bir suşun düşük pH’da aktivitesini koruyabilen, kalsiyumdan bağımsız olarak aktivite gösterebilen bir α -amilaz ürettiğini belirlemiştir.

Bernhardsdotter vd (2005) sodalı gölden izole edilmiş bakteriler arasından seçtikleri *Bacillus* sp. L1711 suşunu alkali ortamda yetiştirdiklerinde bakterinin çeşitli amilazları kültür ortamına salgıladığını belirlemiştir. Araştırmacılar, bu amilazlar arasından seçtikleri bir α -amilazın 51 kDa ağırlığında olduğunu, alkali ortamda kararlı olduğunu, 40 °C’de optimum aktivite sergilediğini ve diğer metal iyonlarının yanı sıra kalsiyum varlığının da aktiviteyi olumsuz etkilediğini rapor etmişlerdir.

Zhang vd (1994) kojiden izole edilmiş olan *Bacillus* sp-JF₂ suşunun birbirinden farklı 3 aktif α -amilaz bileşenini ürettiğini belirlemiş ve bunlardan 2.’sini karakterize etmiştir. Bu çalışmada, 70’er kDa ağırlığında iki üniteden müteşekkil α -Amilaz II’nin optimum aktiviteyi pH 5.5’te, 90 °C’de gösterdiği ve molekül başına 10 adet Ca⁺⁺ bağladığı ifade edilmiştir.

Hagihara vd (2001) yaptıkları tanılama sonucunda *Bacillus* cinsi yeni bir tür olduğunu belirttikleri bir suşdan izole ettikleri 55 kDa büyüklüğünde bir α -amilazın 55-

60 °C’de ve pH 8-9.5’da optimum aktivite gösterdiğini ve enzimin şelatlayıcı veya okside edici kimyasal maddelere karşı dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

Mc Tighe vd (1995) alkali sever bir *Bacillus* türünden izole ettikleri sıra dışı bir α -amilazın en yüksek aktiviteyi 40 °C’de ve pH 10’da gösterdiğini ve bu enzimin en büyük hidroliz ürününün maltotetraoz olduğunu bildirmişlerdir.

Messaoud vd (2004) topraktan izole ettikleri *B. subtilis* US116 suşundan saflaştırdıkları bir amilazın da maltoheksaoz ve maltoheptaoz ürünlerini oluşturduğunu göstermiş ve 60 kDa büyüklüğündeki enzimin 60 °C’de, pH 6’da optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hayashida vd (1988) yeni bir *B. subtilis* izolatından elde ettikleri 68 kDa büyüklüğündeki α -amilazın diğer bakteriyel amilazlardan farklı olarak ham patates nişastasını 6-16 glikoz birimli ürünlere parçalayabildiğini rapor etmişlerdir.

Mitsuki vd (2005) Japon Fermantasyon Enstitüsünden temin ettikleri pek çok *Bacillus* suşundan elde ettikleri α -amilazları ham nişasta hidrolize edebilme kapasitelerine göre kıyaslamışlardır. *B. subtilis* türü bir bakteriden saflaştırdıkları uzun ve kısa (65 ve 45 kDa) ağırlığında iki α -amilazdan uzun olanın daha yüksek ham nişasta bağlama ve hidroliz kapasitesinin olduğu ve bunun bir kısmının proteolizi ile kısa enzimin oluştuğu belirtilmiştir.

Marco vd (1996) *E. coli*’de klonlayarak ürettikleri bir *B. subtilis* α -amilazının kaynak organizmada bulunan enzimden daha kısa olduğunu, ve optimum aktiviteyi pH 6.5’te ve 50 °C’de gösterdiğini belirtmişlerdir. Amino asit dizisine göre belirlenen kaynak organizmaya ait α -amilazın 57.7 kDa, kısa rekombinant proteinin ise 54.1 kDa ağırlığında olduğu hesaplanmıştır ancak rekombinant protein SDS page analizinde 48 kDa’da bant vermiştir.

Uguru vd (1997) un fabrikası atığından izole ettikleri bir *B. subtilis* suşundan ürettikleri α -amilazı saflaştırarak 54.78 kDa olduğunu, 80 °C’de pH 5.6’da optimum

aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, UV ışımaya maruz bıraktıkları suşlarda amilaz salgısında artım olduğunu da bildirmişlerdir.

Mishra vd (2005) H₂O₂ ve HOCl ile muamele edilen *B. subtilis* kültürlerinde α -amilaz üretimini sırasıyla 2.2- ve 1.5 kat arttırdığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, üretimlerdeki artışların genetik seviyede regüle edildiği gen çip (mikroarray) teknolojisi kullanılarak doğrulanmıştır.

Huang vd (2003) yaptıkları bir modelleme çalışmasında *G. stearothermophilus* kaynaklı amilaz geni taşıyan rekombinant *B. subtilis* kullanarak gerçekleştirdikleri kesikli ve beslemeli-kesikli (sürekli beslemeli) üretimlerde, organizmanın bulunduğu hücre evresine bağlı olarak amilaz üretimlerini gerçeğe uygun olarak tahmin edebilen bir model oluşturmuşlardır.

Najafi vd (2005) toprak kaynaklı *B. subtilis* AX20'den elde ettikleri hücre dışı α -amilazı izole etmişler ve 149 kDa ağırlığında bir homodimer olan bu enzimin, pH 6 ve 55 °C'de optimum aktivite sergilediğini belirlemişlerdir.

Das vd (2004) yerel Hintli kabilelerin alkol üretiminde kullandıkları başlangıç kültürlerinden izole ettikleri *B. subtilis* DM-03 suşunun 52-55 °C'de optimum üreme gösterdiğini ve ürettiği 42.8 kDa ağırlığındaki α -amilazın da aynı sıcaklıkta ve pH 9'da optimum aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Asgher vd (2007) orta derecede termofil bir *B. subtilis* suşundan izole ettikleri α -amilazın pH 8'de ve 70 °C'de ve Ca⁺⁺ varlığında optimum aktivite sergilediğini belirlemiş ve enzimin gıda endüstrisinde ve nişasta işleme uygulamalarında kullanılabileceğini belirtmiştir.

Bakteriyel amilaz üretimi üzerine ülkemizde de yapılan çalışmalar da mevcuttur. Burhan vd (2003) alkali topraklardan izole ettikleri *Bacillus* sp.'den ürettikleri α -amilazı etanol çöktürmesi ile kısmen saflaştırarak SDS-PAGE ile 94.5 kDa ağırlığında olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu enzimin en yüksek aktiviteyi pH 10.5'te ve

80 °C sıcaklıkta sergilediğini göstermişlerdir. Arıkan (2008) ise termofil bir *Bacillus* sp. izolatından ürettiği ve aynı yöntemle kısmen saflaştırdığı α -amilaz fraksiyonunda iki amilaz bulunduğunu, bunlardan birinin 86 kDa ağırlığında olup pH 11’de optimum aktivite gösterdiğini, 60.5 kDa ağırlığında olan diğer α -amilazın ise pH 8’de optimum aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

Kıran vd (2005) topraktan izole ettikleri termofil bir *Bacillus* sp. ile yapılan α -amilaz üretimine kültür ortamında yapılan değişikliklerin etkisini incelemişlerdir. Ülger ve Çırakoğlu (2001) *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* suşları ile yaptıkları α -amilaz üretimlerinde kültür ortamına polietilen glikol ilavesinin etkisini araştırmışlardır.

Tanyıldızı vd (2005) *B. subtilis* IMG22 ile çalkalamalı inkübasyon şartlarında yaptıkları α -amilaz üretimini besin öğeleri bileşimi bakımından tepki yüzeyi metodolojisi uygulayarak besiyeri formülasyonunu optimize etmişlerdir.

Baysal vd (2003) ılıca suyundan izole edilmiş bir *B. subtilis* suşu ile katı faz üzerinde yaptıkları üretimler sonucunda α -amilaz üretimi için kepeğin çeltik kabuğundan daha verimli olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Özcan (2005) çalışmasında *B. stearothermophilus*’a ait sıcaklığa dirençli bir α -amilaz genini taşıyan 5.25 kb’ büyüklüğündeki DNA bandı ile oluşturulan pC194 α rekombinant vektörü ile iki farklı *B. subtilis* suşunda genin ekspresyonunu sağlamıştır. Rekombinant enzim üretimi nişastalı agarda yapılan üretimle ve zymogram analizi ile doğrulanmıştır.

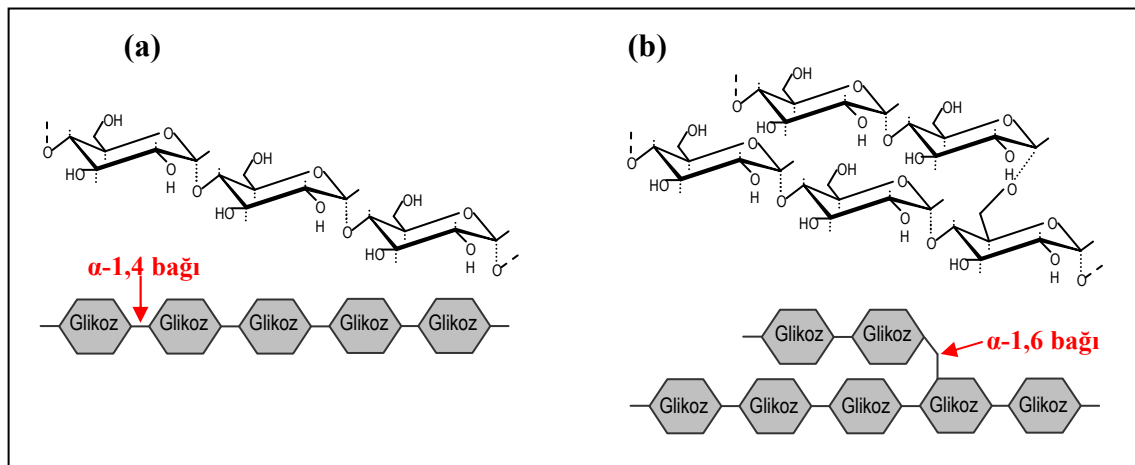
Özcan ve Altınalan (2001) *B. subtilis* RSK246’dan izole ettikleri 65 kDa’luk bir α -amilazı kodlayan geni pUC18 vektörü ile *E. coli* ve *B. subtilis*’e klonlamışlardır. Bu çalışmada kaynak bakterinin promotör dizisinin işlevi ile yapılan salgılama sonrasında her iki konukçuda da aynı büyüklükte enzimin salgılandığı rapor edilmiştir. Özcan (2002) *B. subtilis* ORBA97 suşundan izole ettiği endüstriyel α -amilaz genini *E. coli* ve *B. subtilis*’e klonlamış ve ekspres etmiştir. *B. subtilis*’te üretilen rekombinant proteinin

optimum çalışma koşullarının 50 °C ve pH 5 olduğu ve 10 mM CaCl₂ varlığında aktivitesinde %23 oranında artış olduğu bildirilmiştir.

2.4. α -Amilaz Enzimi Substratı - Nişasta

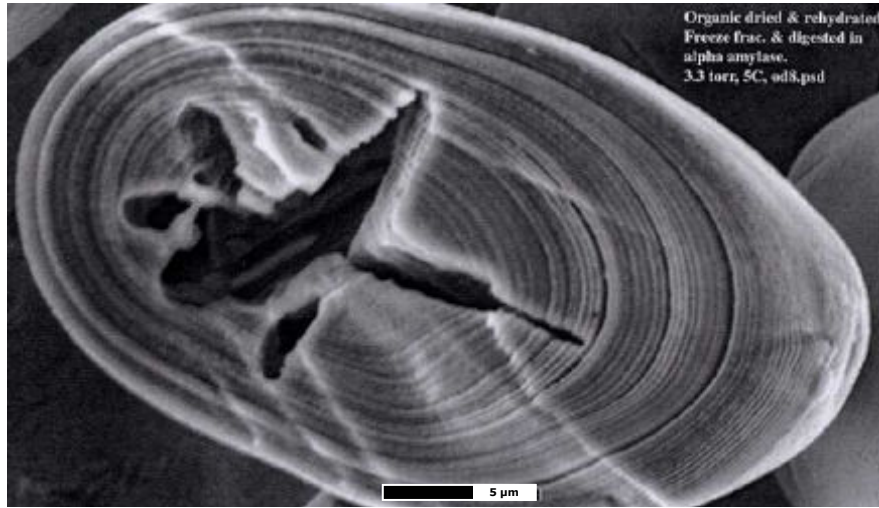
Nişasta biyosferde en yaygın olarak bulunan karbonhidratlardan biridir. Temel nişastalı tarım ürünlerinden olan mısır, patates, buğday, pirinç ve kassava gibi bitkilerin organlarında biriktirilen depo nişastası insanlar için önemli bir enerji kaynağıdır. Nişasta, tahıllarda kuru maddenin yaklaşık %70'ini teşkil eder, insan beslenmesinde ise toplam kalori ihtiyacının yaklaşık %80'ini karşılar (Hannah ve James 2008). Ayrıca, nişasta biyolojik parçalanabilirlik özelliği sebebiyle pek çok gıda dışı uygulamada da hammadde olarak değerlendirilmektedir. Biyoteknolojik gelişmeler *in planta* olarak üretim veriminin artırılmasını, nişasta yapısının ve fonksiyonelliğinin değiştirilmesini sağlamıştır (Blennow 2004, Slattery vd 2000).

Nişasta bitki hücrelerinde granüller halinde depo edilir. Bu granüllerde bulunan nişasta molekülleri zincir uzunluklarına, dallanma şekline ve genel molekül ağırlıklarına göre amiloz ve amilopektin olmak üzere iki formda bulunur. Bunların kimyasal yapıları Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Genel olarak nişastalarda bitkisel kaynağa bağlı olarak amiloz fraksiyonunun oranı % 20-33 aralığında değişim göstermektedir (Stoddard 2004).



Şekil 2.5. Nişasta moleküllerinin iki ana bileşeni olan (a) amiloz ve (b) amilopektinin kimyasal yapıları (BeMiller ve Whistler (1996)'dan uyarlanmıştır)

Granüllerin gözlenen tipik X-ışını deseni ve NMR tayfları bitişik nizam amilopektin bileşeni dallarının düzenli şekilde dizilişinden ileri gelir (van der Borgh vd 2005). Amiloz moleküllerinden oluşan amorf ve amilopektin içeren kristal bölgeler (lameller) elektron mikroskobu ile büyüme halkaları şeklinde (Şekil 2.6) gözlenebilmektedir (Donald 2004).

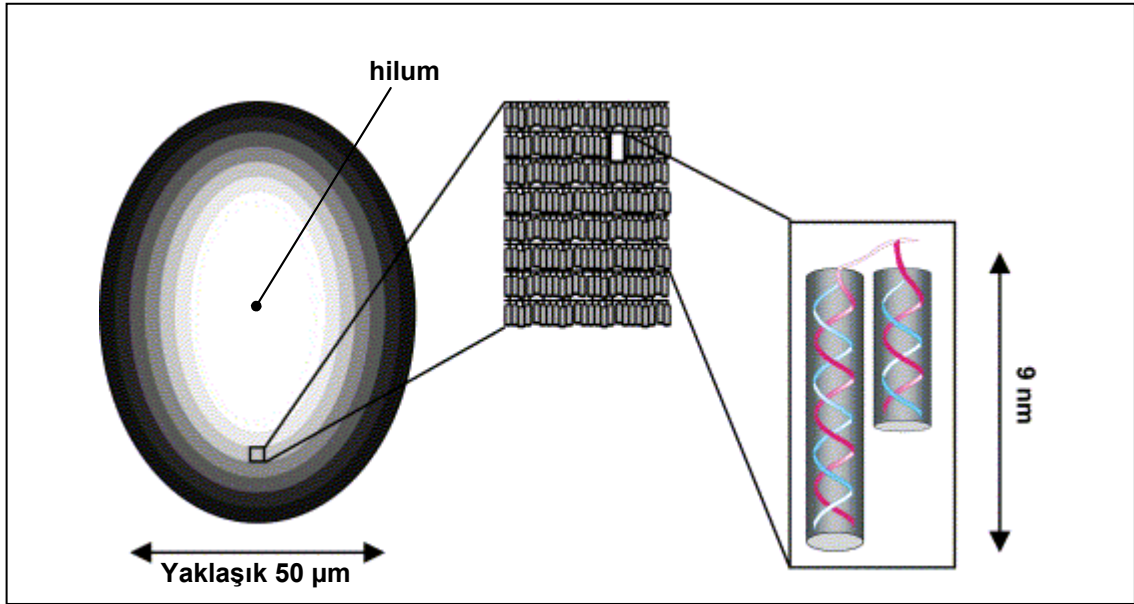


Şekil 2.6. Dondurularak çatlatılmış, α -amilaz ile muamele edilmiş patates nişastası granülünün ESEM görüntüsü (A. M. DONALD¹'ın katkısıyla).

Şekil 2.7'de bu halkaların mikro yapıları, yani moleküler bazda organizasyonları gösterilmiştir. Bu şekilde de görülebileceği üzere, amilopektin molekülleri çiftli sarmal yapılar şeklinde yaklaşık 9 nm genişliğinde katmanlar oluşturarak nişasta molekülünün önemli bir bölümünü oluşturur (Blennow vd 2003).

Frigard vd (2000) amilopektin fraksiyonunun bakteriyel amilaz ile % 55 verimle parçalanabildiğini göstermişlerdir.

¹ 2009 yılında yazılı görüşme ile temin edilmiştir. (Professor Athene M Donald, Cavendish Laboratory Sarah Adderley, University of Cambridge, JJ Thomson Avenue Cambridge CB3 0HE, E-posta:amd3@cam.ac.uk)



Şekil 2.7. Nişasta granülünde amiloz ve amilopektinin oluşturduğu yapının çeşitli düzeylerdeki şematik görünümü (Gallant vd 1997)

2.5. Endüstriyel Enzim Uygulamaları ve Gıda Endüstrisinde α -Amilaz Kullanımı

2002 yılı verilerine göre dünya endüstriyel enzim piyasasının 1.6 milyar ABD doları olduğu tahmin edilmiş ve bunun %29'unun gıda enzimlerinden, %15'inin yem enzimlerinden ve kalan %56'sının ise genel teknik enzimlerden oluştuğu bildirilmiştir (Outtrup ve Jorgensen 1998). Günümüz uluslararası enzim piyasasının 3.4 milyar Euro olduğu ve senelik % 6.5-10 oranında büyüdüğü belirtilmiştir (Tramoy 2008).

Bacillus spp. enzimlerinin toplam enzim üretiminde %50'lik payının olduğu tahmin edilmektedir. Amilazlar *Bacillus* spp. kaynaklı enzimlerin önemli bir bölümünü oluşturur ve endüstride gıda, fermantasyon, tekstil ve kağıt sanayinde kullanılırlar (Schallmey vd 2004, Pandey vd 2000).

Gıdada amilolitik enzimlerin en fazla kullanıldığı alan nişastanın parçalanmasıdır ve bu sayede elde edilen çeşitli ürünler mevcuttur. Nişastanın parçalanması ile elde edilen ürünler arasında maltodekstrinler, mısır şurubu, glikoz şurubu, maltoz şurupları, yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) ve siklodekstrinler

sayılabilir. Guzmán-Maldonado ve Paredes-López (1995) hazırladıkları bir derlemede nişastadan elde edilen bu ürünlerin işlem akışlarını tarif etmiştir. Günümüzde biyoyakıt üretiminin ve kullanımın giderek artacağı öngörüsüne bağlı olarak, şurup üretiminin de temel basamaklarından birisinin nişastanın hidrolizi olması sebebiyle (Wackett 2008), şurup teknolojisinde kullanılan hidroliz teknolojisinin yaygınlaşacağı ve bu işlemler sırasında kullanılan bakteriyel amilazlara talebin artacağı tahmin edilmektedir.

Ağır endüstriyel uygulamalara daha dayanıklı oluşları sebebiyle termostabil enzimlerin kullanımı endüstride giderek artan bir ilgi görmektedir. Nişastanın sıvılaştırılmasında genellikle *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus* gibi aşırı termofil organizmalardan elde edilen termofil amilazlar kullanılarak işlemlerin 90-105 °C gibi yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilebilmesi sağlanmaktadır (Synowiecki vd 2006, Haki ve Rakhshit 2003).

Ülkemiz gibi yarı kurak ülkelerde yetiştirilen buğdaylarda α -amilaz aktivitesi genelde yetersizdir. İyi bir gaz üretim gücüne erişebilmek için hamurda yeterli düzeyde α -amilaz aktivitesinin bulunması gerekir. Bu da unlara arpa veya buğday malt unu ya da ticari enzim preparatları katılarak sağlanır. Fungal veya bakteriyel kaynaklı olabilen ticari amilaz preparatlarının kullanımının giderek yaygınlaştığı bilinmektedir (Özkaya ve Özkaya 2005).

Fırın ürünleri sektörü amilazların kullanımının yoğun olduğu üretim alanlarından biridir. Amilazların fırın ürünlerinde kullanımı iki farklı amaca hizmet eder. Birinci amaç, zedelenmiş nişastanın parçalanması ve dolayısıyla mayanın kullanabileceği şekerlerin hamurda oluşmasını sağlamaktır (Elgün ve Ertugay 2002). Hamur sisteminde etkili olan α -amilaz katkısı ekmeğin hacmini, sertliğini, kabuk kalınlığını, kabuk rengini vb. özellikleri olumlu yönde geliştirir (Lagrain vd 2008). Bu amaçla kullanılabilecek bir amilazda ısıl direnç özelliği aranmaz. Amilaz kullanımının ikinci amacı bayatlamının geciktirilmesi ve dolayısıyla ekmek raf ömrünün uzatılmasıdır. Bu amilaz ekmek içinde düşük molekül ağırlıklı dekstrinlerin oluşumunu sağlayarak nişasta ve nişasta-protein ağını zayıflatır, böylece daha bir esnek bir yapı oluşur (Drapron ve Godon 1987).

Farklı kaynaklardan elde edilen amilazların bayatlamayı geciktirici etkileri de farklı derecelerde oluşmaktadır (Palacios vd 2004). Fungal amilazın ekmekte başlangıç yumuşaklığın daha fazla olmasını sağladığı ancak bayatlama ile gelişen sertleşmenin engellenmesine yönelik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Every vd 1992). Yüksek termostabilitesi olan bakteriyel enzimlerde dozajlama problemi sebebiyle istenmeyen derecede yumuşamış, yapışkan tekstür de görülebilmektedir (Drapron ve Godon 1987, Decock ve Capelle 2005). Isıl dayanımları orta seviyede olan bakteriyel kaynaklı α -amilazlar, fırın koşullarında tamamen inaktive olmayarak yeterli seviyede enzim aktivitesini sağlayabilmeleri sayesinde ekmekte bayatlamayı geciktirme amacına uygun olduğu belirtilmiştir (Gray ve Bemiller 2003).

Bira ve alkollü içecek üretiminde mayşenin işlenmesinde fermantasyon gelişimini hızlandırmak ve hazırlık şekeri (“priming sugar”) ilave etmek yerine bakteriyel kaynaklı çeşitli α -amilaz enzimleri ile muamele uygulanabilmektedir. Bu amaçla kullanılan *B. subtilis*’e ait amilazın pH optimumunun 6.0-7.5 aralığında olmasına rağmen nişastaca zengin ortamda enzimin stabilizasyonu sayesinde, pH’sı 5-6 civarında bulunan mayşede de kullanıma elverişli olduğu belirtilmiştir (Briggs 2004).

2.6. Konukçu Suş Olarak *Pichia pastoris*

P. pastoris’in ilk kullanılışı 1970’lerde Philips Petroleum Company tarafından metanolün tek hücre proteini üretiminde kullanılması amacıyla olmuştur (Tschopp ve Cregg 1991, Wegner 1983). Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris*’in rekombinant proteinlerin ekspresyonunda konukçu olarak kullanımı son yıllarda giderek artan bir ilgi görmüştür.

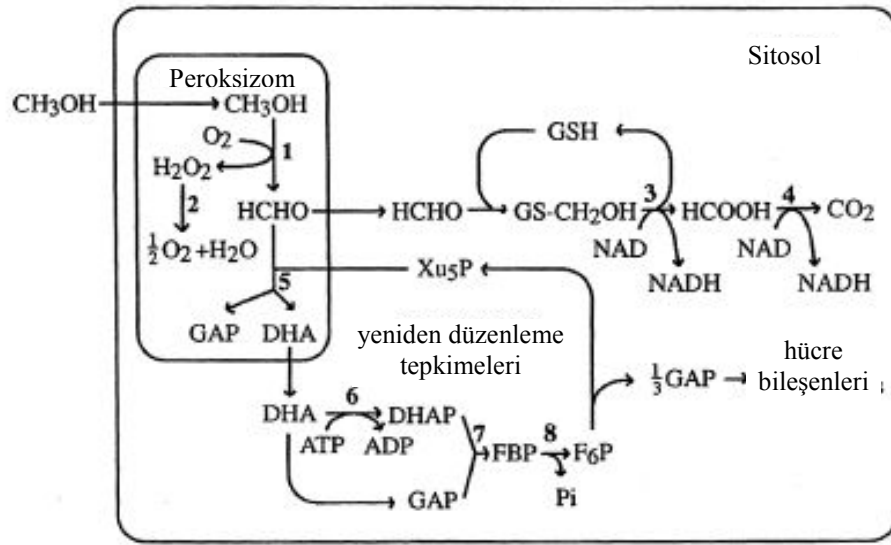
Mikrobiyal ökaryotik konukçu sistemi olarak *P. pastoris*, hem karmaşık olmayan besiyerinde üretildiğinde yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılabilmesi bakımından, hem de metanol kullanımı için gerekli olan (alkol oksidaz gibi) enzimlere duyduğu yüksek gereksinim sebebiyle çok kuvvetli ve katı denetimde bulunan

promotörlere sahip olduğu için rekombinant protein üretiminde avantaj sağlamaktadır (Porro vd 2005). Cos vd (2006) yaygın olarak kullanılan bu organizmanın endüstriyel üretimde kullanılabilecek fenotiplerinin, promotörlerin, kültür besiyerinin ve işletim stratejilerinin değerlendirildiği bir derleme hazırlamıştır.

Metilotrofik mayaların kullanımında temel genetik ve moleküler biyoloji bilgi eksikliği ve genomun çözülmemiş oluşu karşılaşılan bir engel olarak değerlendirilmiştir (Porro vd 2005), ancak çok kısa bir süre önce 9.4 milyon baz dizisinden oluşan ve 6,000 tanımlanmış açık okuma çerçevesi bulunan *P. pastoris* mayası genomu Integrated Genomics firmasınınca çözülerek satışa sunulmuştur (şirketin web adresi: <http://www.integratedgenomics.com/pichia.html>).

Yabancı bir genin *P. pastoris*'de ekspresyonu 3 aşamada gerçekleşir: (a) genin ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi, (b) vektörün *P. pastoris* genomuna entegrasyonu, ve (c) elde edilen potansiyel ekspresyon suşlarının yabancı ürün üretimi bakımından taranması (Cereghino vd 2001). Bu şekilde genetik olarak kararlı yapıda transformantların eldesi için ekspresyon kaseti belirli bir noktadan (lokus) kromozoma entegre edilmiş olur.

P. pastoris hücreleri metanol varlığında metanol metabolizmasında kullanacağı alkol oksidaz enzimini, bu enzimin (oksidatif) bozulmaya meyilli oluşu sebebiyle çok yüksek miktarlarda salgılamaya başlar (Daly ve Hearn 2005, Cereghino ve Cregg 2000). AOX1 promotörünün gücü metanol varlığında oluşan bu kuvvetli tetiklemeden kaynaklanır. *P. pastoris* metanol metabolizmasında izlenen yol Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8. *P. pastoris*'in metanol metabolizması için gerçekleştirdiği biyokimyasal tepkimeler (Cereghino ve Cregg 2000).

2.6.1 *Pichia pastoris* ile rekombinant α -amilaz üretim çalışmaları

Rydberg vd (1999) insan pankreatik α -amilazını ve nokta mutasyonu ile aktif bölgede amino asit değişimi sağladıkları iki mutasyon ürününü *P. pastoris* ile ekspres etmişlerdir. Rekombinant enzimlerin glikozilasyon özelliklerini tespit ettikleri çalışmada ayrıca kristal yapı ve aktivite analizleri de gerçekleştirmişlerdir.

Salgılanan veya hücre duvarına yönlendirilen proteinlerin N-bağlantılı glikozilasyonu ökaryotlarda yaygın olarak gerçekleşen transasyon sonrası modifikasyonlardan biridir ve genel olarak özgün hallerinde glikozile olmamış (doğal) proteinlerin glikozile olmuş hallerinin daha kararlı yapıda oldukları, ısıya dirençlerinin daha yüksek olduğu bilinir (Daly ve Hearn 2005). Ancak, Tull vd (2001) *P. pastoris*'de ekspres ettikleri alkalofilik bir *Bacillus* α -amilazının termoaktivitesinde ufak bir artış gözlerken enzimin termostabilitesinde iyileştirme sağlamadığını tespit etmişlerdir.

Lee vd (2003) kimerik bir amilaz geni klonlanmış *P. pastoris* suşunu kullandıkları sistemde sürekli besleme ile veya çözünmüş oksijen seviyesine bağlı

olarak yaptıkları kontrollü beslemenin rekombinant protein üretimine etkisini incelemişlerdir. Aynı araştırma gurubunun yaptığı diğer bir çalışmada (Nakano vd 2006), aynı rekombinant organizma kullanılarak aynı iki besleme yönteminin sürekli fermentasyonla kimerik α -amilaz üretimine etkisi incelenmiştir.

Kurokawa vd (2002) kimerik bir amilazı klonladıkları *Saccharomyces cerevisiae* ve *P. pastoris* suşları ile yaptıkları üretimlerde rekombinant enzimin C-ucundan proteolitik enzimlerin etkisi ile kısaldığını saflaştırma aşamasında C-ucuna spesifik anti-peptid antikoru kullanarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada *P. pastoris* ile gerçekleştirilen 72 saatlik indüksiyonlu üretim ve aynı sürede *S. cerevisiae* ile yapılan üretim kıyaslandığında, *P. pastoris* kültüründe tespit edilen amilaz aktivitesinin diğerinden 40 misli fazla olduğu belirtilmiştir.

Kato vd (2001) fare tükrük α -amilazı üretimi için diğer konukçu-vektör sistemlerinden üstün olduğunu belirttikleri *P. pastoris*'e klonlayarak çalkalamalı inkübasyon ile üretimi optimize ederek, ürettikleri enzimi saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada rekombinant protein üretiminin *P. pastoris*'de *S. cerevisiae*'dan 90 misli daha verimli bir şekilde sağlandığını ve *P. pastoris*'de üretilen enzimin sadece %20'sinin glikozile olduğunu gösterişlerdir.

Paifer vd (1994) *P. pastoris*'de *B. licheniformis* α -amilazını bakterinin kendisine ait olan ve olmayan 2 farklı sinyal dizisi kullanarak ekspres etmişlerdir ve kültür ortamında sırasıyla 0.9 g/L ve 2.5 g/L gibi yüksek verimlilikte salgılama olduğunu rapor etmişlerdir.

Junior vd (2006) olgunlaşmakta olan muzda bulunan 416 amino asitlik α -amilazı *P. pastoris*'de heterolog olarak ekspres etmiştir. Sinyal dizisi içeren bu enzimin muhtemelen nişasta devingenliğinde (mobility) rol oynayan fonksiyonel bir amilaz olduğu belirtilmiştir.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmalarda kullanılan bakteri ve maya suşları

3.1.1.1. *Bacillus subtilis* BK07 izolasyonu ve ön tanılama çalışmaları

Ekmeklerde rope oluşumunun (sünmenin) kontrollü olarak gerçekleştirildiği önceki bir çalışmada (Erem 2007) yüzeysel maya ve küf oluşumu engellenen ekmekler 37 °C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra sünmüş ekmek içinden izole edilen bakteriler içinden nişasta ilaveli katı besiyerinde iyot varlığında en geniş berrak alan oluşturan bakteri, yapılacak çalışmalara kaynak olması düşünülmüş saf kültür halinde muhafaza edilmiştir.

Çalışmanın ilk bölümünde sünmüş ekmekten izole edilen bir doğal suş olan *B. subtilis* BK07 kesin olarak tanımlanmıştır. Bu hücrenin ekmekte sünme (rope) etmeni olduğu ve proteinin yanı sıra nişastanın da parçalanmasına sebep olacak enzimleri salgıladığı düşünülmüş bu bakterinin α -amilaz enziminin bir konukçuda klonlanarak araştırılması düşünülmüştür.

Çalışmada gen kaynağı olarak kullanılması düşünülen doğal *B. subtilis* BK07 suşu Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde gerçekleştirilen bir çalışmada sünmüş ekmek içinden izole edilmiştir (Erem 2007). Bu izolasyon sırasında suşun seçimi amilaz aktivitesinin kabaca belirlendiği bir plaka ekim yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntemle göre, tek kolonilerin % 0.4 çözünebilir nişasta ilaveli nutrient agarda gelişimi sağlanan plakalara Lugol çözeltisi dökülerek koloniler etrafında berrak alan oluşumu gözlenmiştir. Koloni etrafında geniş berrak alan oluşumuna neden olan ve nişastalı katı besiyerinde diğer bakterilerden daha iyi geliştiği gözlenen bir suş BK07 olarak kodlanarak tanımlanmak üzere seçilmiştir. Bir gece 37 °C’de geliştirilen bakteri kültürü kullanılarak Gram boyama ile yapılan mikroskopik incelemede Gram (+) çubuk

tipi bakteri olduğu belirlenen BK07 suşunun yüksek olasılıkla *Bacillus* türünden olduğu düşünölmüştür. Bakteri 16S RNA diziliminin belirlenmesiyle gerçekleştirilecek kesin tanımlamalar yapılcaya kadar nutrient agar üzerinde geliştirilerek 4 °C’de korunmuştur.

3.1.1.2. *Bacillus subtilis* RSK-244, *B. subtilis* RSK-246 ve *B. subtilis* PY22

B. subtilis BK07 suşundan α -amilaz geninin izolasyonunda sorunların yaşanabileceği ihtimali göz önüne alınarak ve kıyaslamalı çalışmalar yürütmenin daha uygun olacağı düşüncesiyle bu aşamada Nebraska Üniversitesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü’nde görevli Prof. Dr. Andrew Benson tarafından sağlanan *B. subtilis* PY22 suşunun da kullanılması ve bu suşdan da kromozom izolasyonu gerçekleştirilmesi kararlaştırılmıştır. Ayrıca, çalışmalarda karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Refik Saydam Kültür Koleksiyonundan temin edilen *B. subtilis* RSK-244 ve *B. subtilis* RSK-246 suşlarından da kromozom izolasyonu yapılmıştır.

3.1.1.3. Konukçu suşlar ve taşıyıcı plazmidler

Çalışmalarda plazmidlerin çoğaltılması amacıyla konukçu suş kimyasal transformasyona elverişli *E. coli* suşları olan One Shot® Top10, DH5 α (Invitrogen, CA, ABD) ve NEB Turbo (New England Biolabs, MA, ABD) kullanılmıştır. α -Amilaz (amyE) geni klonlama çalışmaları için *P. pastoris* KM71H (Invitrogen, CA, ABD) suşu kullanılmıştır. PCR ürünlerinin klonlanmasında küt uçlu DNA parçalarının bağlanmasına elverişli Blunt II Topo (Invitrogen, CA, ABD) vektör-enzim kompleksi kullanılmıştır. Diğer bazı klonlama çalışmalarda pUC19 (Fermentas, MD, ABD) vektör plazmidi kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar ve enzimler

Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazları ve bunların tampon çözeltileri New England Biolabs'den (MA, ABD) temin edilmiştir. Çeşitli endonükleazların kullanımı için üretici firmanın talimatları uygulanmıştır (Ek 1). Farklı şekilde belirtilmediği takdirde kullanılan kimyasalların tamamı Sigma-Aldrich (MO, ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Temel Moleküler Biyoloji Yöntemleri

Temel moleküler biyoloji yöntemlerinin uygulanmasında kaynak olarak Sambrook ve Russel'a (2001) başvurulmuştur. Buna ek olarak, özellikle de *P. pastoris*'de klonlama çalışmalarında Inan vd (2007) kaynak olarak kullanılmıştır.

3.2.1.1. DNA İzolasyonu

PCR ve Southern Blot uygulamalarında kullanılacak genomik DNA izolasyonunda bakteriler için MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit ve mayalar içinse MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, WI, ABD) kullanılmıştır. Bakteriyel izolasyonlar için Luria Bertani (LB) Lennox agar üzerinde geliştirilen saf kültürdeki tek koloniden alınarak ekim yapılan ve bir gece 10 mL LB Lennox sıvı besiyerinde geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (Innova 4000 ve Innova 4400, New Brunswick Scientific, NJ, ABD) tüplerde veya engelli (baffled) erlenlerde geliştirilen kültür sıvısının santrifüjlenmesiyle elde edilen hücre peleti uygun kit kullanılarak hücre parçalayıcı enzimle muamele edilmiştir. İlave edilen bir çözelti ile proteinleri çöktürülerek uzaklaştırılan ve peletlenen DNA yıkanarak TE tamponunda çözülmüştür. Bu aşamalarda üretici firmanın sağladığı talimatlara uygun şekilde çalışılmış ve işlemler sırasında >10,000 rcf kapasiteli Centrifuge 4515 D (Eppendorf, Almanya) ve soğutmalı Sorvall Legend RT

Plus (Thermo Scientific, MA, ABD) santrifüj ekipmanları kullanılmıştır. Elde edilen DNA izolatları denemelerde kullanılmak üzere 4 °C’de saklanmıştır.

3.2.1.2. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)

PCR için TGradient® (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) thermocycler (ısı döngü cihazı) ve PFU Hotstart Ultra (Stratagene, CA, ABD) enzim kiti kullanılmıştır. Kullanılan PCR ısı döngü cihazında tepkimede kullanılacak primer bağlanma sıcaklık aralığı primer çiftinin erime sıcaklıkları (T_m) ortalaması ± 5 °C olarak programlanmıştır. PCR öncesinde tüplerin sürekli buz üstünde tutulmasına özen gösterilmiştir.

Yürütülen çalışmada PCR analizlerinde kullanılan primerler ve bunlara ait bazı özellikler Ek 2’de verilmiştir.

PCR cihazında dizilerin uzaması basamağı için verilen asgari süre (elongation) oluşması beklenen parçanın kb’den cinsinden büyüklüğü kadar dakika olarak belirlenmiştir. Kapak sıcaklığı tepkime süresince 105 °C, tepkimeler sonrasında tüplerin bekletileceği sıcaklık ise 4 °C olarak ayarlanmıştır. PCR denemelerinde temelde 2 tip ısı döngü programı kullanılmıştır. Bunlardan ilki sadece 1 kere 32 döngü içeren düz program olmuştur. İkincisi ise 3 adet ısı döngüsü içeren, üç farklı uzama sıcaklığında sırasıyla 4, 7 ve 32 döngülü PCR programı olmuştur ve daha çok ters PCR ve kromozom yürüyüşü denemelerinde uygulanmıştır. Çizelge 3.1’de uygulanan iki tip ısı döngüsü programına örnekler verilmiştir.

Gerekli görüldüğü hallerde PCR ürünleri MinElute PCR Purification Kit (Quiagen, CA, ABD) yardımıyla veya jelde yürütülüp ampikon bandı kesilerek QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen, CA, ABD) ile jel ortamından uygun tampon içine özütleştir.

Çizelge 3.1. PCR ısı döngü programları

Normal Isı Döngüsü Programı				3 Döngülü Program			
Sıra #	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Komut	Sıra #	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Komut
1	94	180		1	94	180	
2	94	60		2	94	30	
3	$T_m \pm 5$	60		3	72	180	4 kere #2'ye dön
4	72	180	32 kere #2'ye dön	4	94	30	
5	72	600		5	65	10	
6	4	∞		6	72	180	7 kere #4'ye dön
				7	94	30	
				8	57	10	
				9	72	180	
				10	72	600	32 kere #7'ye dön
				11	4	∞	

3.2.1.3. Agaroz Jel Elektrofözezi ve Jel Görüntüleme

Total genomik DNA izolasyonlarının kalitesi, PCR ürünlerinin varlığı, restriksiyon endonükleazlarının etkisi gibi araştırmalarda örnekler agaroz jel elektrofözezi ile ayrıştırılmıştır. Jel hazırlanırken, 1X TAE tampon çözeltisine (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) %1 oranında agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilerek mikrodalga fırın yardımıyla ısıtılarak çözündürülmüştür. Bu çözeltiye 1 µL/50 mL etidiyum bromür çözeltisi (10 mg/mL, Invitrogen, CA, ABD) ilave edilerek, uygun ebatta ve şekilde seçilen kalıplara (jel kasedine) dökülmesiyle jel elde edilmiştir. Jel kuyularına yüklenecek örnekler, aksi belirtilmediği takdirde, 1 µL örneğin ve 1 µL 10X Blue Juice® (Invitrogen, CA, ABD) jel yükleme tamponunun ultra saf su ile seyreltilmesiyle toplam 10 µL hacimde hazırlanmıştır. Jel 1X TAE tampon içinde tutularak örnekler kuyulara yüklenmiştir ve elektroföze uygulaması ile örnekler jel içinde yürütülmüştür. Bu elektroföze 120 V

doğru akım altında, 40-120 dak süreyle yürütülmüştür. Agaroz jel içinde molekül ağırlıklarındaki farka göre bantlara ayrılan DNA molekülleri etidiyum bromür varlığında UV ışınları altında turuncu ışıma verdiği için kurulan dijital kamera sistemi ile görüntülenebilmiştir.

3.2.1.4. Ligasyon ve transformasyon

Kimyasal transformasyona uygun bakteri hücrelerine yapılan transformasyonda buz üstünde tutulan hücrelere 6-10 μ L ligasyon karışımı doğrudan ilave edilmiş ve hücreler ani olarak 42 °C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 35 sn tutulup, tekrar buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra üretici firma tarafından hücrelerle birlikte temin edilen sıvı SOC besiyerinden (2% tripton, 0.5% maya özütü, 10mM NaCl, 10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂) 250 μ L ilave edilerek tüp 1 saat süreyle 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Hücre sıvısı, steril koşulların sağlanmasına özen gösterilerek, ekimden 1 saat önce 37 °C'de inkübatöre bırakılarak ılıtılan 100 μ g/mL Zeocin içeren LB Miller agar petrilere yayma yöntemle ekilmiştir. Petriler bir gece 37 °C'de üremeye bırakılmıştır.

Maya hücrelerine yapılan elektrokimyasal transformasyonda hücreler buz üstünde bekletilerek çözündürülmüş ve buz üstünde bekletilen elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmıştır. Transforme edilecek *SacI* ile kesilmiş plazmid karışımından hava kabarcıklarının oluşmamasına özen gösterilerek 10 μ L ilave edilmiştir. Her bir kuvvet 2.0 V gerilimde, 25 μ F kapasitans, 300 Ω rezistans değerinde, 5 ms süreyle Gene Pulser ® II ve Pulse Controller Plus (Bio-Rad, CA, ABD) yardımıyla darbeli akımla muamele edilmiştir. Derhal buz üzerine alınarak 1 mL soğuk 1 M sorbitol çözeltisi ilave edilmiştir. Temiz mikrofüj tüplerine alınan karışım 1 saat 30 °C'de inkübe edildikten sonra 100-500 μ g/mL Zeocin ilaveli YSD plakalarına yayma ekim yapılmış ve transformasyon petrilere kolonilerin gelişmesi için 2 gün 30 °C'de bekletilmiştir.

3.2.1.5. Dizi analizleri

Dizi analizleri araştırmanın gerçekleştirildiği üniversitenin Genomik Merkez Araştırma Kurumunda bulunan DNA dizi analiz merkezince (DNA Sequencing, Genomics Core Research Facility, UNL, Lincoln, NE, ABD) gerçekleştirilmiştir. Bu merkeze 200ng/μL konsantrasyonda gönderilen örneklerde dizi tespiti Beckman-Coulter CEQ8000 8-kapilerli, didioksi zincir terminasyon prensibiyle çalışan DNA dizi analizi cihazında konukçu plazmide uygun dizi analiz primer çiftiyle gerçekleştirilmiştir. GenBank veritabanının bulunduğu BLAST tarama motoru (Anonymous 2009c) kullanılarak (Altschul vd 1997) elde edilen dizi verileri homolog dizilimlerle kıyaslamalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca dizilim verilerinin incelenmesi için DNAMAN 5.2.2 versiyonu (Lynnon Corporation, Quebec, Kanada) bilgisayar programından faydalanılmıştır.

3.2.1.6. Plazmid izolasyonu

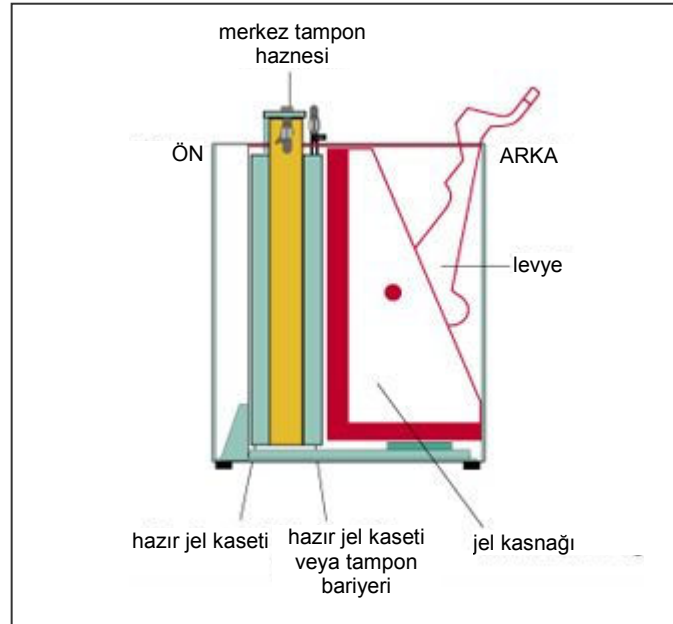
Plazmid izolasyonu yapılacak bakteriler uygun sıvı besiyerinde 37 °C’de 16 saat geliştirilmiştir. 2-4 mL kültür örneği santrifüjlenerek pelet olarak ayrılan organizmalardan Strataprep® Miniprep Kiti (Stratagene, CA, ABD) ile plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonlarının kalitesi agaroz jelde yürütülen örneklerin gözlenmesi ile kontrol edilmiş ve DNA miktarları belirlenmiştir.

3.2.1.7. Jel Özütleme Tekniği ile Saflaştırma

B. subtilis BK07 kromozomu kalıp olarak kullanılarak elde edilen ve genin orta bölgesinde teorik olarak 887 bp uzunluğundaki bölgeyi kapsayan PCR ürünleri %10 oranında Blue Juice ile karıştırılarak %1’lik düşük erime noktalı (LMP) agaroz jelde yürütülmüştür. Bu jelden kesilerek alınan uygun bp büyüklüğündeki bant QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, ABD) ile jel ortamından uygun tampon içine özütlenmiştir.

3.2.1.8. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE jelinde yürütülecek örnekler 40 μ L toplam hacimde, 32.5 μ L örnek (supernatant veya protein çözeltisi), 12.5 μ L Nupage® LDS tampon çözeltisi (4X), 5 μ L Nupage® indirgeme çözeltisi (10X) ile karıştırılarak 70 °C’de 20 dak bekletilmesi suretiyle denatüre edilmiştir. Derhal analiz edilmeyecek örnekler -20 °C’de bekletilmiş ve kullanımları öncesinde 5 μ L indirgeme çözeltisinden ilave edilerek tekrar 70 °C’de 10 dak denaturasyon yapılmıştır. XCell-Surelock™ Mini-Cell (Invitrogen, CA, ABD) jel yürütme haznesine (Şekil 3.1) uygun şekilde hazırlanarak yerleştirilen %10 Bis-Tris akrilamid içerikli veya % 4-12 Bis-Tris akrilamid katmanlı Nupage® kullanıma hazır jel kaseti yerleştirilmiştir ve haznenin boşlukları uygun MOP’s tamponu ile doldurulmuştur. Jel kuyularına 18’er μ L örnek karışımı ilave edilerek 200 V doğru akım altında 55 dak elektroforeze tabi tutulmuştur. Moleküler standart olarak 10 μ L Seeblue® Plus 2 (Invitrogen, CA, ABD) kullanılmıştır. Örneklerle birlikte standart amilaz örneği (Sigma 6380) ile hazırlanan çözeltiden de toplam 500 ng protein olacak şekilde yükleme yapılarak yürütülmüştür.



Şekil 3.1. SDS-PAGE analizlerinde kullanılan Mini-Cell yürütme haznesi kesit görüntüsü.

Yürütülen jeller hazneden ve plastik kasetten çıkarılmış ve kenarları temizlendikten sonra çalkalamalı olarak 30 dak sabitleme çözeltisinde (%40 metanol, 10% asetik asit, %50 ultra saf su), 1 saat Comassie mavisi çözeltisinde (%0.1 Comassie mavisi, %40 metanol, %10 asetik asit, %50 ultra saf su), 2-4 saat boya çözücü çözeltide (%50 metanol, 10% asetik asit, %40 ultra saf su) çözeltisinde bekletilmiştir.

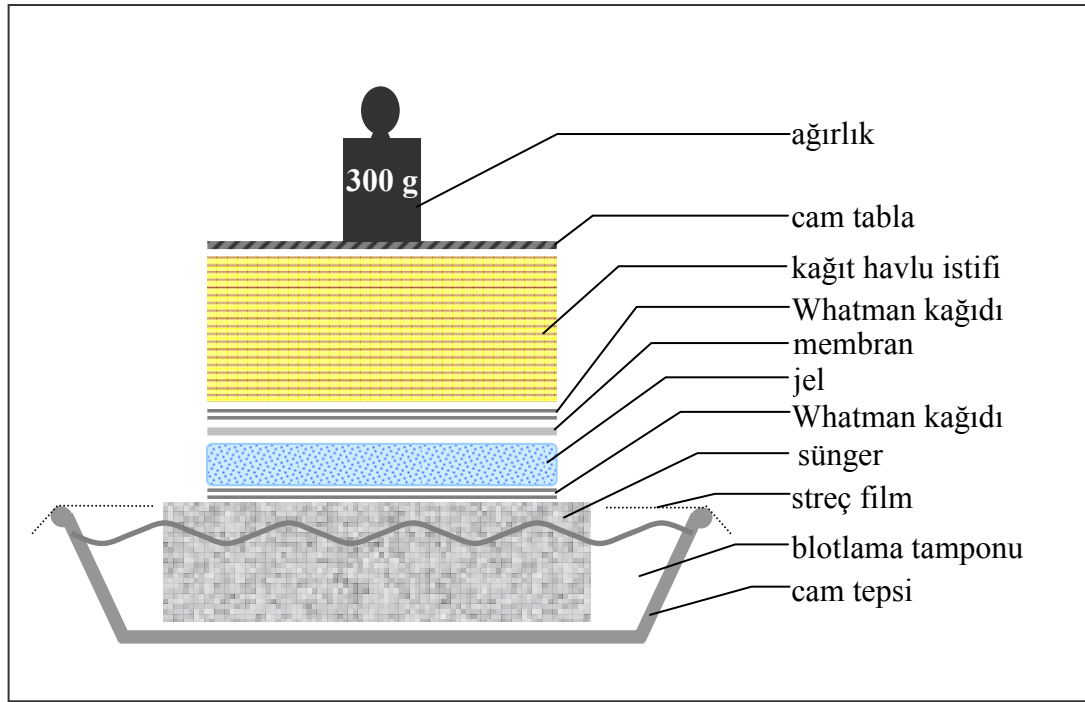
3.2.1.9 DNA ve plazmidlerin temizlenmesi ve DNA miktarının tayini

Elde edilen kromozom izolatlarındaki çift sarmal DNA yoğunluğu (miktarı) PicoGreen tepken karışımı (Molecular Probes®, Invitrogen, CA, ABD) yardımıyla TD-700 Fluorometer (Turner Designs Inc., CA, ABD) kullanılarak fluorometrik olarak ölçülmüştür. Fluorometrede 485 nm uyarılma ve 528 nm emisyon filtreleri kullanılmıştır. Standart olarak 500 ng/μL Lambda DNA seri dilüsyonları kullanılarak hazırlanan standart kurve ile miktar tayinin otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Standart ve örnek dilüsyonları 1X TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.1.10 Southern blot (emdirimi)

Southern analizinde kullanılmak üzere enzimle kesilmiş DNA izolatları veya plazmidlerle yüklenmiş agaroz jel elektroforezini takiben jel, 45 dakika denatürasyon çözeltisi (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ve 30 dakika nötralizasyon çözeltisi (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA) içinde çalkalamalı tabla üzerinde muamele edilmiştir. Uygun ebatta kesilen ve 20X SSC blotlama tamponuyla (3 M NaCl, 0.3 M sodyum sitrat, 1 mM EDTA) ıslatılan Zeta Probe® (Bio-Rad, CA, ABD) naylon membran, jelin alt yüzü ile temas edecek şekilde Southern blot düzeneğine yerleştirilir. Bu düzenek (Şekil 3.2), dikdörtgen bir cam kap içine sırasıyla selüloz sünger, Whatman kağıdı, elektroforezle elde edilen jel (üst yüzü aşağıya gelecek şekilde), naylon membran, Whatman kağıdı, kağıt havlu istifi ve düz yüzeyli ağırlıktan ibarettir. Cam kap içine bol miktarda tampon ilave edilerek kapiler akışla bu sıvının üst katmanlardaki

kağıt havlu istifine emdirilmesi için düzenek gece boyu bekletilmiştir. Blotlama tamponunun buharlaşma yoluyla kaybını en aza indirmek amacıyla istif ebatlarında pencere açılmış streç filmle kenardaki sıvı yüzeyinin üstü kapatılmıştır. Alkali tampon, kapiler akış sayesinde kağıt havlu istifine doğru hareket ederek jelin içinden geçer ve böylece, denatüre edilmiş ve tek iplikcik halinde bulunan negatif yüklü DNA moleküllerinin taşınması ve pozitif yüklü membrana tutunması sağlanmış olur. Kısa süreliğine kuruması için kağıt havlu üzerinde bekletilen membran, ultraviyole çapraz bağlayıcı (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) içinde 6 dakika muamele edilmesiyle DNA molekülleri membran üzerine sabitlenmiştir.



Şekil 3.2. Agaroz jelde bulunan DNA iplikçiklerinin naylon membrana aktarılması için uygulanan Southern emdirim analizi düzeneğinin kesit görüntüsü.

Üzerinde DNA iplikçiklerini taşıyan membran Hybaid melezleme (hibridizasyon) fırınında (Thermo Electron Corp., MA, ABD) döner cam silindirlerde, yaklaşık 25 mL DIG Easy Hyb (Roche, Almanya) ön-hibridizasyon çözeltisi içinde 40 °C’de 2-4 saat süreyle ön-hibridizasyona bırakılmıştır. Daha sonra ön-hibridizasyon çözeltisi dökülerek yerine (DIG) etiketli probu ihtiva eden çözelti ilave edilmiştir. Fırın

sıcaklığı probun denaturasyonunun sağlanabilmesi amacıyla 10 dakikalığına 68 °C’de tutulmuş ve 40 °C’ye düşürülerek hibridizasyonun gece boyunca gerçekleşmesi sağlanmıştır. Ertesi gün, ikişer defa olmak üzere 5’er dak süreyle, oda sıcaklığında yıkama çözeltisi I (2X SSC, 0.1 % SDS) ve 15’er dak süreyle 68 °C’de yıkama çözeltisi II (0.5X SSC, 0.1 % SDS) ile yıkama yapılmıştır. Membranın bu aşamalar sırasında kurumamasına ve yüzeyinin tahriş olmamasına özen gösterilerek immünolojik tayin basamakları ile analize devam edilmiştir.

Immünolojik dedeksiyon için membran uygun kap içinde çeşitli çözeltilerle karıştırıcı tabla üzerinde döndürülerek muamele edilmiştir. Bu çözeltiler ve uygulanan süreler sırasıyla yıkama tamponunda (0.1 M maleik asit, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) 5 dak, bloklama çözeltisinde 2 saat, antikor çözeltisinde 30 dak, yıkama tamponunda 2 kere 15 dak ve dedeksiyon tamponunda 5 dak olarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra membran uygun ebatta kesilen bir plastik zarf içine yerleştirilerek üzerine birkaç damla CSPD® (alkali fosfataz ile kimyevi ışımaya yapan kullanıma hazır substrat) çözeltisi damlatılmıştır. Zarf, içindeki hava boşlukları çıkartılarak karanlık odada, çelik kaset içinde X-ışını filmiyle birleştirilerek 15 dak bekletilmiştir. Süre sonunda elde edilen X-ışını filmi karanlık odada Kodak film geliştirme çözeltileriyle muamele edilerek geliştirilmiştir.

3.2.1.11. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi

Hücre yoğunlukları saf su ile seyreltilen sıvı kültür örneklerinin 600 nm dalgaboyunda absorbanlarının ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Tek kullanımlık spektrofotometre küvetleri ile Du530 UV-VIS spektrofotometresinde (Beckman ,CA, USA) okuma yapılmıştır.

3.2.2. Diğer biyokimyasal analizler

3.2.2.1. Amilaz aktivitesi tayinleri

Kültür süpernatantlarının amilaz aktivitesi EnzCheck (Invitrogen, CA, ABD) veya DNSA reaktifi yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

İlk yöntemde kit ile birlikte sağlanan fluoresan etiketle işaretlenmiş özel nişasta substrat olarak kullanılmıştır ve üretici tarafından sağlanan talimatlara göre gerçekleştirilen analizde uyarılma maksimumu 505 nm, emisyon maksimumu 512 nm civarında olan hidroliz ürünlerinin tayini TD-700 Fluorometresi (Turner Designs Inc., CA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre 1 enzim ünitesi pH 6.9'da 20 °C'de enzimin 3 dakikada açığa çıkardığı 1.0 mg maltoz olarak tanımlanmıştır EnzCheck yönteminde standart olarak bakteriyel amilaz kullanılmıştır (Sigma 6380) ve elde edilen tipik standart eğriye bir örnek Ek 3'de verilmiştir.

Kolorimetrik bir yöntem olan DNSA yöntemi Bernfeld (1955) tarafından geliştirilen yöntemle göre yapılmıştır. Bu analiz yöntemi uygulanırken kullanılan çözeltiler; 20 °C'de pH 6.9 olacak şekilde ayarlanan 6.7 mM NaCl içerikli 20 mM sodyum fosfat içeren çözelti A, toplam 25 mL hacimde %1'lik çözülebilir nişasta olacak şekilde 15 dakika kaynatılmasıyla hazırlanan çözelti B, 12 g sodyum potasyum tartratın 8 mL 2 M NaOH içinde çözülmesiyle hazırlanan çözelti C, 3,5-dinitrosalisilik asitle 20 mL hacimde 96 mM konsantrasyonda hazırlanan çözelti D, çözelti C'nin yavaşça çözelti D'ye ilave edilmesiyle ve saf su ile 40 mL hacme tamamlanmasıyla hazırlanan çözelti E, % 0.2 (a/h) saf maltoz içeren çözelti F ve hazırlanan uygun şekilde seyreltilerek hazırlanan α -amilaz içeren örnek çözeltisi olmuştur. Yönteme göre her bir analiz örneği için 200'er μ L çözelti B ve örnek çözeltisi içeren karışım (aksi şekilde belirtilmediyse 20 °C'de) tam olarak 3 dak inkübe edilmiştir. Hidroliz, süre bitiminde 200 μ L çözelti E ilave edilerek sonlandırılmıştır. Bu karışım, rengin gelişmesi için 15 dak 95 °C'de inkübe edilmiştir. Soğutulan örneklerle 1800 μ L saf su ilave edilerek tek kullanımlık spektrofotometre küvetleri ile Du530 UV-VIS spektrofotometresinde (Beckman, CA, USA) 540 nm dalgaboyunda absorbans ölçülmüştür. Hem örnek

analizleri için, hem de standart maltoz analizleri için birer okuma da çözelti E'den sonra örnek çözeltisinin veya standart maltoz çözeltisinin ilave edildiği, diğer işlemlerin aynı olduğu kör deneme hazırlanmış ve okutulmuştur. Örnek veya standardın absorbands değeri, kör denemede elde edilen absorbands değerinin çıkarılması ile düzeltilmiştir. Bir enzim ünitesi enzimin 3 dakikada açığa çıkardığı 1.0 mg maltoz olarak tanımlanmıştır. Analizlerde Ek 4'de bu yöntemle göre çözelti F'nin seyreltilmesi ile hazırlanan standart maltoz çözeltileri kullanılarak elde edilen standart eğriye bir örnek verilmiştir.

Bakteriyel amilaz üretimlerinin belirlenmesi amacıyla geliştirilen sıvı kültürlerde besiyeri olarak nişastalı-*Bacillus* besi yeri (1% KH_2PO_4 , 1% çözülebilir nişasta, 0.25% Na_2HPO_4 , 0.2% soytone 0.1% NaCl, 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.005% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005% CaCl_2) kullanılmıştır.

3.2.2.2. Protein Analizi

Hücre süpernatantlarının protein içeriği bisikolinik asit (BCA) protein tayin kiti (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Inc., IL, USA) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu test sırasında standart protein olarak BSA kullanılmış ve 0-250 $\mu\text{g/mL}$ aralığında hazırlanan standart eğrisine bir örnek Ek 5'de verilmiştir.

3.2.3. Doğal *B. subtilis* BK07 suşunun kesin tanılaması ve α -amilaz genininin izolasyonu çalışmaları

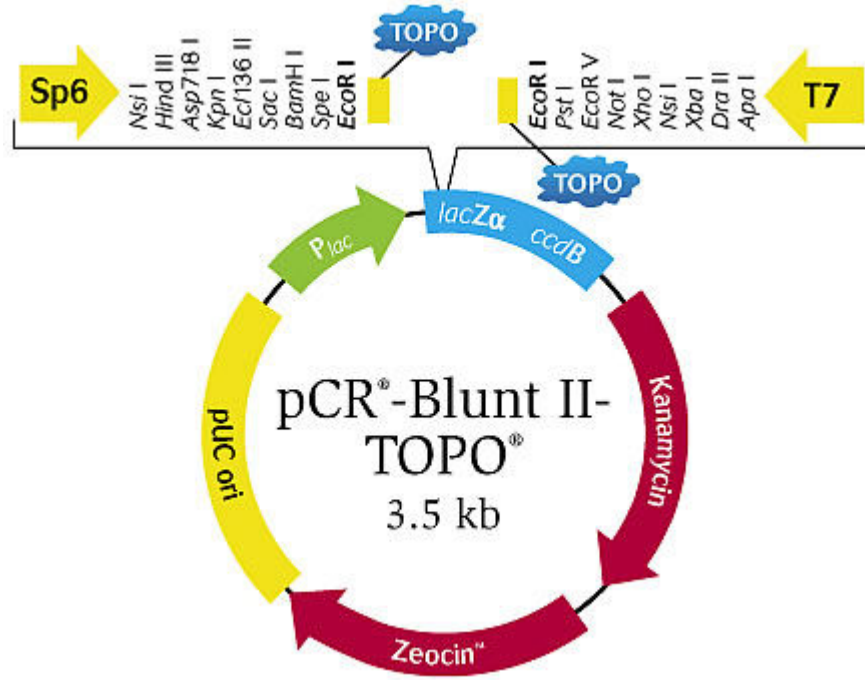
3.2.3.1. *B. subtilis* BK07 16SRNA diziliminin ve izolatlarda AmyEF/R korunmuş bölgesinin PCR ile çoğaltılması

B. subtilis BK07 total genomik DNA izolatu üzerinden PCR yoluyla 16S RNA diziliminin kopyaları 16SF (5'-GCT TGC TCC CTG ATG TTA GC-3') ve 16SR (5'-TTG CTC CGT CAG ACT TTC G-3') primer çifti (Integrated DNA Technologies, IA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

NCBI GenBank veritabanının bulunduğu BLAST tarama motoru (Anonymous 2009c) yardımıyla birbirine yakın *Bacillus* türlerine ait amilaz gen dizileri elde edilmiş ve bunların holomolog bölgeleri karşılaştırılmıştır. α -Amilaz geninin iç bölgesinden dizilimler arasında farklılığın en az olduğu yaklaşık 900 bp'lik bir bölge belirlenmiştir. *B. subtilis* 168 suşunda bu bölgeye ait diziliminden faydalanılarak, bu bölümün PCR yoluyla çoğaltılmasında kullanılacak AmyEF (5'- GCC ATT CAG ACA TCT CCG - 3')ve AmyER (5'- CAA ATA AAG CAC TCC CGC -3') primer çifti tasarlanmıştır. Bu işlem için DNAMAN programı (DNAMAN 5.2.2, Lynnon Corporation, Quebec, Kanada) kullanılmıştır. Bu bölgenin çoğaltılması denemesi *B. subtilis* BK07 kromozom preparatını kalıp olarak kullanan ve 12SF ve 12SR primer çifti ile gerçekleştirilen PCR denemesiyle aynı anda ve aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2. PCR ürünlerinin *E. coli*'de klonlanarak çoğaltılması ve dizi analizi

PCR yoluyla çoğaltılan segmentleri temizlemek ve ligasyona hazırlamak amacıyla MinElute PCR Purification Kit (Quiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. DNA segmentleri, T4 DNA ligaz enzimi yardımıyla gerçekleştirilen tepkime ile Topo II-Blunt (Invitrogen, CA, ABD) plazmid vektörüne bağlanmıştır. Bunun için, oda sıcaklığında 5 dakikalık bir tepkime ile TopoII Blunt Isomerase enzim kompleksi sayesinde küt uçlu DNA moleküllerinin birbirine bağlanmasını (ligasyonu) sağlayan Quick Ligation Kit (New England Biolabs, MA, ABD) kullanılmıştır. Elde edilen ligasyon ürünü plazmidler kimyasal transformasyona uyumlu One Shot® Top10 (Invitrogen, CA, ABD) *E. coli* hücrelerine transforme edilmiştir.



Şekil 3.3. Küt uçlu PCR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan Blunt II Topo vektör kompleksi.

Transformasyonla elde edilen kolonilerden rastgele dörder adet seçilerek 50 µg/mL Kanamycin içeren 15 mL LB Miller sıvı besiyerine aşılama yapılmış ve kültürlerin üremesi için engelli (baffled) erlenler 24 saat süreyle çalkalamalı inkübatöre bırakılmıştır.

Bir sonraki gün gelişen Top 10 klonlarından plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonu StrataPrep® (Stratagene, CA, ABD) plazmid miniprep kiti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Plazmidler, içerdikleri DNA segmentlerini düşürmek amacıyla, özel tampon çözeltisi içinde *EcoRI* enzimiyle sindirilmiştir. Bu örnekler jelde yürütülerek her bir dizi tayinine kullanılacak plazmid izolatları seçilmiş ve bunların analizi için T7 ve SP6 dizi analiz primer çifti kullanılmıştır. *B. subtilis* BK07 için daha kesin bir tanılama gerçekleştirmek amacıyla 16S RNA dizilimi aydınlatılarak elde edilen nükleotid dizilimi BLAST tarama motoru kullanılarak homolog dizilimlerle kıyaslamalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca, internet veritabanından faydalanılarak yüksek benzerlik taşıyan diğer *Bacillus* suşlarına ait olan ve bu çalışmada

kullanılan bakterilere ait 16S rDNA dizileri hizalanarak değerlendirilmiştir ve bu sayede bakteri suşları arasındaki genetik uzaklığı gösteren filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

3.2.3.3. AmyEF/R amplikonu ile amilaz genine duyarlı etiketleme ve tespit

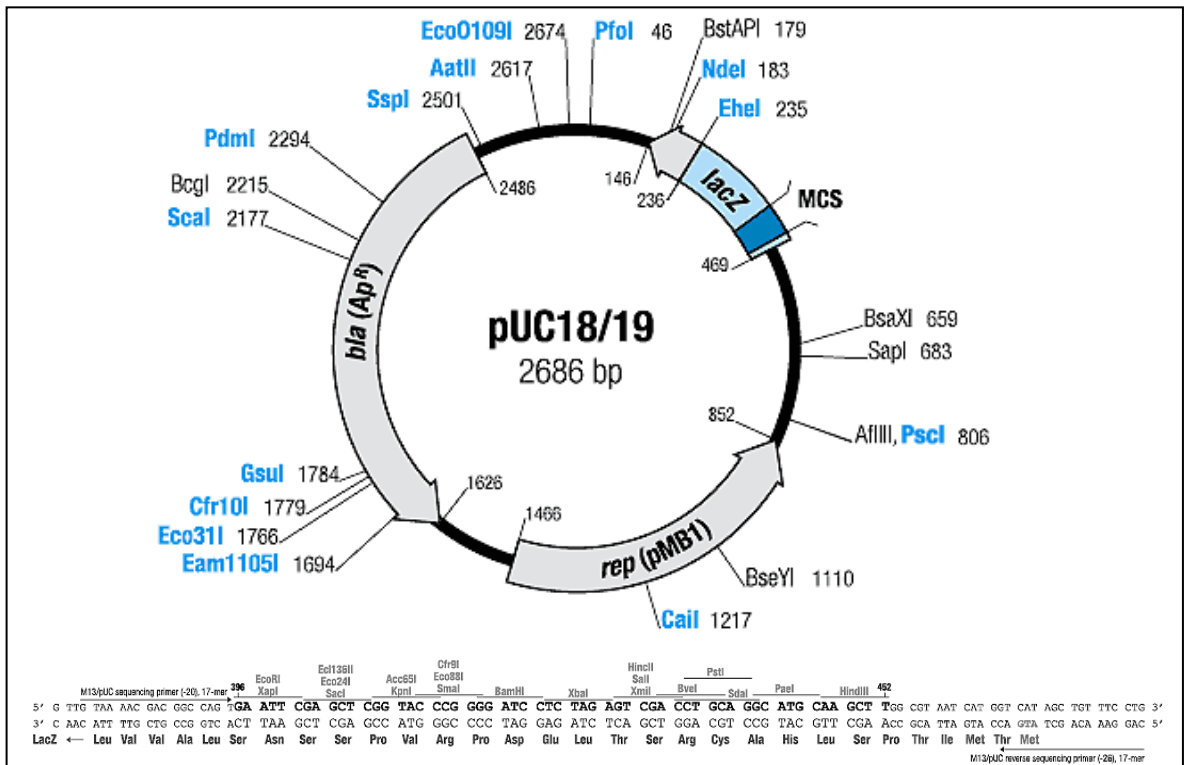
B. subtilis BK07 α -amilaz geninin orta bölgesindeki korunmuş dizilimden çoğaltılarak saflaştırılan DNA fragmanları steroid bir hapten molekülü olan DIG yardımıyla, hibridizasyonda kullanılacak olan ve tespiti kimyasal ışımaya sayesinde enzim immunoassay yöntemiyle gerçekleştirilecek probun hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu işlem DIG High Prime DNA Detection and Starter Kit II (Roche, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan AmyEF/R probun çalışma verimliliği, Zeta Probe® (Bio-Rad, CA, ABD) naylon membran üzerine 1'er μ L seri dilüsyonları damlatılmış DIG etiketli kontrol standardının ve *B. subtilis* BK07 DNA çözeltisinin üretici firmanın talimatları doğrultusunda AmyEF/R probu kullanılarak muamelesi ile kontrol edilmiştir. Seri dilüsyonlarda konsantrasyonu sırasıyla 1ng/ μ L, 10 pg/ μ L, 3 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 0.3 pg/ μ L, 0.1 pg/ μ L, 0.03 pg/ μ L, 0.001 pg/ μ L ve 0 pg/ μ L olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan prob tekrar kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.4. *Bacillus subtilis* BK07 ve *B. subtilis* PY22 kromozomlarında amyE genini dışardan keserek ayırmamızı sağlayacak enzimlerin belirlenmesi

B. subtilis BK07 ve *B. subtilis* PY22 kromozom izolatları Genbank veritabanı kullanılarak gerçekleştirilen bir öntarama ile belirlenen 9 adet aday restriksiyon endonükleazıyla kesilmiş ve %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. DNA'nın parçalanmasında *Bam*HI, *Bgl*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Not*I, *Sac*I, *Stu*I, *Xba*I, *Xho*I (New England Biolabs, MA, ABD) restriksiyon enzimleri uygun tampon çözeltileri ile birlikte kullanılmış, parçalama işlemi gece boyu sürdürülmüştür. Yürütülen jelde belirteç olarak 1 kbç'lik DNA molekül ağırlık standardı yanı sıra DIG etiketli standardı da kullanılmıştır. Elde edilen jelin Southern Blot analiz yöntemine uygun şekilde işlenmesiyle elde edilen X-ışını filminin görüntüsü çekilmiştir.

3.2.3.5. DNA mini-kütüphanesinin oluşturulması

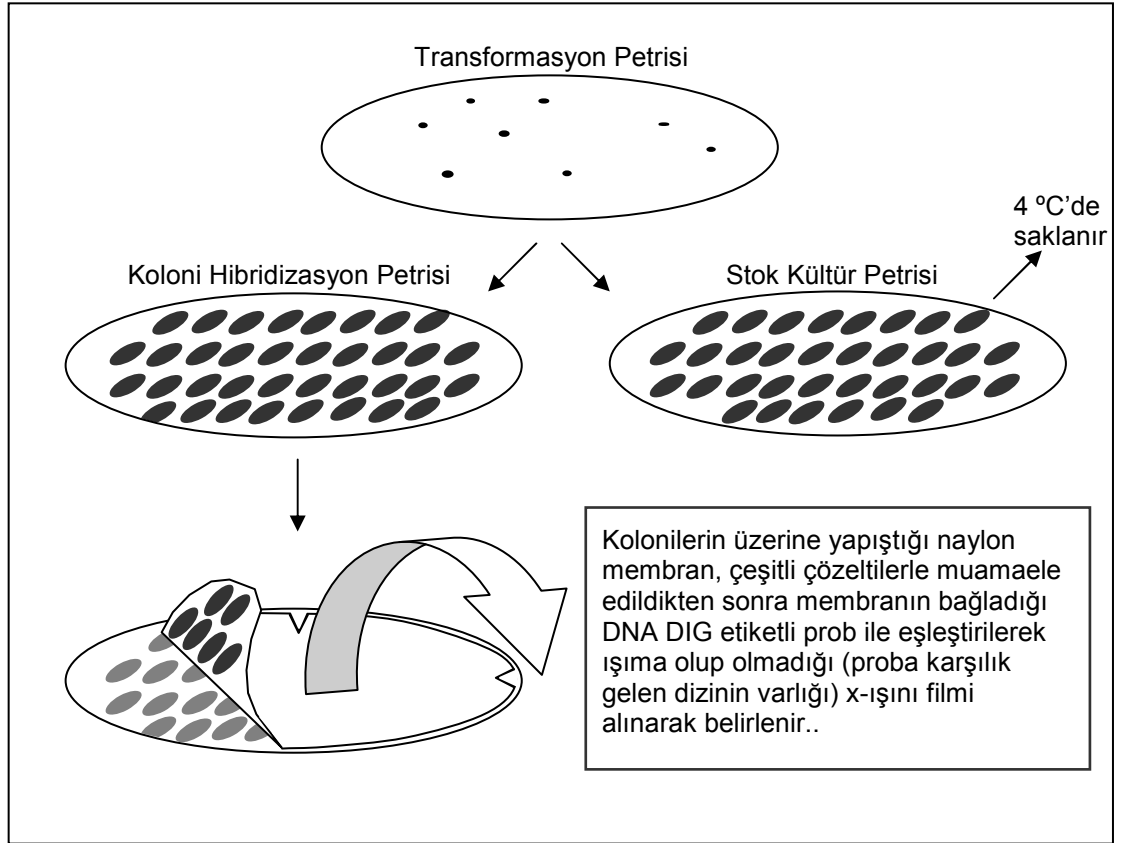
DNA Southern Blot anaizi (bakınız bölüm 3.2.3.4.) ile belirlenen restriksiyon enzimi (*Hind*III) kullanılarak *B. subtilis* BK07'e ait yaklaşık 12 µg genomik DNA parçalanmış ve yine aynı analizde aranan fragmanın bulunma olasılığının en yüksek olduğu bölge (4.5-5.5 kbç) jel elüsyonu ile saflaştırılmıştır. Benzer şekilde, klonlamada kullanılacak pUC19 (Fermentas, MD, ABD) plazmid vektörü (NewEngland Biolabs, MA, ABD) de *Hind*III ile sindirilmiş ve CIP ile defosforile edilerek jel elüsyonu ile arındırılmıştır. Şekil 3.4'te pUC vektör plazmidinin haritası verilmiştir. DNA fragmanları mini-kütüphanenin oluşturulabilmesi amacıyla ligasyon ile hazırlanan vektöre bağlanarak, yüksek verimli NEB Turbo (NewEngland Biolabs, MA, ABD) veya OneShot® Top 10 *E. coli* hücrelerine transforme edilmiştir.



Şekil 3.4. pUC19 klonlama vektörü.

Transformantlarda mavi-beyaz elemesinin (Blue-White Screening) gerçekleştirilebilmesi için ekim öncesinde ampisilinli (100 µg/mL) LB agar plakalarına yüzeyden 80 µL X-Gal (50 mg/mL) N-N-dimethylformamide ve 10 µL 1M IPTG çözeltisi uygulanmış ve yayılmıştır. IPTG tarafından tetiklenen lacZ geni sayesinde besiyerinde bulunan X-Gal maddesi sindirilir ve bunu yapabilen koloniler mavi renk alır. Ancak klonlama bölgesi lacZ geni ortasında bulunduğu için vektöre DNA bağlanması olması halinde bu genin faaliyeti durur ve klonlamada fragman içeren koloniler beyaz olarak gözlenir. Bu şekilde transformasyon plakalarında mavi koloniler elenmiştir, üreyen bütün beyaz koloniler ise ikişer adet LB-Amp plakalarına çizgi ekimle aktarılmıştır. Her plakada 50 civarı transformant ile birlikte, (-) kontrol olarak kesilmemiş pUC19 vektörü transforme edilmiş koloniden, (+) kontrol olarak da *B. subtilis* BK07 çizilmiştir. Bir gece geliştirilen plakalardan biri kaynak olarak 4 °C’de saklanmış, diğeri ise koloni hibridizasyon tekniği ile araştırılmak üzere kullanılabilecek 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Koloni hibridizasyonunda, geliştirilen kolonilerin doğrudan naylon membrana tutunması sağlanarak DIG’li immünolojik tayin gerçekleştirilmiştir. Bunun için plaka yüzeyi çapında dairesel kesilen membran konum işaretlemesi yapılarak doğrudan kolonilerin üzerine bırakılmıştır (Şekil 3.5). Düzgün şekilde kaldırılan membranın kuruması beklendikten sonra 3 dak % 10 SDS çözeltisi ile doyurulmuş Whatman kağıdı yığını üzerine bırakılmıştır. Membran kurumaya bırakıldıktan sonra aynı ıslatma düzeneği ile 5’er dak Southern emdiriminde kullanılan denatürasyon ve nötralizasyon çözeltileri ile ıslatılmıştır ve iki kere 5’er dak SSC tampon çözeltisi ile (150 mM NaCl, 15x10⁻³ mM trisodyum sitrat) ile muamele edilmiştir. Membran daha sonra bir kap içerisinde yeterli miktarda SSC tamponu içine bırakılarak 10 dak çalkalama tablasında bekletilmiştir. Havlu kağıt üzerinde kurutulan membran, Southern emdirim analizinde olduğu şekilde hibridizasyona tabi tutulmuştur. Hibridizasyon sonrasında AmyEF/R probu ile immünolojik olarak işaretlenerek X-Işını filminin görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 3.5. Koloni kaldırma yönteminin ilk basamağı olarak uygulanan kolonileri membrana aktarma tekniği.

3.2.3.6. Kromozom yürüyüşü (chromosome walking)

Kromozom yürüyüşü, diğer bir deyişle adaptör aracılıklı PCR (adaptor mediated PCR) denemeleri için oluşturulacak adaptör parçası biri 49 bp diğeri ise 13 bp uzunluğunda olan ve bir araya geldiklerinde birbirine yapışacak şekilde tasarlanan 2 primer ile oluşturulmuştur. Bu primerlerden kısa olanı 5' ucundan fosforile edilmiş, 3' amino ucundan amidizasyon ile modifiye edilmiştir. Fosforilizasyon ileri aşamalarda ligasyonu teşvik ederken amidize edilen ucun ise ligasyona dirençli olması hedeflenmiştir. Adaptör primerlerini 1'er mMol içeren ADP1 ve ADP2 karışım PCR cihazında 5 dakika 95 °C'de bekletildikten sonra yavaş yavaş soğutulularak iki primerin birbirine yapışması (annealing) sağlanmıştır.

Elde edilen adaptör daha önce *Hind*III ile kesilmiş ve 4.5 – 5.5 kbç büyüklüğünde olanları saflaştırılmış 1 µg *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'larına ligasyon tepkimesi ile bağlanmıştır (Şekil 3.6).

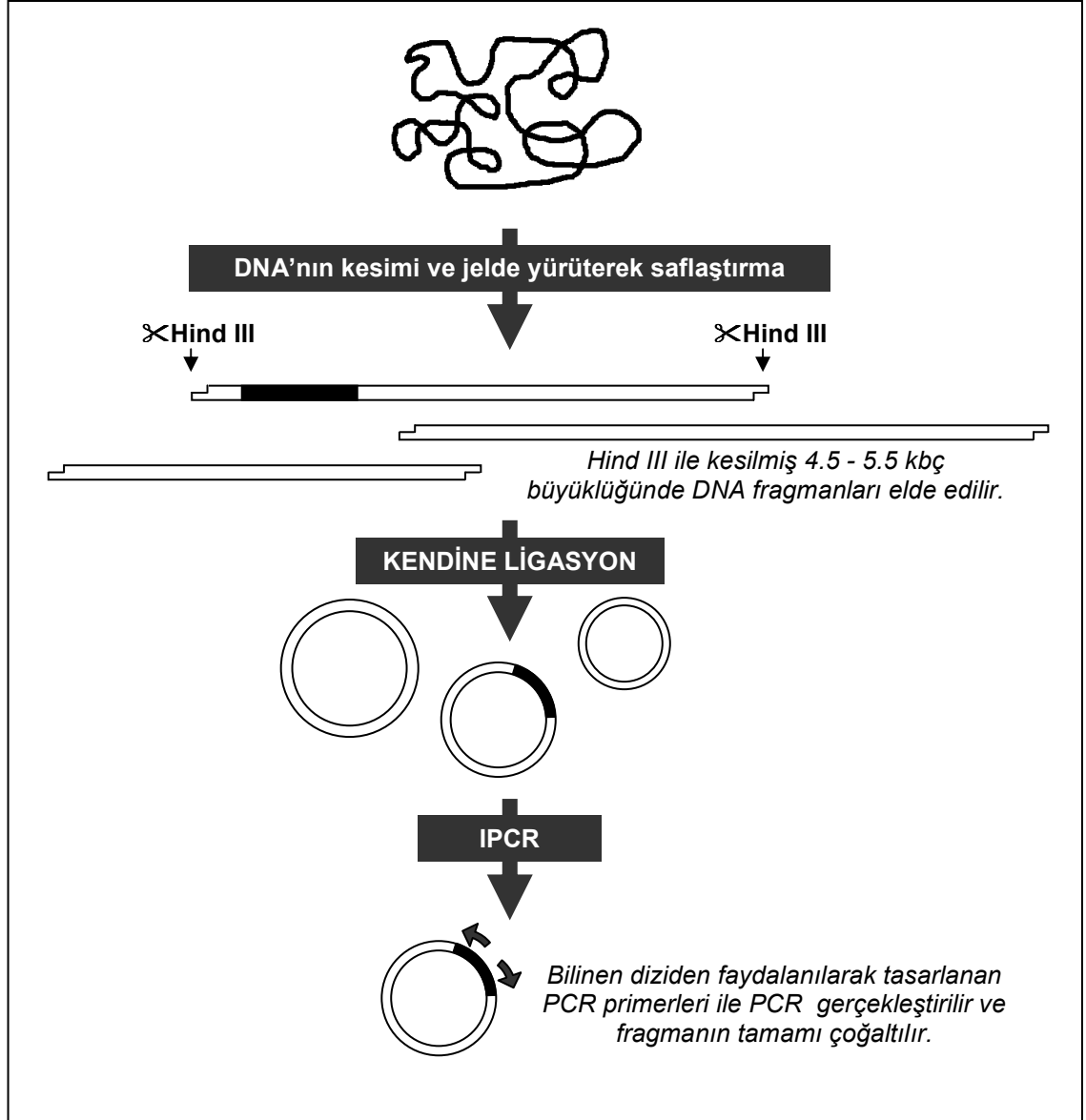


Şekil 3.6. *Hind*III endonükleazı ile kesilmiş DNA parçalarına bağlanan adaptörlerin şematik gösterimi. Denemelerde kullanılan primer çiftlerinden sadece GWSPF ve AP1'in yönleri örnek olarak gösterilmiştir.

Elde edilen adaptör bağlanmış parçalar kalıp olarak kullanılarak dizisi bilinmeyen DNA parçalarını çoğaltmak amacıyla PCR denemeleri yapılmıştır. Bu denemelerde AP1 – GWSPF, AP1 – GWSPR, AP2 – GWSPR, AP1 – INV F1 ve AP1 – INVR1 primer çiftleri ile denemeler yapılmıştır.

3.2.3.7. Ters PCR (inverse PCR)

Ters PCR için 4.5 – 5.5 kbç büyüklüğünde olan *Hind*III ile kesilmiş *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'sı ligasyon ile kendi üzerine bağlanarak kalıp olarak kullanılmıştır. Bu denemelerde primer çifti olarak INV F1 – INVR1 ve INV F2 – INVR2 primer çiftleri kullanılmıştır. Ters PCR denemesinde uygulanan aşamalar Şekil 3.7'te şematize edilmiştir.



Şekil 3.7. Ters PCR denemesindeki aşamaların şematik gösterimi.

3.2.4. *Bacillus subtilis* PY22'den amyE geni izolasyonu, dizi analizi ve *Pichia pastoris*'de ekspresyonu

3.2.4.1. *Bacillus subtilis* PY22'den amyE geni izolasyonu ve dizi analizi

B. subtilis PY22 suşunun amilaz geni PCR ile gen uçlarına *PmlI* ve *KpnI* kesim dizilerini ilave edecek dejenere AmyFP*mI*1 ve AmyRK*p*n1 primer çifti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu PCR denemesinde uygulanan PCR programı Çizelge 3.2'de verilmiştir. Elde edilen PCR ürünü agaroz jelde yürütülerek kontrol edildikten sonra TopoII-Blunt vektörüne bağlanarak *E. coli* DH5 α hücrelerinde çoğaltılmıştır. Seçilen 10 adet klonun plazmid izolatları *EcoRI* ile kesilerek agaroz jeli elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Bu şekilde doğru parçayı taşıdığı düşünülen 2 adet plazmid izolatu dizi analizine gönderilmiştir.

Çizelge 3.2. *B. subtilis*'in α -amilaz geninin çoğaltılması için PCR denemesinde kullanılan ısı döngü programı.

Sıra #	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Komut
1	94	3	
2	94	1	
3	45 $\pm$ 5	1	
4	72	3	32 kere #2'ye dön
5	72	10	
6	4	∞	

3.2.4.2. amyE geninin *Pichia pastoris*'e aktarımı

TopoII-Blunt vektöründe çoğaltılan ve uçlarına *PmlI* ve *KpnI* kesim dizileri ilave edilmiş *B. subtilis* PY22 amilaz geni içeren plazmid bol miktarda izole edilmiştir. Yaklaşık 13 μ g civarında plazmid önce *HindIII* ve *XhoI* enzimleriyle kesilmiş, sonrasında agaroz jelde yürütülerek 2 kb civarında gözlenen bant kesilerek saflaştırılmıştır. Daha sonra elde edilen fragmanların tekrar *PmlI* ve *KpnI* çiftiyle

kesilmiş ve PCR ürünlerini saflaştırmada kullanılan yöntemle göre saf fragmanların eldesi sağlanmıştır.

Bu şekilde transformasyon için hazırlanan amyE genini içeren fragmanlar aynı şekilde *PmlI* ve *KpnI* enzimleri ile kesilerek ve saflaştırılarak hazırlanan pPicZαA (Invitrogen, CA, ABD) vektörüne ligasyon ile bağlanmıştır. Elde edilen yeni plazmid çeşitli endonükleazlarla (*NdeI*, *XhoI*, *EcoRI* / *XbaI*) kesilerek oluşan jel görüntüsü incelenmiş ve ikinci bir doğrulama PCR ile (AmyEF – AmyER ve AmyEF – AmyER primerleri kullanılarak) yapılmıştır. Plazmidler nihai bir dizi analizi için dizi analizinin yapıldığı merkeze gönderilmiştir.

Plazmid dizisi belirlendikten sonra *SacI* ile kesilen plazmid karışımı PCR yönteminde belirtildiği şekilde saflaştırılmıştır. Doğrusallaştırılan plazmid elektrokimyasal olarak *P. pastoris* KM71H hücrelerine transforme edilerek elde edilen koloniler arasından 8 muhtemel klon amilaz aktivitesi varlığını test etmek üzere seçilmiştir.

3.2.4.3. *Pichia pastoris*'de ekspresyon

Amilaz salgılamasının bir ön-kontrolü olarak seçilen 8 klon ile yapılan sıvı saf kültür üretimlerinden ekim yapılarak nişasta ilaveli MM agarda (%0.34 maya azot bazı, 4×10^{-5} biotin, %0.5 metanol, %1.5 agar, %0.4 çözülebilir nişasta) gelişimi sağlanan koloniler Lugol çözeltisi dökülerek etraflarında berrak alan oluşumu olup olmadığı gözlenmiştir. MM-Nişasta agarında geliştirme 2 gün sürdürülmüş ve indüksiyonun sağlanması için 24. v. 46. saatte petri kapağına 100 µL kadar metanol yayılmıştır.

Maya klonlarında amilaz üretiminin izlenmesi sıvı kültürlerde indüksiyonlu üretimle gerçekleştirilmiştir. Bunun için tek koloniden 5 mL hacimde YSD sıvı besiyerine ekim yapılarak optik yoğunluğun 5'in üzerine çıkması amacıyla 30 °C'de, 15 mL'lik kapaklı tüplerde, 250 d/dak çalkalamalı olarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürler inokulum olarak kullanılmış ve 0.02 OD olacak şekilde 100 mL hacimli

engelli erlenlerde 15 mL BMGY sıvı besiyerine (%1 (w/v) maya özütü, %2 (w/v) pepton, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.0), %1.34 (w/v) maya azot bazı, % 4×10^{-5} (w/v) biotin, %1 (v/v) gliserol) aşılama yapılmıştır. Bu kültürler de 30 °C’de 250 d/dak çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, fermantasyonun 18. saatinde kültürler steril santrifüj viallerine aktararak Sorvall Legend RT Plus (Thermo Scientific, MA, ABD) ile 10 °C’de, 3,250 rcf’de 10 dak süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak toplam 15 mL olacak şekilde taze BMMY sıvı besiyeri (%1 (w/v) maya özütü, %2 (w/v) pepton, 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.0), % 1.34 (w/v) maya azot bazı, % 4×10^{-5} (w/v) biotin, %0.5 (v/v) metanol) ilave edilmiş, Vortex Genie II (Scientific Industries, NY, ABD) vorteks karıştırıcı yardımıyla tekrar homojenize edilen hücre kültürleri aynı koşullarda çalkalamalı fermantasyona bırakılmıştır. Bu örneklerde 0., 12., 24., 36., 48., ve 72. saatlerde örnekler alınarak OD belirlenmiş, kültüre (0. saat hariç) hacimce % 1 oranında metanol ilave edilmiş ve santrifüjlenerek elde edilen kültür supernatantları daha sonra analiz edilmek üzere 4 °C’de saklamaya alınmıştır.

Üretilen sıvı kültürlerden alınan indüksiyonu takip eden 12. ve 24. saat süpernatant örnekleri ile SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Seçilen klonlarda amyE kopya sayılarının belirlenmesi

Seçilen klonlarda gen kopya sayılarının belirlenmesi Inan vd (2006) tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, klonların DNA’ları izole edilerek 1 µg/10 µL olacak şekilde konsantrasyonları ayarlanmış ve toplam 30 µL hacimde *Bst*EII endonükleazı ile kesilmiştir. Southern emdirim analizinde olduğu şekilde kontrol *P. pastoris* KM71H XrDNA’sı, DIG ve 1 kb molekül ağırlık standartları ile birlikte agaroz jelde yürütülen örnekler nylon membrana aktarılmıştır. Membranda bulunan DNA iplikçiklerinin gözlenebilmesi için hibridizasyon ve DIG - AOX1 probu ile işaretleme gerçekleştirilmiştir. Membranın X-ışını filmi alınarak gözlenen bantların konumları ağırlık standardıyla kıyaslanmasıyla klonlarda mevcut rekombinant gen sayısı belirlenmiştir.

3.2.6. Seçilen *Pichia pastoris* suşunun salgıladığı rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu

3.2.6.1. Rekombinant protein üretimi, saflaştırması ve proteinin analizi

α -Amilaz üretimi için seçilen klon ile çalkalamalı inkübatörde 2L hacimli engelli erlende 200 mL sıvı besiyerinde metanol indüksiyonlu üretim gerçekleştirilmiştir. 96 saat sürdürülen bu üretim sırasında 12., 24., 48., 72., ve 96. saatlerde alınan örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Ayrıca, elde edilen son kültür amilazın daha saf ve konsantre halde elde edilmesi amacıyla çeşitli işlemlere tabi tutulmuştur. Bu işlemlerin tamamı 4 °C’de gerçekleştirilmiştir.

Kültür sıvısı 100’er mL olarak alındıkları steril santrifüj kavanozlarında 15 dakika süreyle 4 °C’de 3,250 rcf’de santrifüjlenmiş, elde edilen berrak süpernatant kalan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla, protein bağlayıcılığı düşük olan 0.2 µm delik çapı olan Supor® şırınga filtrelerinden (Pall Life Sciences, NY, ABD) geçirilmiştir. Elde edilen süzüntüye, 4 °C’de sürekli karıştırma altında, amonyum sülfat eklenerek tuzun tamamen çözünür hale geçmesi sağlanmıştır. Bu aşamada bulanık bir görüntü alan %80 doygunluktaki çözelti 50’şer mL hacimli tüplere alınarak proteinlerin çöktürülmesi için 9,500 rcf santrifüj kuvvetinde 25 dak santrifüjlenmiştir. Süpernatant 4 °C’de saklamaya alındıktan sonra peletler toplam 12 mL hacimde MOPS tamponu (100 mM, pH 6.9) içinde çözündürülmüştür. 15 mL hacim kapasiteli, 3,500 molekül ağırlığına kadar geçirgenliği olan Slide-a-Lyzer® diyaliz kasetine şırınga edilen örnek aynı MOPS tamponu içinde 2 saat 4 °C’de karıştırma altında bekletilmiştir. Elde edilen dializat 50,000 molekül ağırlığında ayırma sağlayabilen santrifügal membran filtre (Centriplus® YM-50, Millipore) kullanılarak 5 aşamalı olarak 30’ar dakika 3,000 rcf’de santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj işlemi aralarında filtre üstünde kalan bölüme 4’er ml MOPS tampon çözeltisi (0.1 M; pH 6.9) ilave edilmiştir. Filtratlar ve saflaştırılmış amilaz içerdiği düşünülen filtre üstü sıvı izleyen analizleri gerçekleştirmek üzere şırınga filtreden (0.2 µm delik çaplı, Whatman®) geçirilerek 4 °C’de steril tüplerde muhafaza edilmiştir.

Kısmi saflaştırma işlemlerinden elde edilen çeşitli fraksiyonlar %10 akrilamid içerikli, 10 kuyulu jel kullanılarak SDS-PAGE analizine tabi tutulmuştur. Saflaştırma aşamalarında elde edilen fraksiyonların protein içerikleri belirlenmiştir ve işlem için verim hesapları yapılmıştır.

3.2.6.2. *EndoH* ile deglikozilasyon

Glikozilasyonun doğrulanması ve rekombinant proteinin gerçek molekül ağırlığının tesbiti için protein denatüre edildikten sonra uygun tampon çözelti karışımı içinde *EndoH* enzimi ile 60 °C’de 90 dak muamele edilmiş ve örnekler SDS-PAGE analizi ile inelenmiştir.

3.2.6.3. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi

Kısmen saflaştırılmış amilaz çözeltisi pH 5-9 aralığında (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) ayarlanmış fosfat tamponu ile 40 kat seyreltilmiş ve bu şekilde hazırlanan dilüsyonların amilaz aktiviteleri DNSA reaktifi yardımıyla spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için belirlenen optimum pH’ya ayarlanmış fosfat tamponu ile 40 kat seyreltilen amilaz çözeltilerinin amilaz aktiviteleri yine DNSA reaktifi kullanılarak tayin edilmiştir. Bu aşamalarda tepkimeler önceden sıcaklıkları ayarlanmış MultiBlok® ısıtıcılar (LabLine, ABD) içinde 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C’de gerçekleştirilmiştir. Stabilitate tayinleri için seyreltiler aynı sıcaklıklarda 1 saat bekletildikten sonra amilaz aktivitesi aynı yöntemle 20 °C’de gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bakterilerin Optimum Çoğalma Sıcaklıklarının Tespiti

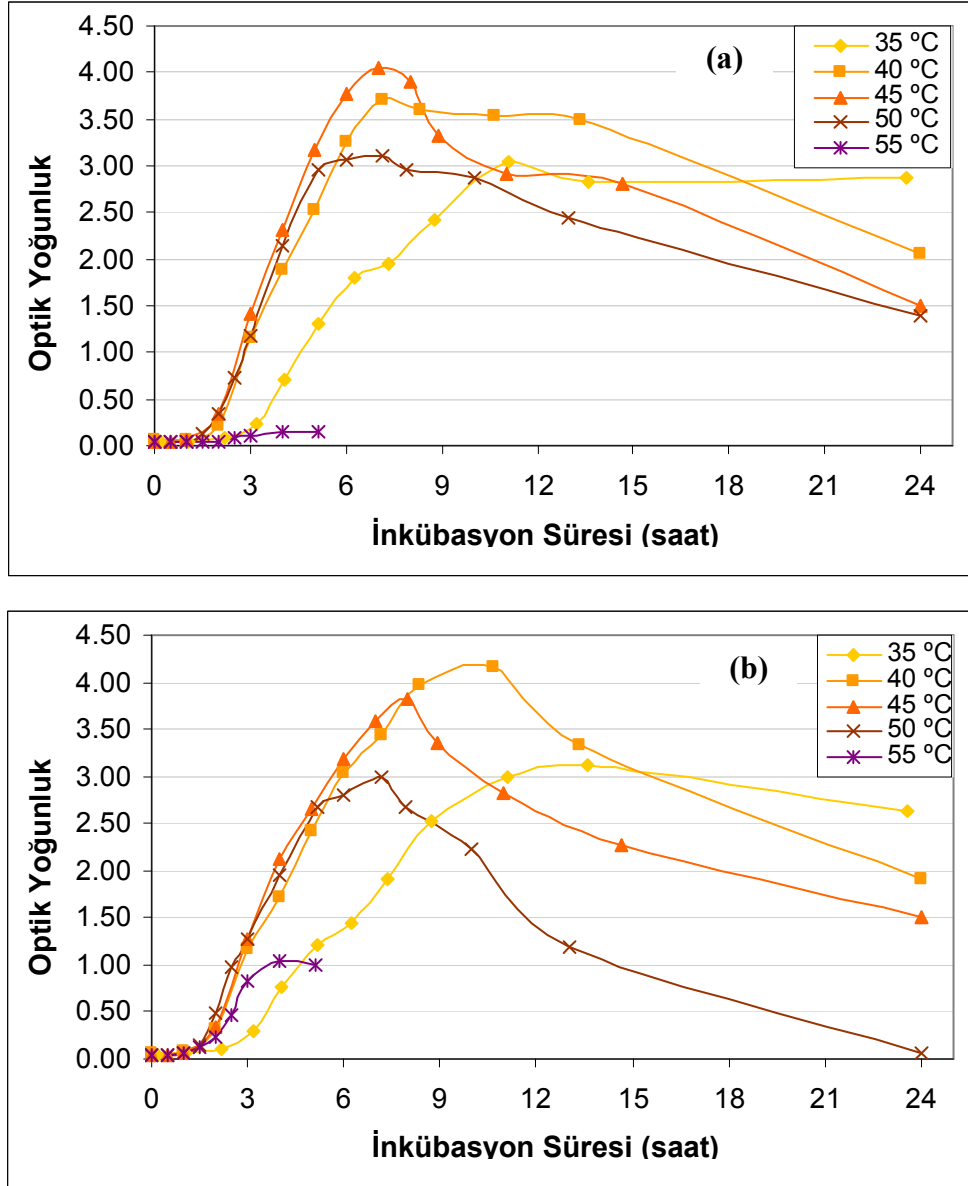
Sünme oluşmuş ekmek içinden izole edilen ve mikroskopik inceleme ile gram pozitif, sporlu, çubuk bakteri olduğu belirlenmiş olan (Erem 2007) *Bacillus subtilis* BK07 suşunun ve *B. subtilis* türünden olduğu kesin olarak bilinen *B. subtilis* PY22 suşunun optimum çoğalma sıcaklıkları 35-55 °C arasında inkübasyonla sıvı besiyerinde geliştirilen bakterilerin sık aralıklarla optik yoğunluklarının belirlenmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir.

İncelenen bakteri suşlarının büyüme eğrileri Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Logaritmik büyüme bölgesi belirlenmiş, bu bölgeye ait veriler kullanılarak büyüme katsayıları ve katlanma süreleri hesaplanmıştır.

Elde edilen verilerden logaritmik çoğalmanın olduğu bölge belirlenerek spesifik büyüme katsayısı (μ) ve ortalama toplu katlanma süresi (T_D) hesaplanmıştır. Logaritmik çoğalma bölgesinde elde edilen verilerin Denklem 4.1’e uyumlu olarak regresyonu sonucu spesifik büyüme katsayısı ve Denklem 4.2 ile T_D hesaplanmıştır. Denklem 4.1’de x_0 , başlangıç hücre yoğunluğu, x_t , ise t süresinde ölçülen hücre yoğunluğunu göstermektedir.

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \dots\dots\dots \text{Denklem 4.1}$$

$$T_D = \ln 2 / \mu \dots\dots\dots \text{Denklem 4.2}$$



Şekil 4.1. *B. subtilis* BK07 (a) ve *B. subtilis* PY22 (b) suşlarına ait büyüme eğrileri

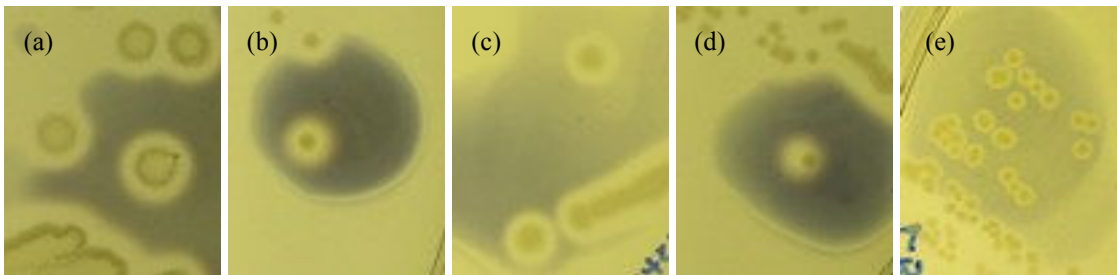
Hesaplanan μ ve T_D değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu çizelgeden de anlaşılabileceği üzere her iki bakterinin de en hızlı 50 °C’de çoğaldığı görülmüştür. Termofil organizmalar tipik olarak 40-70 °C’de gelişebilen ancak 45-60 °C arasında optimum çoğalma gösteren organizmalardır (Wubbolts vd 2000). Amelunxen ve Murdock’a (1978) göre optimum büyüme sıcaklığı 50-65 °C arasında olan ancak 30 °C altında da gelişebilen organizmalar fakültatif termofil olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırma kapsamında çalışmada incelenen *B. subtilis* BK07 ve *B. subtilis* PY22 suşlarının fakültatif termofil oldukları sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1. *B. subtilis* BK07 ve *B. subtilis* PY22 suşlarına ait büyüme fonksiyonları ve katlanma süreleri

<i>B.subtilis</i> BK07	Büyüme fonksiyonu	Uyumluluk	Spesifik çoğalma	Ortalama toplu katlanma
Sıcaklık (°C)	(logaritmik faz)	%'si (R^2)	katsayısı (μ)	süresi (T_D , dak)
35	$y = 0.006e^{0.0194x}$	1	0.0194	35.5
40	$y = 0.0145e^{0.0239x}$	0.9904	0.0239	29.0
45	$y = 0.0137e^{0.0259x}$	0.9982	0.0259	26.8
50	$y = 0.009e^{0.0295x}$	0.998	0.0295	23.5
55	$y = 0.0278e^{0.0061x}$	0.8911	0.0061	113.6
<i>B.subtilis</i> PY22	Büyüme fonksiyonu	Uyumluluk	Spesifik çoğalma	Ortalama toplu katlanma
Sıcaklık (°C)	(logaritmik faz)	%'si (R^2)	katsayısı (μ)	süresi (T_D , dak)
35	$y = 0.0116e^{0.017x}$	1	0.017	40.8
40	$y = 0.0209e^{0.0223x}$	0.9999	0.0223	31.1
45	$y = 0.0162e^{0.0245x}$	0.9974	0.0245	28.3
50	$y = 0.0095e^{0.0314x}$	0.9925	0.0314	22.1
55	$y = 0.0201e^{0.0208x}$	0.9993	0.0208	33.3

4.2. Bakterilerin Amilaz Üretme Potansiyelinin Kontrolü

Çalışmada kullanılan *Bacillus* suşlarının nişastalı agarda gelişirken hücre dışına amilaz salgılayıp salgılamadıklarının kontrolü bu ortamda gelişen koloniler üzerine Lugol çözeltisi dökülmesi ve berrak zon oluşumunun kontrolü ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 4.2’de verilmiştir.



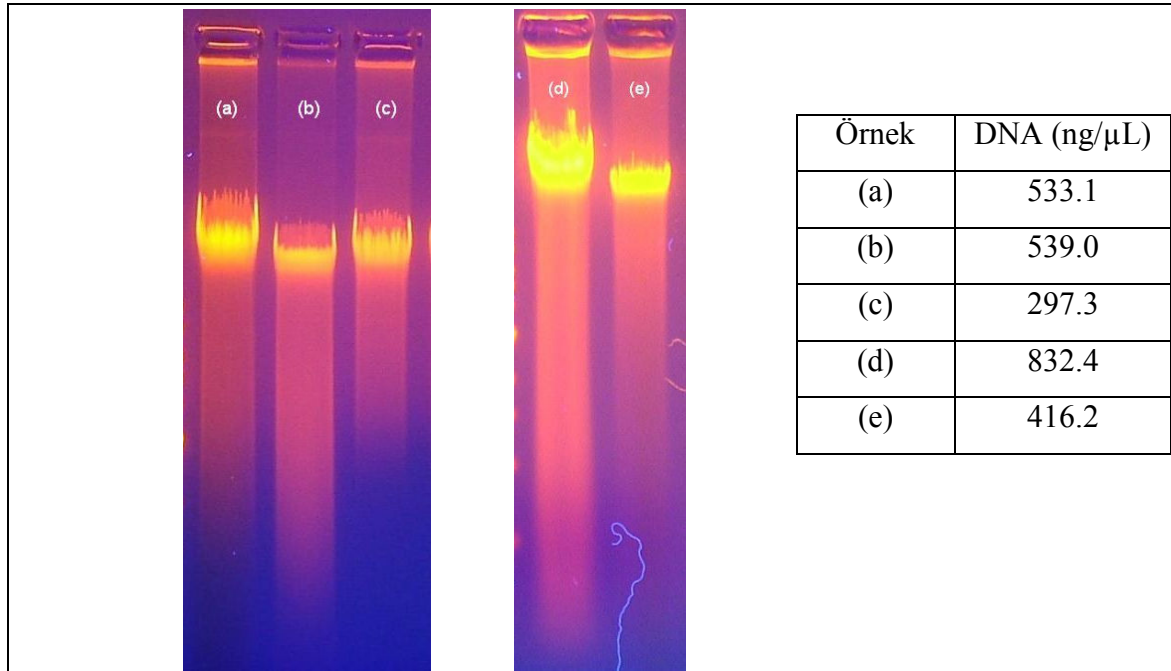
Şekil 4.2. Saf kültürlerle aşılanan nişastalı agar plakalarının Lugol çözeltisi ile boyanmış görüntüleri (a): *B. subtilis* BK07; (b): *B. subtilis* PY22; (c) *B. subtilis* RSK244; (d) *B. subtilis* RSK246; (e) *E. coli* NEB Turbo

Çalışmada kullanılan bütün *Bacillus* suşları kolonileri etrafında berrak zon gözlenmesi bu bakterilerin amilaz salgılama yeteneklerini doğrulamıştır. Kontrol amacıyla aynı besiyerinde üretilen *E. coli* NEB Turbo hücrelerinde berrak bölge oluşmamış, ancak kolonilerin altına Lugol çözeltisi ulaşmadığı için koloni sınırına kadar mavi renk oluşumu gözlenmiştir.

4.3. Klonlama Çalışmaları

4.3.1. DNA izolasyonu

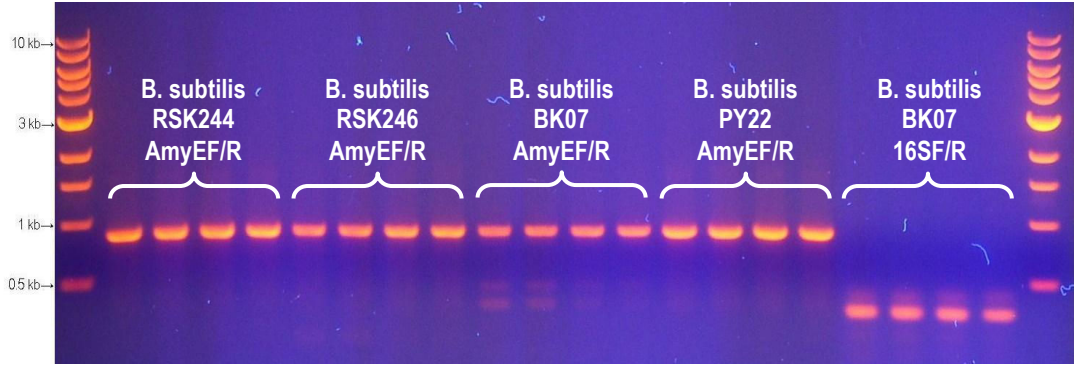
Çalışmalarda ilk olarak kalıp olarak kullanılacak bakteri DNA'ları izole edilerek bunların yoğunlukları (miktarları) ve kaliteleri belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Elde edilen bakteriyel genom DNA'sı izolatlarının jel görüntüleri ve 1 μL örnekle yüklenen DNA miktarları, (a): *B. subtilis* RSK244; (b): *B. subtilis* RSK246; (c) *B. subtilis* BK07; (d-e) *B. subtilis* PY22

4.3.2. PCR ile AmyEF/R ve 16S rDNA bölgelerinin izolasyonu ve değerlendirmeleri

Bu DNA izolatları kalıp olarak kullanılarak ilgi duyulan amyE geninin orta bölgesinde yaklaşık 900 bp'lik bir bölüm ve *B. subtilis* BK07 suşu için 16S rDNA spacer (yeredici) dizisi çoğaltılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. PCR ürünlerinin kontrolü

B. subtilis BK07 ve PY22 suşlarından elde edilen amplikonlar klonlanarak *E. coli*'de çoğaltılmıştır. Bu plazmidlerin dizi analizi sonucu her iki suşta AmyEF/R segmentinin ve *B. subtilis* BK07'de 16S rDNA spacer bölgelerinin nükleotit dizilimi belirlenmiştir (Şekil 4.5).

BK07. 16SrDNA

Uzunluk: 535 bp

Bileşim: 134 A (%25.0); 127 C (%23.7); 171 G (%32.0); 103 T (%19.3)

Molekül ağırlığı:ssDNA(tek iplikçik):166.22;dsDNA(çift sarmal):329.86
ORIJIN

```
1  TGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCCTAATAC ATGCAAGTCG
61  AGCGGACAGA TGGGAGCTTG CTCCCTGATG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG
121 TAACCTGCCT GTAAGACTGG GATAACTCCG GGAAACCGGG GCTAATACCG GATGCTTGTT
181 TGAACCGCAT GGTTCAAACA TAAAAGGTGG CTTCGGCTAC CACTTACAGA TGGACCCGCG
241 GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAATGGCT CACCAAGGCA ACGATGCGTA GCCGACCTGA
301 GAGGGTGATC GGCCACACTG GGAAGTACAG ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT
361 AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT
421 TTTCGGATCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA AGAACAAGTA CCGTTCGAAT AGGGCGGTAC
481 CTTGACGGTA CCTAACCAGA AAGCCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTA
```

Şekil 4.5. *B. subtilis* BK07 suşuna ait 16S rDNA spacer bölgesine ait bazı özellikler ve nükleotid dizisi

B. subtilis BK07'in tanılaması, elde edilen 535 bç'lik 16S rDNA spacer bölgesine ait nükleotid diziliminin veritabanı değerlendirmesiyle doğrulanmıştır. *B. subtilis* BK07 suşu ile *B. subtilis* PY22 suşuna ait olan ve zaten benzer olabileceği düşünülen AmyEF/R bölgelerinin her ikisinin 886 bç uzunluğunda ve birbiriyle %89.84 oranında özdeş olduğu belirlenmiştir. İki suşa ait AmyEF/R dizileri sırasıyla BK07-AmyEF/R ve PY22-AmyEF/R olarak isimlendirilmiş ve bunlara ait dizi analizi sonuçları sırasıyla Şekil 4.6'da ve Şekil 4.7'de verilmiştir. NCBI-BLAST tarama motorunda nükleotid veritabanı kullanılarak gerçekleştirilen ve *B. subtilis* BK07-AmyEF/R dizi verisi kullanılarak yapılan eşleştirmede % 100'lük kapsama alanı ile *Bacillus* sp. K8104 α -amilaz geni şeklinde tanımlanmış (lokus:EU717848) girişin %98 oranında özdeş diziye sahip olduğu, %100 kapsama alanına sahip *B. subtilis* kısmi amilaz geni şeklinde tanımlanan (lokus: AJ973635) girişinin %90 oranında özdeş diziye sahip olduğu görülmüştür.

BK07-AmyEF/R

Uzunluk: 886 bç

Bileşim: 265 A (%29.9); 176 C (%19.9); 224 G (%25.3); 221 T (%24.9)

Molekül ağırlığı (kDa): ssDNA (tek iplikçik): 274.69 dsDNA: 546.18

ORIJIN

```

1   GCCATTCAGA CATCTCCTAT TAATCAAGTA AAGGAAGGAA ATAATGGAGA TAAAAGCATG
61  GGGAACTGGT ACTGGCTTTA CCAGCCGACC TCTTACCAGA TTGGCAACAG GTACCTGGGT
121 TCCGAGGAAG AGTTTAAAGA AATGTGTGCC GCGGCTGAAG AATATGGTGT GAAGGTTATT
181 GTCGATGCCG TCATCAATCA CACAACCAGT GACTATGCTG CGATTTCAA TGA AATTAAA
241 AGTATATCAA ATTGGACGCA TGGAAACACA CAAATTAAAA ACTGGTCCGA TCGATGGGAT
301 GTCACGCAGA ATTCATTGCT CGGGCTGTAT GATTGGAATA CACAAAATAC ACAAGTACAG
361 TCCTATCTGA AACGTTTCTT AGAAAGAGCA TTGAATGATG GGCAGACGG ATTTTCGCTAT
421 GATGCCGCCA AGCATATAGA GCTTCCCGAT GATGGGAATT ACGGCAGCCA ATTTTGGCCG
481 AATATCACGA ATACATCTGC CGAGTTCCAA TACGGAGAAA TCCTGCAAGA CAGTGCCCTC
541 AGAGATGCAG CATATGCGAA TTATATGAAT GTGACAGCAT CTA ACTATGG ACATTCCATA
601 AGGTCCGCTT TAAAGAATCG TAATCTGAGC GTGTCGAATA TTTCCCATTA TGCATCTGAT
661 GTGTCAGCCG ACAAGTTAGT CACGTGGGTG GAATCGCATG ATACGTATGC AAATGATGAT
721 GAGGAGTCTA CATGGATGAG CGATGACGAT ATCCGCTTAG GCTGGGCAGT GATTGCTTCT
781 CGCTCAGGCA GTACGCCTCT CTTTTTTTCA AGGCCTGAGG GCGGCGGAAA TGGTGTGAGA
841 TTCCCGGGGA AAACCCAAAT AGGCGATCGC GGGAGTGCTT TATTTG

```

Şekil 4.6. *B. subtilis* BK07 suşuna ait amilaz geninin orta bölgelerinde PCR yoluyla çoğaltılan AmyEF/R bölgesine ait bazı özellikler ve nükleotid dizisi

PY22-AmyEF/R

Uzunluk: 886 bç

Bileşim: 261 A (%29.5); 176 C (%19.9); 228 G (%25.7); 221 T (%24.9)

Molekül ağırlığı (kDa): ssDNA (tek iplikçik): 274.75 dsDNA: 546.18

ORIJIN

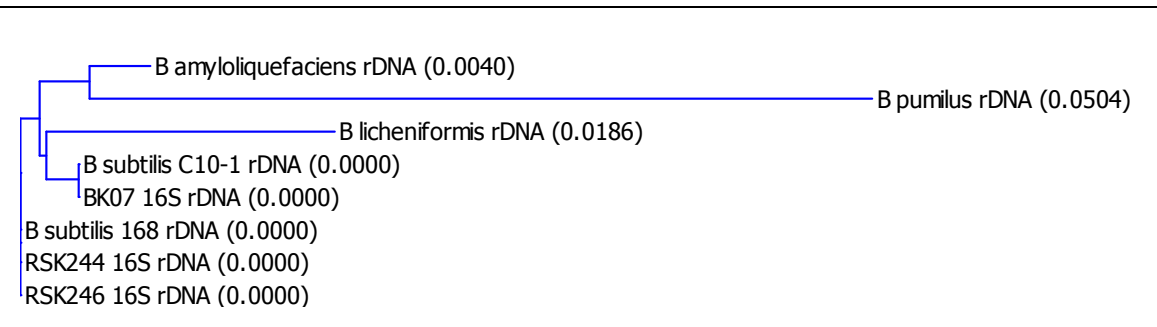
```

1   GCCATTCAGA CATCTCCGAT TAACCAAGTA AAGGAAGGGA ATCAAGGAGA TAAAAGCATG
61  TCGAACTGGT ACTGGCTGTA TCAGCCGACA TCGTATCAAA TTGGCAACCG TTACTTAGGT
121 ACTGAACAAG AATTTAAAGA AATGTGTGCA GCCGCTGAAG AATATGGCAT AAAGGTCATT
181 GTTGACGCGG TCATCAATCA TACCACCAGT GATTATGCCG CGATTTCCAA TGAGGTTAAG
241 AGTATTCCAA ACTGGACACA TGGAAACACA CAAATTAAAA ACTGGTCTGA TCGATGGGAT
301 GTCACGCAGA ATTCATTGCT CGGGCTGTAT GACTGGAATA CACAAAATAC ACAAGTACAG
361 TCCTATCTGA AACGGTTCTT AGACAGGGCA TTGAATGACG GGCAGACGG TTTTCGATTT
421 GATGCCGCCA AACATATAGA GCTTCCAGAT GATGGCAGTT ACGGCAGTCA ATTTTGCCCG
481 AATATCACAA ATACATCTGC AGAGTTCCAA TACGGAGAAA TCCTGCAGGA TAGTGCCTCC
541 AGAGATGCTG CATATGCGAA TTATATGGAT GTGACAGCGT CTAACATATG GCATTCCATA
601 AGGTCCGCTT TAAAGAATCG TAATCTGGGC GTGTCGAATA TCTCCCACTA TGCATCTGAT
661 GTGTCTGCGG ACAAGCTAGT GACATGGGTA GAGTCGCATG ATACGTATGC CAATGATGAT
721 GAAGAGTCGA CATGGATGAG CGATGATGAT ATCCGTTTAG GCTGGGCGGT GATAGCTTCT
781 CGTTCAGGCA GTACGCCTCT TTTCTTTTCC AGACCTGAGG GAGGCGGAAA TGGTGTGAGG
841 TTCCCGGGGA AAAGCCAAAT AGGCGATCGC GGGAGTGCTT TATTTG

```

Şekil 4.7. *B. subtilis* PY22 suşuna ait amilaz geninin orta bölgelerinde PCR yoluyla çoğaltılan AmyEF/R bölgesine ait bazı özellikler ve nükleotid dizisi

Çeşitli *Bacillus* türü bakterilerin 16S rDNA bölgelerine ait nükleotid dizilimleri kıyaslanarak bakteri türlerinin birbirlerine olan genetik uzaklıkları filogenetik ağaç şeklinde gösterilmiştir (Şekil 4.8). Bu incelemede kullanılan *B. subtilis* RSK244 ve *B. subtilis* RSK246 suşlarına ait dizileri araştırmanın başlaması öncesinde özel bir laboratuvar (Accugenix, DE, ABD) aracılığıyla elde edilen 16S rDNA dizileridir. Ayrıca bu yakınlık analizi Çizelge 4.2’de yüzdesel olarak karşılaştırılmıştır.



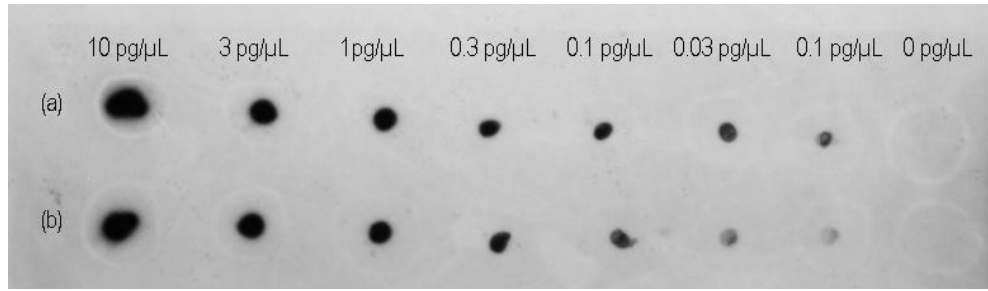
Şekil 4.8. Bakterilerin birbiri ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan bakteriyel suşların birbirlerine yakınlıklarının yüzdesel olarak karşılaştırması

	<i>B. pumilus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i> BK07	<i>B. subtilis</i> 168
<i>B. amyloliquefaciens</i>	94	97	99	99
<i>B. pumilus</i>		93	94	94
<i>B. licheniformis</i>			98	98
<i>B. subtilis</i> BK07				100

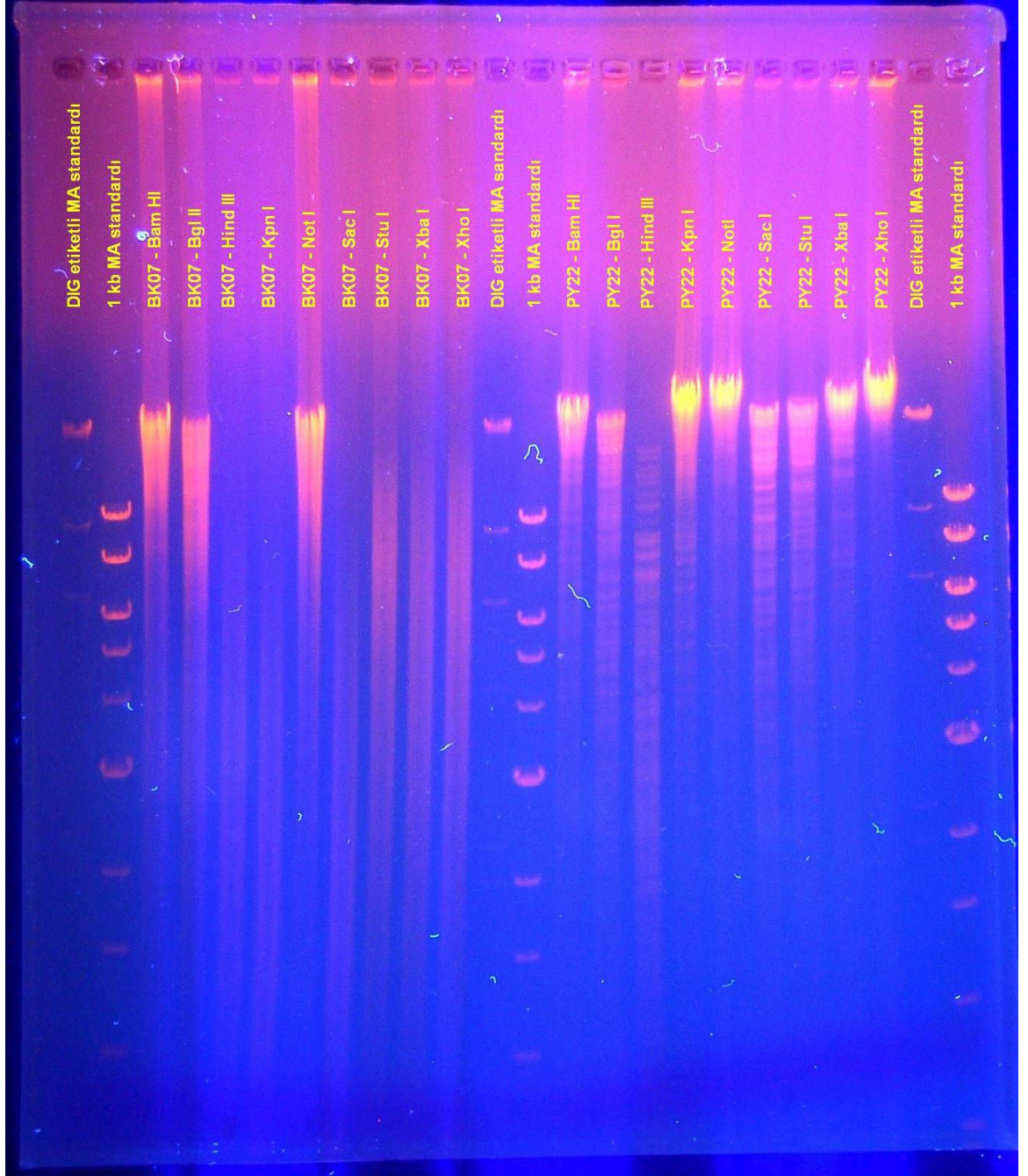
4.3.3. DIG Etiketli probun kontrolü ve Southern emdirim denemesi

Yapılan çalışma verimliliği analizi AmyEF/R parçası ile oluşturulan DIG etiketli probun oldukça iyi çalıştığını göstermiştir (Şekil 4.9).

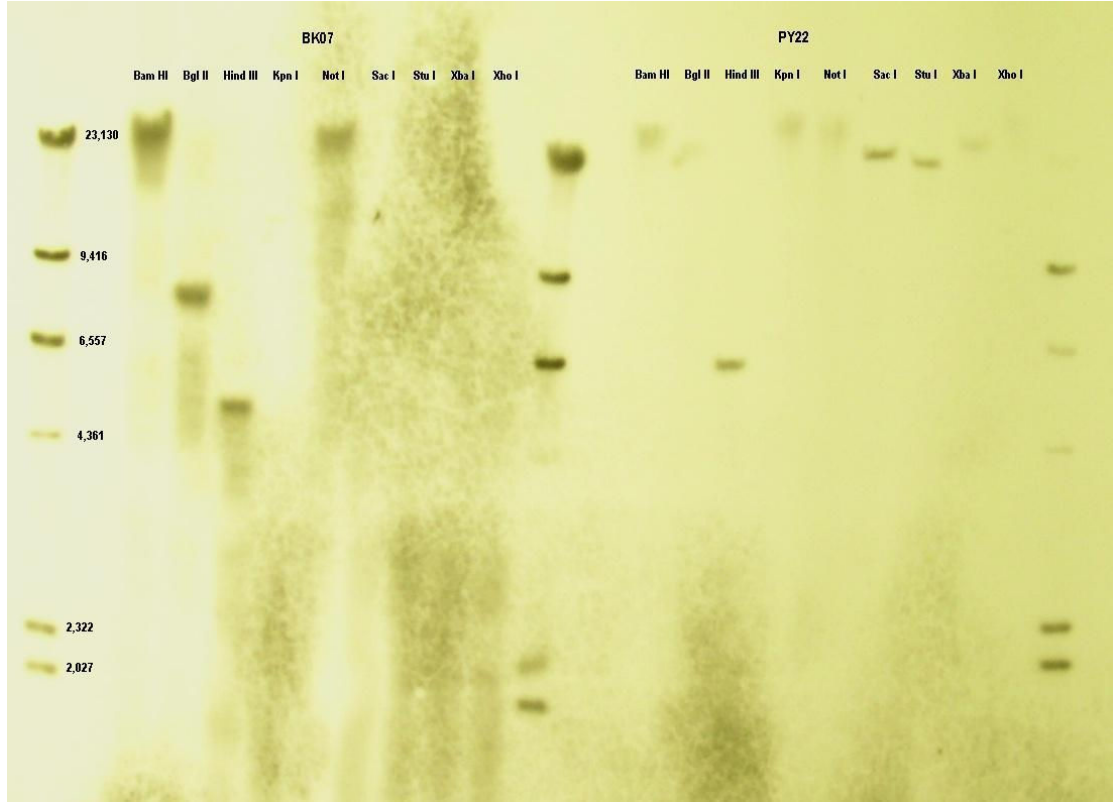


Şekil 4.9. DIG etiketli AmyEF/R probunun verimlilik testi (a) DIG etiketli AmyE/F probu (b) standart DIG probu

AmyEF/R bölgesini içeren ve amyE genini içerecek bir parçayı dışarıdan keserek ayırmamızı sağlayacak enzimin tespiti için yürütülen jel (Şekil 4.10) Southern emdirim yöntemi ile bu prob kullanılarak etiketlenmiştir. Hibridizasyon sonrasında elde edilen filminden (Şekil 4.11) *B. subtilis* BK07 kromozomunda *Hind*III enziminin 4.5-5.5 kbç büyüklüğünde bir parçada kesilebildiği görülmüştür.



Şekil 4.10. Southern emdirim analizinde kullanılmak üzere, çeşitli restriksiyon endonükleazları ile parçalanmış *B. subtilis* BK07 ve *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'larının yürütüldüğü agaroz jeli görüntüsü



Şekil 4.11. *B. subtilis* BK07 ve *B. subtilis* PY22 kromozom DNA'larının çeşitli restriksiyon endonükleazları ile parçalanarak gerçekleştirildiği Southern emdirimi - DIG etiketleme sonucu

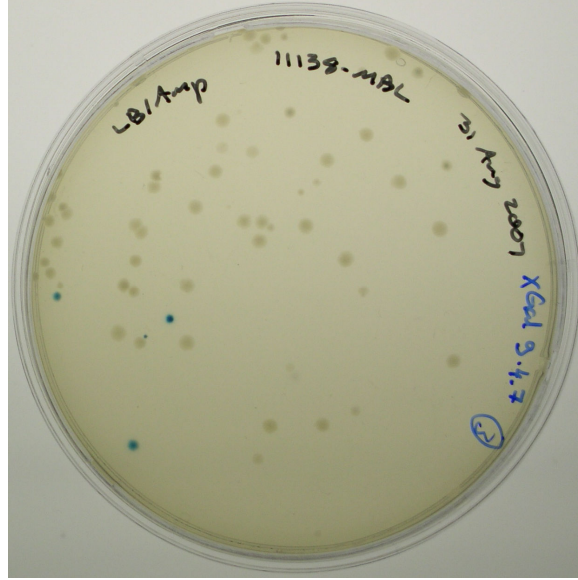
4.3.4. *Bacillus subtilis* BK07 α -amilaz genini klonlama çalışmaları

B. subtilis BK07'e ait amilaz genini kodlayan genetik dizinin belirlenebilmesi amacıyla koloni hibridizasyon tekniği denenmiştir, ancak bu uygulamalardan beklenen sonuçların elde edilememesi üzerine aşamalı olarak PCR yoluyla gen amplifikasyonu, kromozom yürüyüşü ve ters PCR gibi teknikler uygulanmıştır.

4.3.4.1. Koloni hibridizasyon tekniği

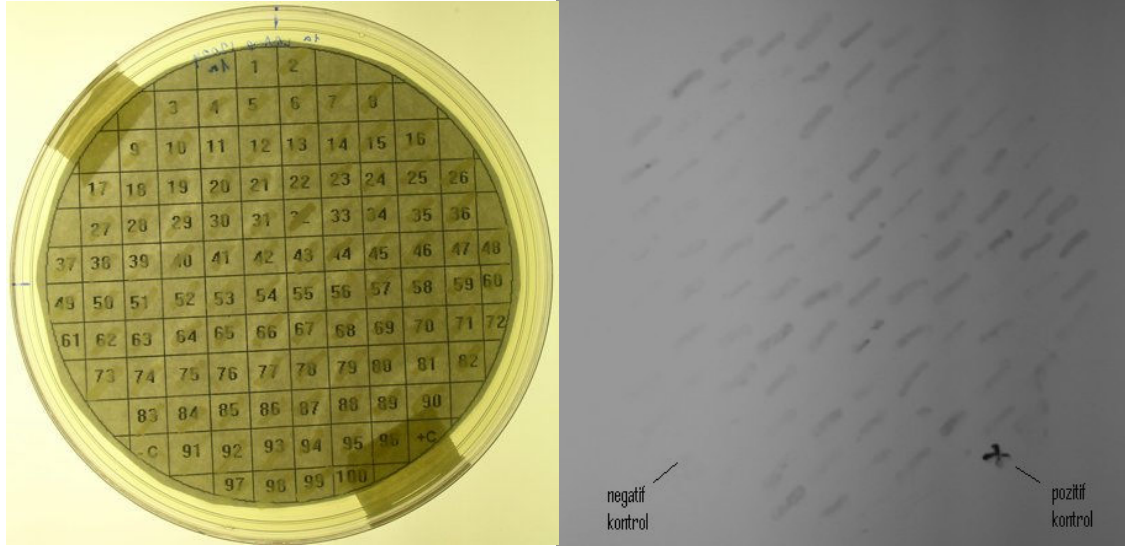
B. subtilis BK07 kromozom DNA'sı *Hind*III enzimi ile kesilerek 4.5-5.5 kb aralığındaki parçalar jel ekstraksiyonu ile izole edilmiştir. Elde edilen fragmanlar, kesilmiş fosforile edilmiş ve saflaştırılmış pUC19 vektörüne bağlanarak (ligasyon) *E.*

coli (NEB Turbo) hücrelerine transforme edilmiştir. Şekil 4.12’de elde edilen çok sayıda transformasyon petrisine bir örnek görülebilmektedir.



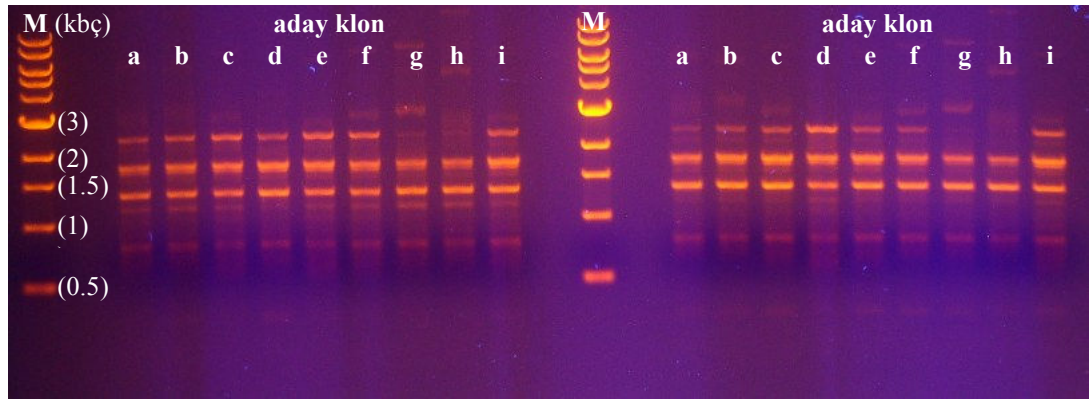
Şekil 4.12. Mavi-beyaz koloni oluşumu ile ligasyon transformasyon verimliliğinin gözlenebildiği plakalardan bir örnek

Beyaz koloniler genetik kütüphanenin oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen yaklaşık 2000 klon çizgi ekimle petri plakalarına ikiyeşerli olarak, (+) ve (-) kontrol hücreleri ile birlikte aktarılmıştır. Şekil 4.13’de oluşturulan çizgi ekim plakalarına bir örnek ile birlikte, bu plakalardan koloni hibridizasyonu ile elde edilen film görüntüsüne bir örnek görülebilir. Elde edilen filimlerin tamamında *B. subtilis* BK07 (+) kontrolün (DIG işaretli antikor bağlanması sonucu) beklenebileceği üzere koyu renkli, (-) kontrolün ise berrak olduğu görülmüştür. Ancak (+) kontrol örneğine yakın düzeyde koyu renk veren bir klona denemelerden hiçbirinde rastlanamamıştır.

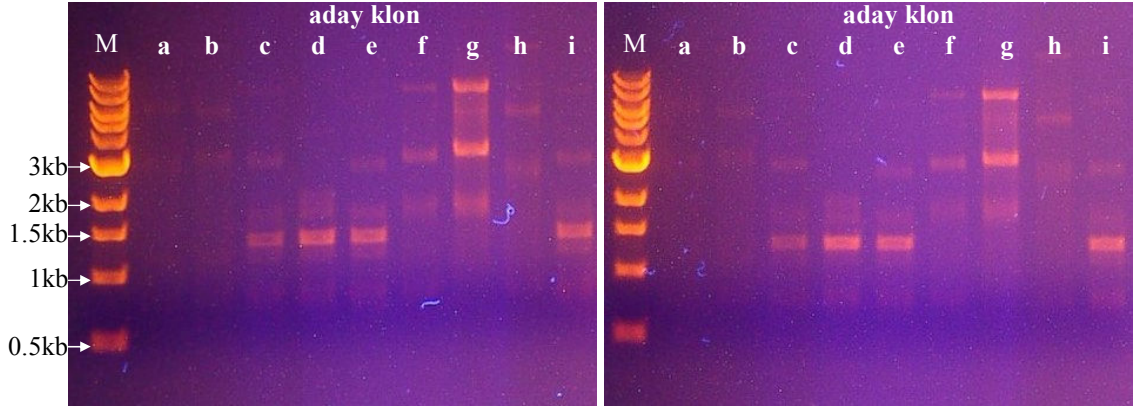


Şekil 4.13. Transformasyon sonrası amyE probeu kullanılarak yapılan taramada elde edilen kolonilerin aktarıldığı çizgi ekim plakası ve aynı plakadan elde edilen koloni hibridizasyon filmi görüntüsü

Buna rağmen, göreceli olarak koyu görüntü verdiği sayılabilecek dokuz klonda plazmid izolasyonu gerçekleştirilerek AmyEF/R primerlerinin kullanıldığı PCR doğrulaması yapılmıştır. Bu PCR denemesi için yürütülen jelde 900 bç civarında bant gözlenmemesi ve spesifik olmayan pek çok bantın varlığı olumsuz sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.14). Daha sonra, plazmid izolatları ve AmyEF-AmyER primer çifti ile tekrar edilen PCR denemesi de olumlu sonuçlanmamıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. Kütüphane plakalarından belirlenen 9 adet klonun AmyEF/R fragmanının varlığı için PCR denemesi sonucu. İkili tüplerde gerçekleştirilen denemede beklenen ~900 bç'lik bant gözlenememiştir.



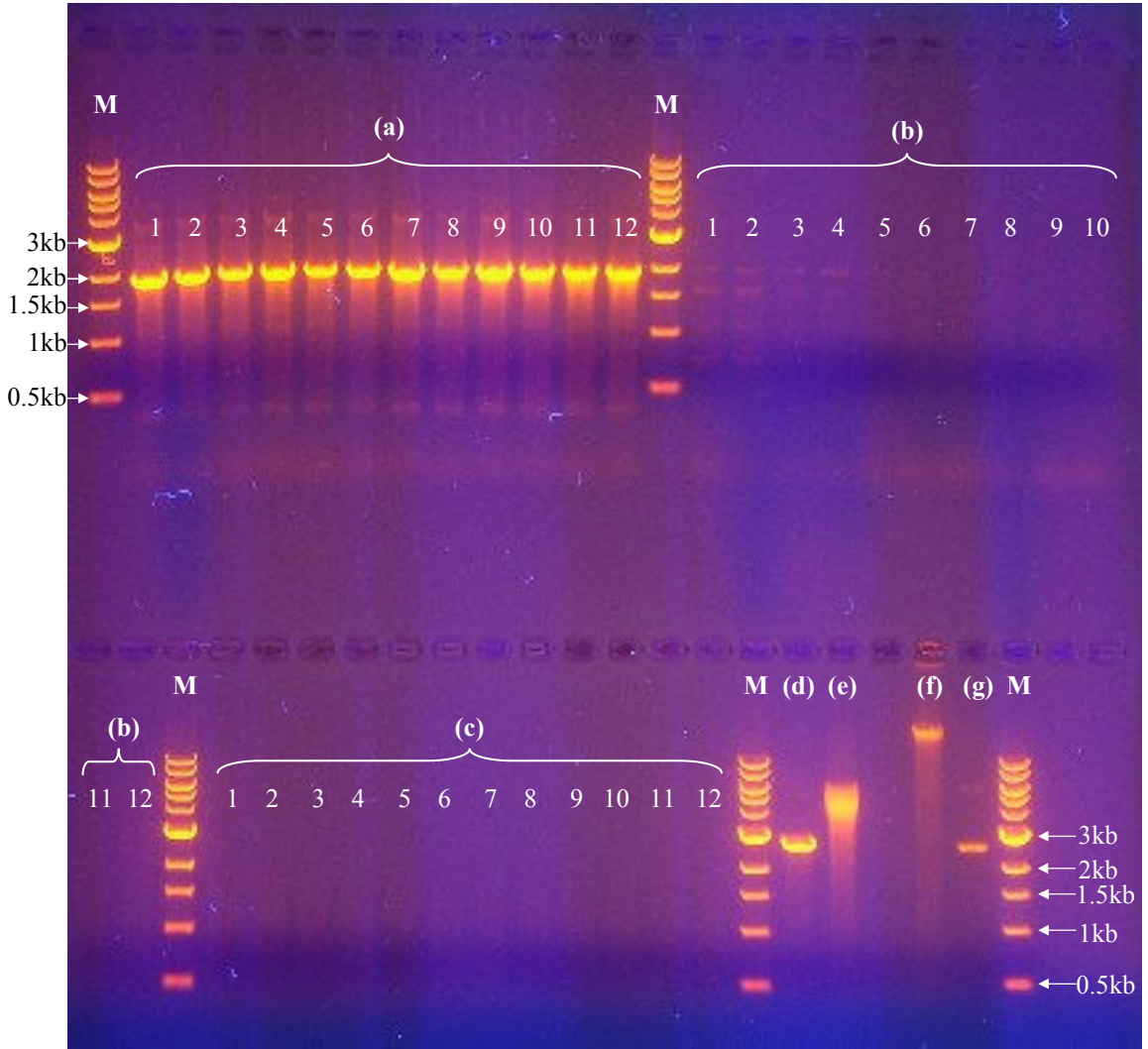
Şekil 4.15. Kütüphane plakalarından belirlenen 9 adet klonun AmyEF/R fragmanının varlığı için PCR denemesi sonucu. İkili tüplerde gerçekleştirilen denemede beklenen ~900 bp'lik bant gözlenememiştir.

Koloni hibridizasyon tekniği kullanılarak 3 ligaston-transformasyon denemesinden elde edilen yaklaşık 2000 koloni AmyE/F probu ile taranmıştır. Başarılı sonuç elde edilememesine muhtemel bir sebep olarak *B. subtilis* BK07'nin amilaz geni dolaylarında bulunan dizilimlerin *E. coli*'de toksik etki göstermesi olabileceği düşünülmüştür. Emori vd (1990) ve Yang vd (1983) yaptıkları *B. subtilis* amilazını *E. coli*'de klonlama çalışmalarında, klonlama sonuçlarının beklenenden çok daha düşük oranda veya tamamen olumsuz gerçekleşmesini geninin 5' ucunun veya amilaz geninin yukarı bölgelerinin *E. coli*'de ölümcül etki gösterebilmesine bağlamışlardır.

4.3.4.2. PCR yoluyla gen amplifikasyon denemeleri

Kalıp DNA olarak *B. subtilis* PY22 ve *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'sı ve *Hind*III ile kesilmiş ve saflaştırılmış 4.5-5.5 kbç parçaları içeren *B. subtilis* BK07 DNA'sı kullanılarak amilaz geninin PCR ile amplifikasyonu denenmiştir. Bunun için AmyFATG ve AmyRSTOP primer çifti kullanılmış ve PCR tepkimeleri 40-60 °C'lik aralığı kapsayan 12'şer adet tüp içinde gerçekleştirilmiştir. PCR tepkimesinin sonucu tüplerden agaroz jele 5'er µL yüklenerek görüntülenmiştir (Şekil 4.16). Bu jel görüntüsünden PCR ile bütün haliyle amilaz geninin amplifikasyonunun *B. subtilis* PY22 için bütün tüplerde iyi seviyede gerçekleştiği görülmüş. *B. subtilis* BK07

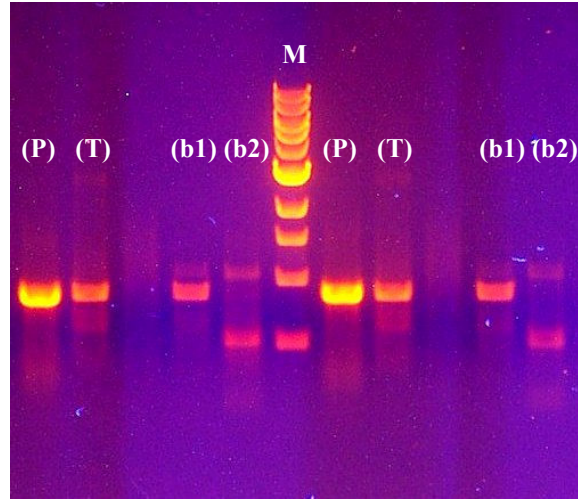
kromozom DNA'sı kalıbı kullanıldığında ise ancak ilk iki tüpte (BK07-b1 ve BK07-b2) zayıf bantlar gözlenmiştir.



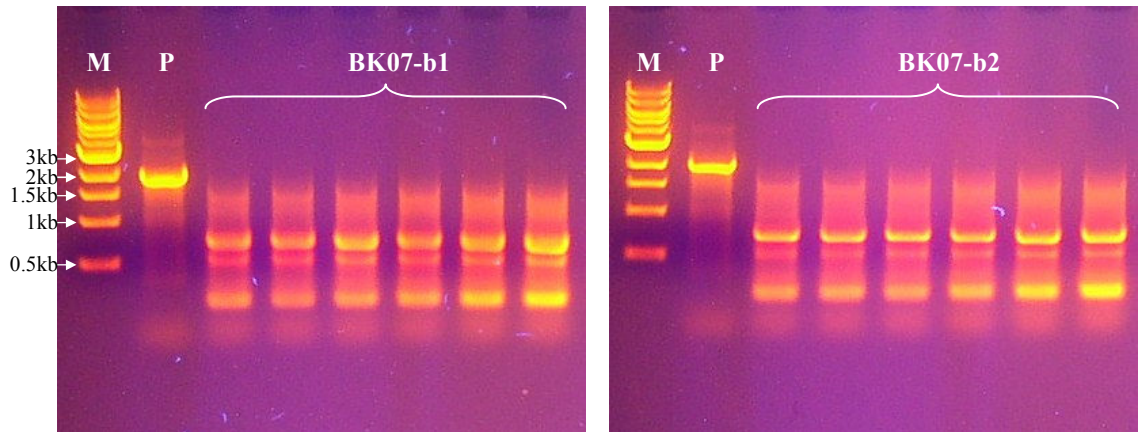
Şekil 4.16. AmyFATG ve AmyRSTOP primer çifti ile PCR denemesi. Her bir PCR karışımının 12 tüpte gerçekleştirildiği denemede (a) *B. subtilis* PY22 ve (b) *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'sı ve (c) *Hind*III ile kesilmiş ve saflaştırılmış 4.5-5.5 kbç parçaları içeren *B. subtilis* BK07 DNA'sı kalıp olarak kullanılmıştır. Jelde bulunan diğer kulvarlara sırasıyla (d) lineer Puc19 vektörü (e) *Hind*III ile kesilmiş ve saflaştırılmış 4.5-5.5 kbç parçaları (f) *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'sı (g) Topo II Blunt – AmyEF/R vektör plazmidi ve M, 1 kbç MA standardı yüklenmiştir.

PCR denemesi sonucu BK07-b1 ve BK07-b2 tüplerinde iz miktarlarda da olsa amilaz geninin çoğaltılmış olması ihtimali göz önüne alınarak AmyEF-AmyER primer

çifti ile bu PCR ürünlerinin kalıp olarak kullanıldığı bir PCR denemesinin sonuçları da Şekil 4.17’de görülebilmektedir. Bu denemede (b1) ile ifade edilen tüpte AmyEF/R fragmanının amplifikasyonunun gerçekleştiği düşünülerek, aynı kalıp ile bütün gen primerlerinin kullanıldığı bir PCR denemesi daha gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.18’de bu denemeye ait agaroz jel elektroforezi görüntüsünden denemenin başarılı olamadığı görülmüştür.



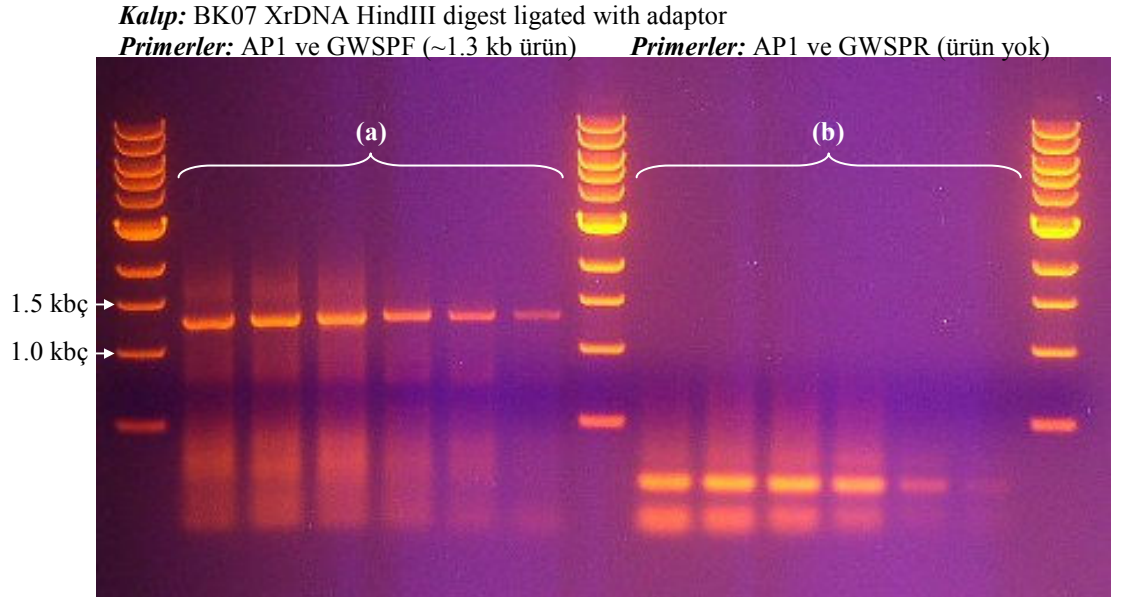
Şekil 4.17. AmyEF-AmyER primer çifti ile PCR denemesi. Her bir PCR karışımının 2 tüpte gerçekleştirildiği denemede (P) *B. subtilis* PY22 ve (T) TopoII Blunt-AmyEF/R vektör plazmidi (b1,b2) AmyFATG-AmyRSTOP primer çifti ve *B. subtilis* BK07 kromozom DNA’sı kalıbı ile elde edilen PCR ürünlerinin (BK07-b1 ve BK07-b2) kalıp olarak kullanıldığı tepkimeler



Şekil 4.18. Bütün almaz geninin amplifikasyonu için PCR denemesi. Burada kalıp DNA olarak BK07-b1 ve BK07-b2, primer çifti olarak da AmyFATG ve AmyRSTOP kullanılmıştır. M; 1 kb’lık MA standardı, P; Şekil 5.14 (a)’da görülen çoğaltılmış *B. subtilis* PY22 bütün amilaz geni

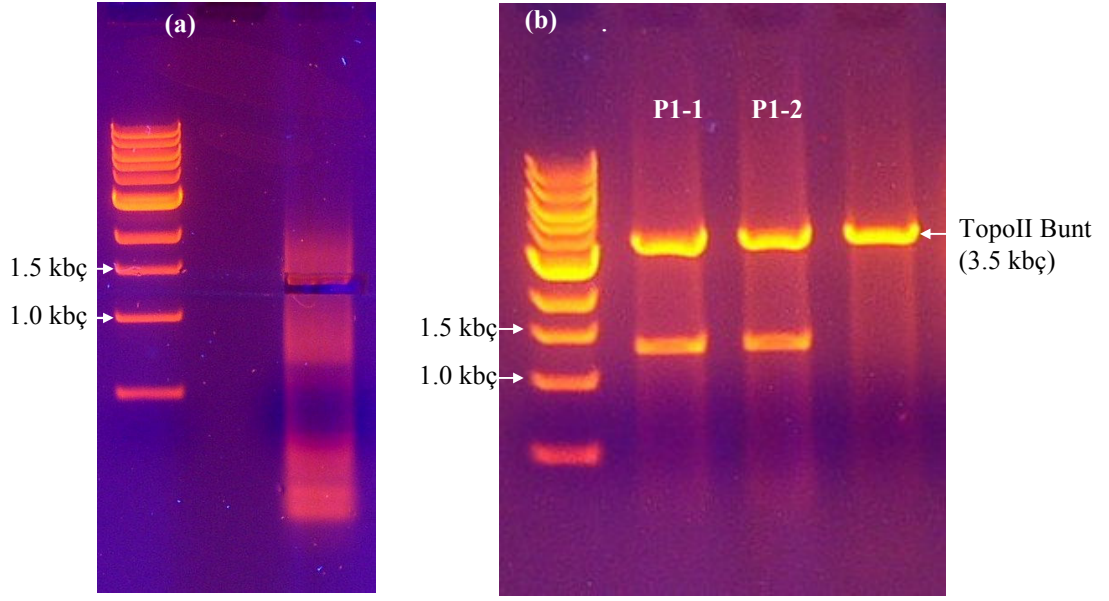
4.3.4.3. Kromozom yürüyüşü (chromosome walking) uygulaması

*Hind*III ile kesilmiş 4.5-5.5 kbç büyüklüğünde *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'sının uçlarına ligasyon yoluyla adaptör parçaları bağlanarak kalıp olarak kromozom yürüyüşü için özel tasarlanan GWSPF ve GWSPR primerleri ile adaptör ucundan bağlanarak çalışan AP1 primeri kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Bu PCR denemesi sonucu tüp içeriklerinden yürütülen 5'er µL'lik örnekler Şekil 4.19'daki görüntüyü vermiştir. Buradan GWSPF-AP1 primer çifti kullanıldığında 1.0-1.5 kbç büyüklüğünde bir bandın oluştuğu görülmüştür.



Şekil 4.19. Kromozom yürüyüşü için gerçekleştirilen PCR denemesi sonrasında yürütülen agaroz jelinin görüntüsü. Kalıp olarak adaptör ilaveli *Hind*III ile kesilmiş 4.5-5.5 kbç büyüklüğünde *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'sı, primer çiftleri olarak da (a) GWSPF ve AP1 ve (b) GWSPR ve AP1 kullanılmıştır.

GWSPF ve AP1 primerleri ile elde edilen yaklaşık 1.3 kbç büyüklüğündeki bant 6 PCR tüpü içerikleri birleştirilip jelde yürütülmüş (Şekil 4.20a) ve jelden ayrıştırılarak izole edilmiştir. Topo II Blunt vektörüne ligasyonla bağlanan küt uçlu fragmanlar *E. coli* NEB Turbo hücrelerine kimyasal olarak transforme edilerek elde edilen klonlardan izole edilen plazmidler *Eco*RI ile kesilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.20b). Bu klonlar ile P1-1 ve P1-2 plazmidleri çoğaltılmıştır.



Şekil 4.20. Kromozom yürüyüşü için tasarlanan primerlerle elde edilen ~1.3 kb büyüklüğünde PCR ürünü için (a) yürütülen ve parçanın alındığı agaroz jeli ve (b) TopoII Blunt vektörü ile klonlanarak elde edilen 3 transformantın plazmid izolatlarının *Eco*RI ile kesilerek yürütülmüş jel görüntüleri

Çoğaltılan plazmidlerden dizi analizine gönderilen iki örnekte (P1-1 ve P1-2) de vektöre ligasyonla bağlanmış parçanın amilaz geninin 3' ucunda, stop kodonunu da kapsayan 411 bç'lik dizi vektöre uygun olarak seçilen SP6 dizi analizi primeri kullanılarak belirlenmiştir. Aynı dizi analizinde M13 dizi primeri ile AmyEF/R fragmanının orta bölgesinde başlayan 606 bç'lik dizi belirlenmiştir.

B. subtilis BK07 suşuna ait amyE geni için belirlenebilen nükleotid dizileri ve bu bölgelerin kodladığı aminoasit dizileri Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de verilmiştir. Şekil 4.22'de uygun açık okuma penceresinin seçimi diğer *B. subtilis* amilazları ile karşılaştırılarak homoloji uygunluğu gösteren pencerenin seçimi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu okuma penceresi aynı zamanda elde edilen 3 okuma penceresi içinde stop kodonu içermeyen tek okuma penceresi olmuştur. Kodon/amino asit tercümesini gösteren tablo Ek 6'da verilmiştir.

B. subtilis BK07 amyE geninin orta bölümünde belirlenen dizi ve tercümesi (1-1089; Toplam aminoasit sayısı: 363; Protein MA=40087 Da

```

1      GCCATTTCAGACATCTCCTATTAATCAAGTAAAGGAAGGAAATAATGGAGATAAAAAGCATG
1      A I Q T S P I N Q V K E G N N G D K S M

61     GGGAACTGGTACTGGCTTTACCAGCCGACCTCTTACCAGATTGGCAACAGGTACCTGGGT
21     G N W Y W L Y Q P T S Y Q I G N R Y L G

121    TCCGAGGAAGAGTTTAAAGAAATGTGTGCCGCGGCTGAAGAATATGGTGTGAAGTTATT
41     S E E E F K E M C A A A E E Y G V K V I

181    GTCGATGCCGTCATCAATCACACAACCAGTGACTATGCTGCGATTTCAAATGAAATTAAA
61     V D A V I N H T T S D Y A A I S N E I K

241    AGTATATCAAATTGGACGCATGGAAACACACAAATTAAAAACTGGTCCGATCGATGGGAT
81     S I S N W T H G N T Q I K N W S D R W D

301    GTCACGCAGAATTCATTGCTCGGGCTGTATGATTGGAATACACAAAATACACAAGTACAG
101    V T Q N S L L G L Y D W N T Q N T Q V Q

361    TCCTATCTGAAACGTTTCTTAGAAAGAGCATTGAATGATGGGGCAGACGGATTTCGCTAT
121    S Y L K R F L E R A L N D G A D G F R Y

421    GATGCCGCCAAGCATATAGAGCTTCCCGATGATGGGAATTACGGCAGCCAATTTTGGCCG
141    D A A K H I E L P D D G N Y G S Q F W P

481    AATATCACGAATACATCTGCCGAGTTCCAATACGGAGAAATCCTGCAAGACAGTGCCTCC
161    N I T N T S A E F Q Y G E I L Q D S A S

541    AGAGATGCAGCATATGCGAATTATATGAATGTGACAGCATCTAACTATGGACATTCCATA
181    R D A A Y A N Y M N V T A S N Y G H S I

601    AGGTCCGCTTTAAAGAATCGTAATCTGAGCGGTGTCGAATATTTCCCATATGCATCTGAT
201    R S A L K N R N L S V S N I S H Y A S D

661    GTGTCAGCCGACAAGTTAGTCACGTGGGTGGAATCGCATGATACGTATGCAAATGATGAT
221    V S A D K L V T W V E S H D T Y A N D D

721    GAGGAGTCTACATGGATGAGCGATGACGATATCCGCTTAGGCTGGGCAGTGATTGCTTCT
241    E E S T W M S D D D I R L G W A V I A S

781    CGCTCAGGCAGTACGCCTCTCTTTTTTTTCAAGGCCCTGAGGGCGGCGGAAATGGTGTGAGA
261    R S G S T P L F F S R P E G G G N G V R

841    TTCCCGGGGAAAACCCAAATAGGCGATCGCGGGAGTGCTTTATTTGAGGATCAGGCTATC
281    F P G K T Q I G D R G S A L F E D Q A I

901    GTTGCGGTCAATACGTTTCACAATGTAATGGCTGGACAGCCTGAGGAGCTATCGAATCCG
301    V A V N T F H N V M A G Q P E E L S N P

961    AATGGAAACAATCAAATATTTATGAATCAGCGCGGCTCAAAAGGTGTTGTGTTGGCAAAT
321    N G N N Q I F M N Q R G S K G V V L A N

1021   GCAGGTTCTCTTCTGTGTCAGCATCAATGCTTCAACGAAATTACCTGATGGCAGCTATGAT
341    A G S S S V S I N A S T K L P D G S Y D

1081   AATAAAGCC
361    N K A

```

Şekil 4.21. *B. subtilis* BK07 amyE geni orta bölgesinde belirlenen baz dizisi ve kodladığı aminoasit dizisi

B. subtilis BK07 amyE geninin 3' ucuna ait dizi ve tercümesi
(1-414) Toplam amino asit sayısı: 136, Protein MA=14525 Da

1	ATCGGAAAAGGAGACCCATTTGGCACAACATACGACATCACGTTAACAGGAACGAACAGT
1	I G K G D P F G T T Y D I T L T G T N S
61	GATGGTGTAACGAGGGCCCAAGAGTACAGCTTTGTAAAAAGAGACCCGTCTGCGGCCAAA
21	D G V T R A Q E Y S F V K R D P S A A K
121	ACAATTGGCTATCAAAATCCGAATCATTGGGGACATGTAAATGCTTATATCTATAAACAT
41	T I G Y Q N P N H W G H V N A Y I Y K H
181	GATGGAGGCCGGGCAATCGAATTGACCGGGTCTTGGCCAGGTAAAGCAATGACTAAGAAT
61	D G G R A I E L T G S W P G K A M T K N
241	GCAGATGGAATTTACACACTGACGCTGCCGGCGGATACGGATACAACCAACGCCAAAGTG
81	A D G I Y T L T L P A D T D T T N A K V
301	ATTTTAAATAATGGCAGTGCCCAAGTGCCCGGCCAGAATCAGCCTGGCTTTGATTATGTG
101	I F N N G S A Q V P G Q N Q P G F D Y V
361	CAAAATGGTTTATATAACAACCTCTGGATTAAGCGGTTCTCTTCCTCAGTGA
121	Q N G L Y N N S G L S G S L P Q *

Şekil 4.22. *B. subtilis* BK07 amyE 3'- uç bölgesi için belirlenen baz ve kodladığı aminoasit dizisi.

B. subtilis BK07 α -amilaz genine ait belirlenebilen diziler Şekil 4.23'de şematik olarak gösterilmiştir.



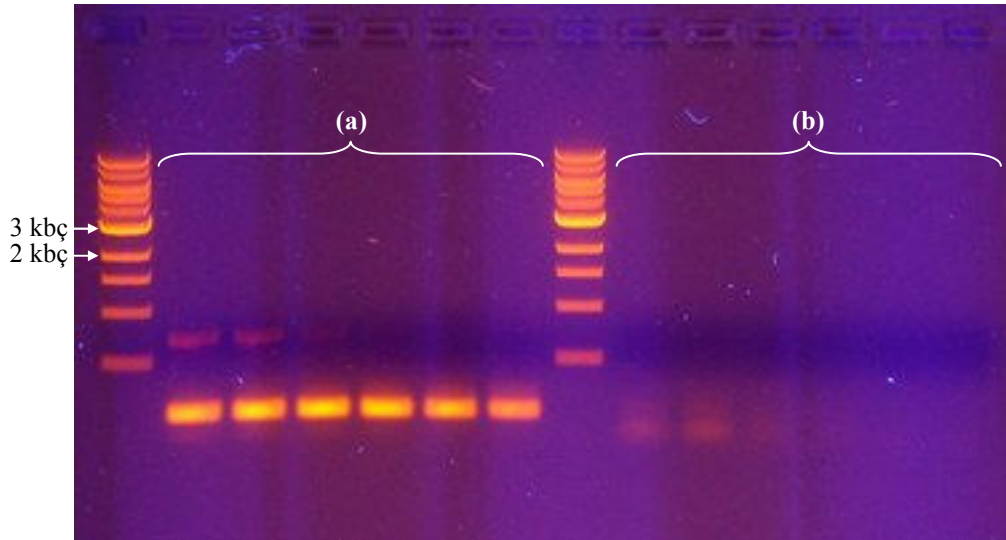
Şekil 4.23. *B. subtilis* BK07 suşuna ait amilaz genine ait belirlenen nükleotid dizisinin *B. subtilis* 168 suşuna ait amilaz geni dizisi ile eşleştirilmesinin şematik gösterimi

Bu şekilde, araştırılan genin yaklaşık %75'lik bir bölümünün dizisi belirlenmiştir. İlerleyen bölümlerde *B. subtilis* BK07 suşunun diğer amilazlarla olan homolojisi gösterilmiştir (Şekil 4.31).

4.3.4.4. Ters (inverse) PCR denemesi

Kromozom yürüyüşü tekniğinin kullanımıyla da genin 5'-ucu diziliminin belirlenmesi mümkün olamadığı için son bir uygulama olarak uygun tasarlanan primerlerle ters PCR yöntemi uygulanmıştır.

Ters PCR ile uyumlu *Hind*III ile kesilmiş uçlardan kendi kendine halka şeklini almış 4.5 – 5.5 kbç büyüklüğünde kalıplar kullanılmış olup, PCR sonrasında elde edilecek bantların da bu aralıkta olması beklenmiştir. Ancak, her iki ters PCR primer çifti ile gerçekleştirilen PCR denemesi sonrasında yürütülen jelde bu aralıkta herhangi bir bant gözlenmemiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Ters PCR denemesi için gerçekleştirilen, kalıp olarak adaptör ilaveli kendi üzerine bağlanmış olan *Hind*III ile kesilmiş 4.5-5.5 kbç büyüklüğünde *B. subtilis* BK07 kromozom DNA'sı, primer çiftleri olarak da (a) INVF1 ile INVR1 ve (b) INVF2 ile INVR2'nin kullanıldığı PCR denemesi için yürütülen agaroz jeli görüntüsü

Uygulanan farklı deneme stratejilerine rağmen, *B. subtilis* BK07 suşunda amilaz enzimini kodlayan genin 5'-ucunun dizilimi belirlenmemiştir.

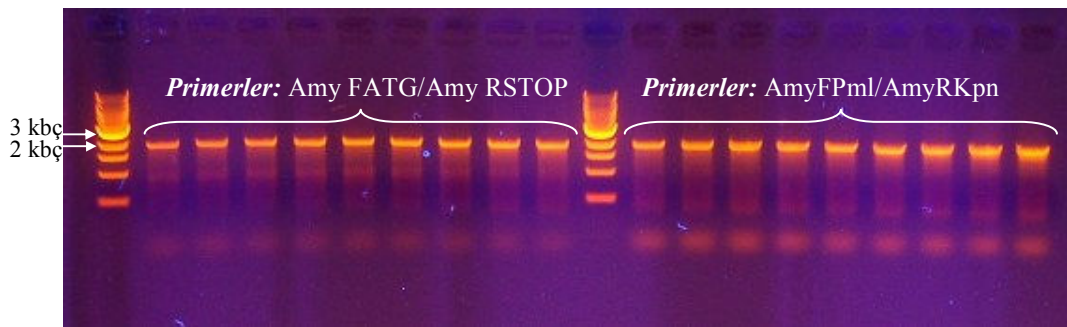
Elde edilen dizi verileri kullanılarak tasarlanacak primer çiftleri yardımıyla α -amilaz geninin 3'-ucu dahil %90'ını kapsayan kesintisiz bir bölgenin PCR yoluyla çoğaltılması mümkündür. Böylesi bir PCR ürünü elde edildiği takdirde, ileride yapılacak klonlama çalışmalarında aktivite varlığı araştırılabileceği gibi bu fragman kimerik enzim (füzyon proteini) çalışmalarında da değerlendirilebilecektir.

4.3.5. *Bacillus subtilis* PY22 α -amilaz geninin klonlanması

Çalışmanın ilerleyen bölümlerinde gerçekleştirilen α -amilaz klonlama çalışmalarında gen kaynağı organizma olarak *B. subtilis* PY22 kullanılmıştır.

4.3.5.1. *Bacillus subtilis* PY22 α -amilaz geninin PCR yoluyla amplifikasyonu

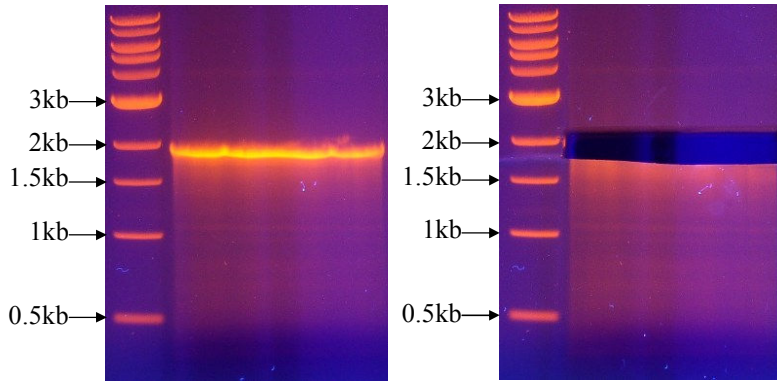
B. subtilis PY22 kromozom ekstraktı kalıp olarak kullanan ve hem AmyFATG-AmyRSTOP hem de AmyFPml-AmyRKpn primer çiftleriyle gerçekleştirilen PCR denemesinde tepkimenin bütün tüplerde gerçekleştiği, kontrol için tüpten alınan örneklerin agaroz jelde yürütülmesiyle anlaşılmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *B. subtilis* PY22 amilaz geninin PCR yoluyla çoğaltıldığı deneme sonrasında yürütülen agaroz jelde beklendiği gibi 2 kb civarında görülen temel bantlar

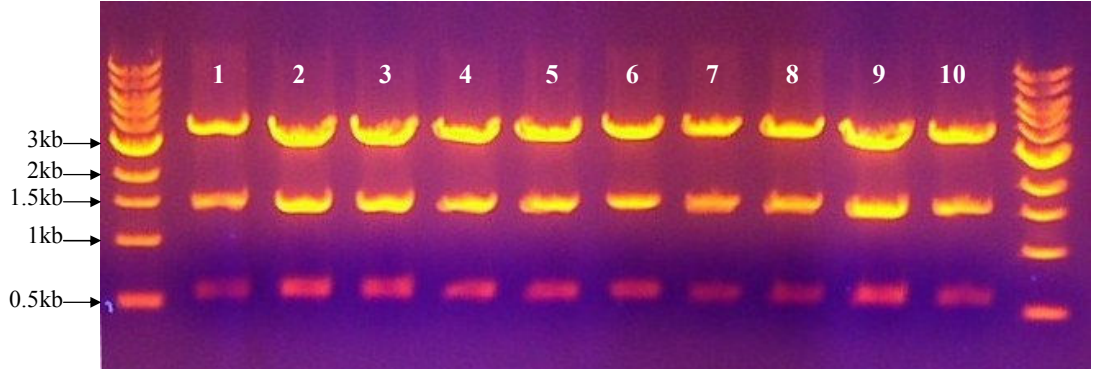
4.3.5.2. PCR yoluyla çoğaltılan *Bacillus subtilis* PY22 α -amilaz geninin saflaştırılması ve klonlanması

AmyFPml ve AmyRKpn primer çiftiyle çoğaltılan *B. subtilis* PY22 amilaz geni kullanılan primerlerle genin 5'- ve 3'- ucuna sırasıyla *Pml*I ve *Kpn*I enzimlerinin kesebileceği diziler yerleştirildiği için klonlama çalışmalarında bu ampikon (PY22-AmyE) kullanılmıştır. Bu fragmanı içeren bütün PCR tüplerinin içerikleri birleştirilmiş ve jelde yürütülerek saflaştırılmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. *B. subtilis* PY22 amilazının AmyFPml ve AmyRKpn primerleri ile çoğaltıldığı parçanın (PY22-AmyE) saflaştırılması için yürütülen jelin görüntüsü (a) ve bu jelden 2 kbç büyüklüğündeki bant kesildikten sonraki görüntüsü

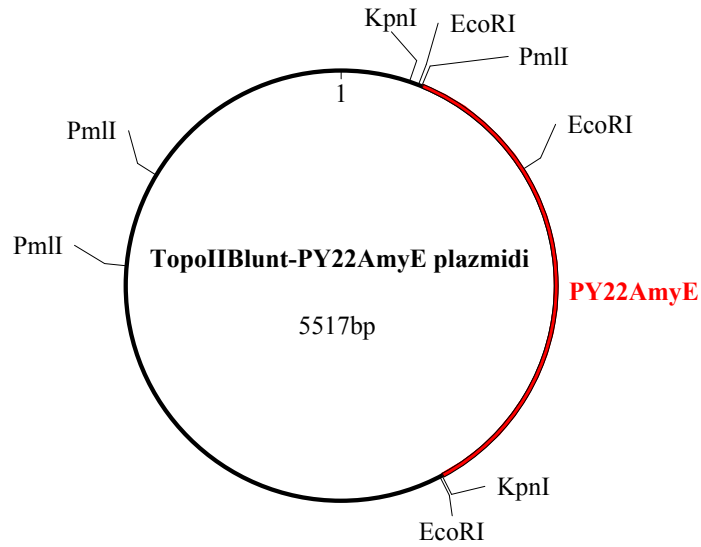
Jel eksraksiyonu işlemi ile saflaştırma işlemi tamamlanan PY22-AmyE fragmanı Blunt II Topo vektörüne ligasyonla bağlanarak *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir. Elde edilen transformasyon plakasından seçilen 10 adet klon sıvı ortamda geliştirilmiş, böylece vektör plazmidleri çoğaltılmıştır. İzole edilen plazmidler kontrol amaçlı olarak *Eco*RI enzimi ile kesilerek jelde yürütülmüştür (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. PY22AmyE fragmanını taşıdığı düşünülen plazmidlerin kontrolü için yürütülen agaroz jelinin görüntüsü

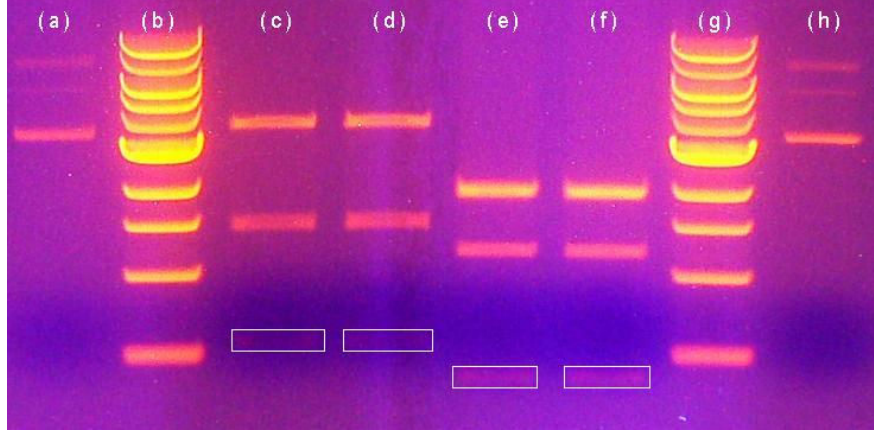
Bu jelde *EcoRI* enziminin 3 noktadan kestiği görülmüştür. Blunt II Topo vektörünün beklendiği gibi 3.5 kb'lık bant olarak gözlenmesi ve kalan 2 bandın da toplam büyüklüklerinin 2 kb civarında oluşu sebebiyle seçilen ve Şekil 4.27'de “2” ve “9” olarak işaretlenmiş vektör plazmidleri dizi analizine gönderilmiştir.

Blunt II Topo–PY22AmyE plazmidleri kısaca sırasıyla TopoPY2 ve TopoPY9 olarak isimlendirilmiştir. DNAMAN programı kullanılarak plazmidin halka şeması oluşturulmuş ve bu şemada kullanılan enzimlerin kesim yerleri işaretlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. PY22AmyE fragmanını taşıyan Blunt II Topo vektörü ve üzerindeki *EcoRI*, *PmlI* ve *KpnI* endonükleaz kesim yerleri

Dizi analizi için seçilen klonlardan elde edilen TopoPY2 ve TopoPY9 plazmidleri ayrıca *EcoRI* ve *PmlI* / *KpnI* endonükleaz enzimleriyle kesilerek jel deseni incelenmiştir (Şekil 4.29).

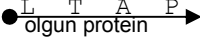


Şekil 4.29. TopoII Blunt PY22-AmyE plazmidinin endonükleaz enzimleriyle kesilmesi sonucu oluşan jel deseni. Kulvarlar: (a ve h) sırasıyla TopoPY2 ve TopoPY9 (5517 bp) halka plazmidleri (b ve g) 1 kb'lık molekül ağırlık standardı (c ve d) sırasıyla TopoPY2 ve TopoPY9'un *EcoRI* kesimleri (e ve f) sırasıyla TopoPY2 ve TopoPY9'un *PmlI* / *KpnI* kesimleri, mevcut olan ancak zor görünen bazı bantlar dikdörtgenlerle belirtilmiştir.

4.3.5.3. *Bacillus subtilis* PY22 amyE genine ait nükleotid dizisi

Dizi analizi özel olarak, *B. subtilis* 168 nükleotid dizisinden faydalanılarak ve 2 kb'lık amyE geninin tamamını kapsayacak şekilde tasarlanmış 4 çift dizi analiz primerleriyle ve Topo II Blunt-PY22AmyE plazmid (Şekil 4.28) kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu dizi analizinin sonucunda elde edilen diziler bir araya getirilerek *B. subtilis* PY22 amyE genini taşıyan ve iki ucuna *PmlI* ve *KpnI* kesim bölgelerinin eklendiği PY22-AmyE parçasının (PY22-PK) nükleotid dizisi belirlenmiştir. PY22-PK parçasının baz dizisi ve şifrelediği amino asit dizisi Şekil 4.30'da verilmiştir. TopoPY2 ve TopoPY9 plazmidleri ile elde edilen amyE dizileri birbirini doğrulamıştır.

Bacillus subtilis PY22 amyE DNA dizisi (toplam 1980 baz) ve kodladığı proteinin amino asit dizisi (açık okuma çerçevesi toplam 659 amino asit); AmyE molekül ağırlığı=72280 Da

1	ATGTTTGCAAAACGATTCAAAACCTCTTTACTGCCGTTATTTCGCTGGATTTTATTGCTG
1	M F A K R F K T S L L P L F A G F L L L
61	TTTCATTTGGTTCTGGCAGGACCGGCGGCTGCGAGTGCTGAAACGGCGAACAAATCGAAT
21	F H L V L A G P A A A S A E T A <u>N K S</u> N
121	GAGCTTACAGCACCGTCGATCAAAAGCGGAACCATTCCTTCATGCATGGAATTGGTCGTTTC
41	E <u>L T A P</u>  S I K S G T I L H A W <u>N W S</u> F
181	AATACGTTAAAACACAATATGAAGGATATTCATGATGCAGGATATACAGCCATTCAGACA
61	N T L K H N M K D I H D A G Y T A I Q T
241	TCTCCGATTAACCAAGTAAAGGAAGGGAATCAAGGAGATAAAAAGCATGTCGAACTGGTAC
81	S P I N Q V K E G N Q G D K S M S N W Y
301	TGGCTGTATCAGCCGACATCGTATCAAATTGGCAACCGTTACTTAGGTACTGAACAAGAA
101	W L Y Q P T S Y Q I G N R Y L G T E Q E
361	TTTAAAGAAATGTGTGCAGCCGCTGAAGAATATGGCATAAAGGTCATTGTTGACGCGGTC
121	F K E M C A A A E E Y G I K V I V D A V
421	ATCAATCATAACCACAGTGATTATGCCGCGATTTCCAATGAGGTAAAGAGTATTCCAAAC
141	I <u>N H T</u> T S D Y A A I S N E V K S I P <u>N</u>
481	TGGACACATGGAAACACACAAATTA AAAA ACTGGTCTGATCGATGGGATGTCACGCAGAAT
161	<u>W T</u> H G N T Q I K <u>N W S</u> D R W D V T Q N
541	TCATTGCTCGGGCTGTATGACTGGAATACACAAAATACACAAGTACAGTCCTATCTGAAA
181	S L L G L Y D W N T Q N T Q V Q S Y L K
601	CGGTTCTTAGACAGGGCATTGAATGACGGGGCAGACGGTTTTTCGATTTGATGCCGCCAAA
201	R F L D R A L N D G A D G F R F D A A K
661	CATATAGAGCTTCCAGATGATGGCAGTTACGGCAGTCAATTTTGGCCGAATATCACAAAT
221	H I E L P D D G S Y G S Q F W P <u>N I T N</u>
721	ACATCTGCAGAGTTCCAATACGGAGAAATCCTGCAGGATAGTGCCTCCAGAGATGCTGCA
241	<u>T S</u> A E F Q Y G E I L Q D S A S R D A A
781	TATGCGAATTATATGGATGTGACAGCGTCTAACTATGGGCATTCCATAAGGTCCGCTTTA
261	Y A N Y M D V T A S N Y G H S I R S A L
841	AAGAATCGTAATCTGGGCGTGTGCAATATCTCCCACTATGCATCTGATGTGTCTGCGGAC
281	K N R N L G V S <u>N I S</u> H Y A S D V S A D
901	AAGCTAGTGACATGGGTAGAGTCGCATGATACGTATGCCAATGATGATGAAGAGTCGACA
301	K L V T W V E S H D T Y A N D D E E S T

Şekil 4.30.* PY22-AmyE fragmanının nükleotid dizisi ve kodladığı amino asit dizisi. Amino asit dizisinde potansiyel N-glikozilasyon bölgeleri kalınlaştırılarak belirtilmiştir. (*devamı bir sonraki sayfadır)

961	TGGATGAGCGATGATGATATCCGTTTAGGCTGGGCGGTGATAGCTTCTCGTTCAGGCAGT
321	W M S D D D I R L G W A V I A S R S G S
1021	ACGCCTCTTTTCTTTTCCAGACCTGAGGGAGGCGGAAATGGTGTGAGGTTCCCGGGGAAA
341	T P L F F S R P E G G G N G V R F P G K
1081	AGCCAAATAGGCGATCGCGGGAGTGCTTTATTTGAAGATCAGGCTATCACTGCGGTCAAT
361	S Q I G D R G S A L F E D Q A I T A V N
1141	AGATTTACACAATGTGATGGCTGGACAGCCTGAGGAACTCTCGAACCCGAATGGAAACAAC
381	R F H N V M A G Q P E E L S N P N G N N
1201	CAGATATTTATGAATCAGCGCGGCTCACATGGCGTTGTGCTGGCAAATGCAGGTTTCATCC
401	Q I F M N Q R G S H G V V L A N A G S S
1261	TCTGTCTCTATCAATACGGCAACAAAATTGCCTGATGGCAGGTATGACAATAAAGCTGGA
421	S V S I N T A T K L P D G R Y D N K A G
1321	GCGGGTTCATTTCAAGTGAACGATGGTAAACTGACAGGCACGATCAATGCCAGGTCTGTA
441	A G S F Q V N D G K L T G T I N A R S V
1381	GCTGTGCTTTATCCTGATGATATTGCAAAAGCGCCTCATGTTTTCCTTGAGAATTACAAA
461	A V L Y P D D I A K A P H V F L E N Y K
1441	ACAGGTGTAACACATTCTTTCAATGATCAACTGACGATTACCTTGCGTGCAGATGCGAAT
481	T G V T H S F N D Q L T I T L R A D A <u>N</u>
1501	ACAACAAAAGCCGTTTATCAAATCAATAATGGACCAGAGACGGCGTTTAAGGATGGAGAT
501	<u>T T</u> K A V Y Q I N N G P E T A F K D G D
1561	CAATTCACAATCGGAAAAGGAGATCCATTTGGCAAAACATACACCATCATGTTAAAAGGA
521	Q F T I G K G D P F G K T Y T I M L K G
1621	ACGAACAGTGATGGTGTAACGAGGACCGAGAAATACAGTTTTGTAAAGAGATCCAGCG
541	T N S D G V T R T E K Y S F V K R D P A
1681	TCGGCCAAAACCATCGGCTATCAAAATCCGAATCATTGGAGCCAGGTAAATGCTTATATC
561	S A K T I G Y Q N P N H W S Q V N A Y I
1741	TATAAACATGATGGGAGCCGAGTAATTGAATTGACCGGATCTTGGCCTGGAACCAATG
581	Y K H D G S R V I E L T G S W P G K P M
1801	ACTAAAAATGCAGACGGAATTTACACGCTGACGCTGCCTGCGGACACGGATACAACCAAC
601	T K N A D G I Y T L T L P A D T D T T N
1861	GCAAAAGTGATTTTTAATAATGGCAGCGCCCAAGTGCCCGGTCAGAATCAGCCTGGCTTT
621	A K V I F N <u>N G S</u> A Q V P G Q N Q P G F
1921	GATTACGTGCTAAATGGTTTATATAATGACTCGGGCTTAAGCGGTTCTCTTCCCCATTGA
641	D Y V L N G L Y <u>N D S</u> G L S G S L P H *

Şekil 4.30. (devam) PY22-AmyE fragmanının nükleotid dizisi ve kodladığı amino asit dizisi. Amino asit dizisinde potansiyel N-glikozilasyon bölgeleri kalınlaştırılarak belirtilmiştir.

B. subtilis tarafından salgılanan α -amilazın NH₂-ucundan 41 amino asitlik öncü dizinin kesilmesiyle olgunlaşmış protein haline getirildiği bildirilmiştir (Takase vd 1988, Sasamoto vd 1989). *B. subtilis* PY22 α -amilazının olgun protein dizisinin bu kaynaklarda da belirtildiği gibi lösin (42), treonin (43), alanin (44) ve prolin (45) amino asitleri ile başladığı görülmüştür.

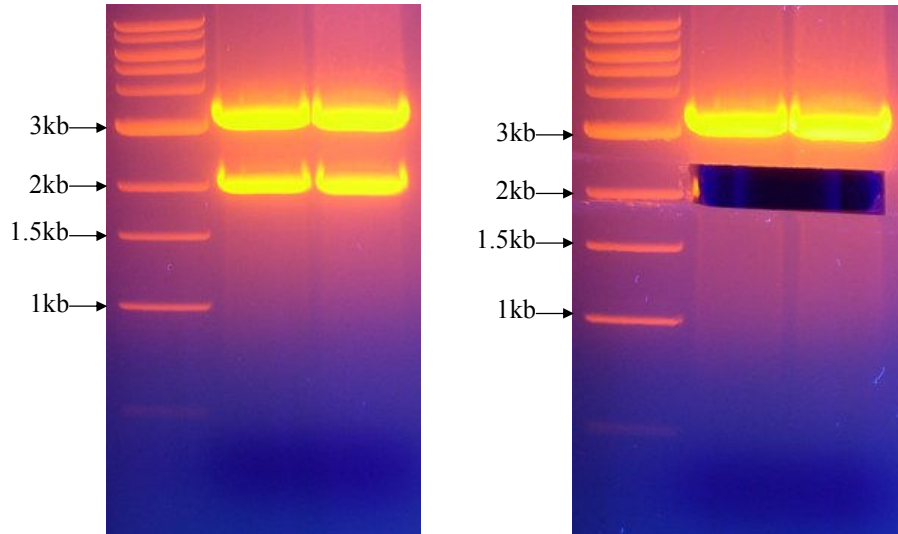
Çizelge 4.3. *B. subtilis* PY22 ve *B. subtilis* 168 suşlarında amyE nükleotid dizileri ve kodladıkları AmyE proteinlerinde amino asit dizileri arasında farklılık gösteren bölgenin kıyaslaması.

Şekil 4.31’de *B. subtilis* 168 suşu ile birlikte *B. subtilis* PY22 suşuna ait amino asit dizisi ve *B. subtilis* BK07 suşu için belirlenebilen dizi ile homoloji kıyaslaması yapılmıştır.

4.3.5.4. PY22-AmyE fragmanının PPicZαA vektörüne bağlanması, vektörün kontrolü

PPicZαA vektörü *PmlI* ve *KpnI* enzim çifti ile kesilerek jel ekstraksiyonu ile saflaştırılmış ve DNA içeriği 65.47 ng/μL olarak belirlenmiştir.

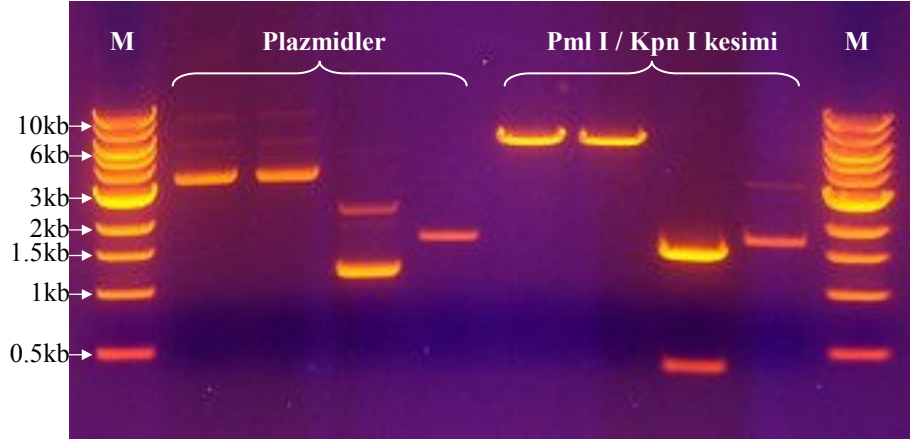
TopoPY2 ve TopoPY9 plazmidlerinin *PmlI* ve *KpnI* enzimleri ile duble kesilmesi sonucu elde edilecek parçaların 1992, 1888, 1190 ve 393 bç olacağı, ve büyüklükleri 1992 bç olan PY22-AmyE fragmanı ile 1888 bç olan diğer bir fragmanın jel ekstraksiyonu aşamasında ayrıştırılamayacağı düşünülerek TopoPY2 plazmidi öncelikle PY22-AmyE fragmanını içerden kesmeyecek şekilde seçilen *HindIII* ve *XhoI* enzim çifti ile kesilmiştir. Yürütülen jelde beklendiği üzere 3419 bç ve 2098 bç bantlar gözlenmiş, bunlardan PY22-AmyE parçasını barındıran PY2-HX olarak isimlendirilen 2098 bç fragman saflaştırılmıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. TopoII Blunt PY22-AmyE plazmidinin *HindIII* ve *XhoI* ile kesimi sonrası yürütülen jel ve 2098 bç büyüklüğündeki bandın jelden alınmış hali

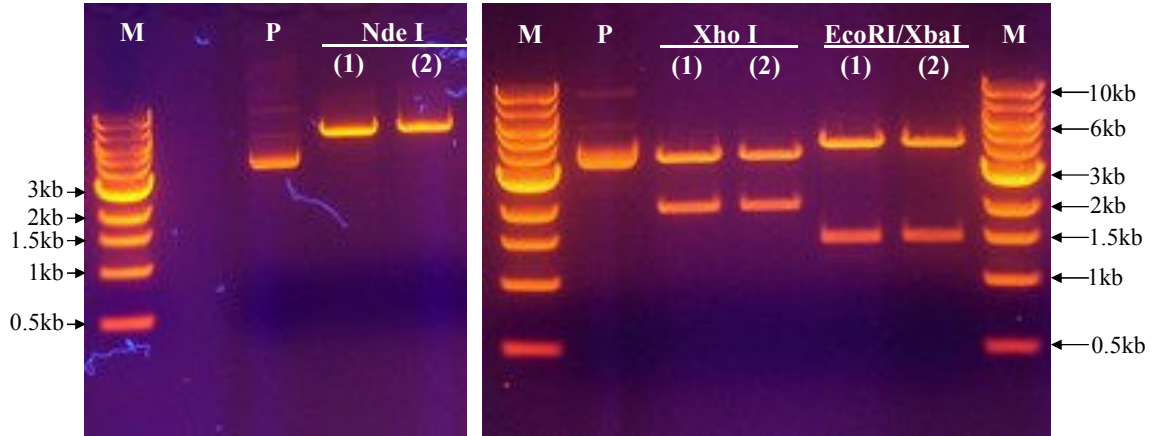
PY2-HX fragmanı *PmlI* ve *KpnI* endonkleazları ile kesilerek saflaştırılmıştır ve T4 ligaz enzimi varlığında hazırlanan lineer PPicZαA vektörüne birbirine uyumlu uçlardan bağlanmıştır. Elde edilen plazmide pPicZαAmyE kodu verilmiştir.

pPicZaAmyE plazmidi bir ara aşama olarak *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiştir. Plakada gelişen koloniler arasından belirlenen 4 tanesi çeşitli endonükleazlarla kesilerek plazmid izolatları kontrol edilmiştir. Bunun için ilk olarak *Pml*I ve *Kpn*I enzimleriyle kesim yapılmıştır (Şekil 4.33). Bu şekilde klonlardan iki tanesinde 5-6 kbç büyüklüğünde tek bant gözlenmiştir. Burada enzimlerin aynı çözelti içinde kullanılması kesim yeteneklerini etkilemiş olabileceği düşüncesiyle enzimlerden birinin çalıştığı ve zaten 5.5 kbç büyüklüğünde olması beklenen plazmidin doğrusallaştığı fikri oluşmuştur.



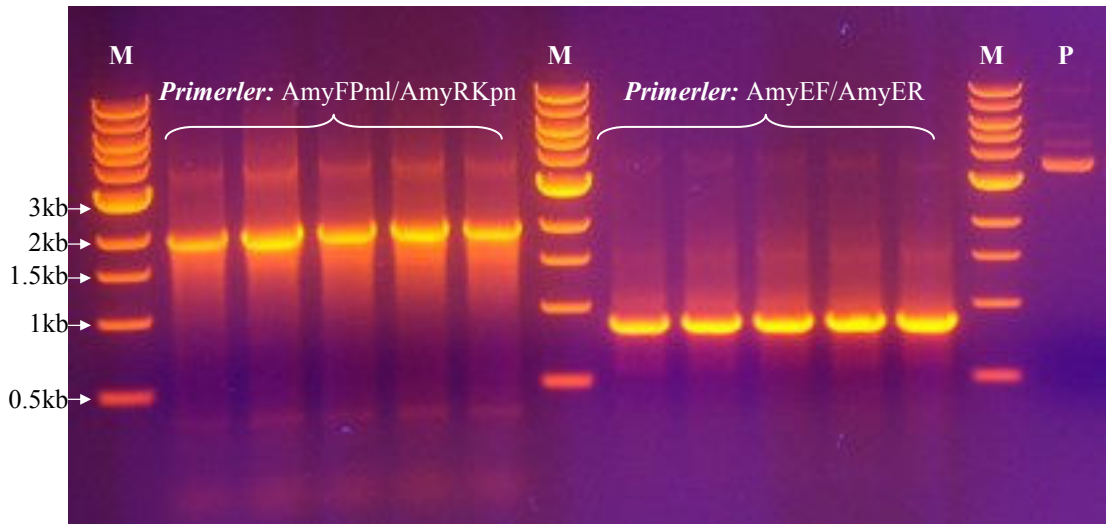
Şekil 4.33. pPicZaAmyE plazmidi için elde edilen transformasyon plakasından seçilen 4 koloniden elde edilen plazmid izolatlarının ve bunların *Pml*I ve *Kpn*I enzimleri ile kesiminin jel elektroforez görüntüsü

İleri bir doğrulama için bu iki plazmid izolatu kesim desenlerinin incelenmesi için *Xho*I ve *Eco*RI / *Xba*I enzimleriyle kesilmiştir (Şekil 4.34). Hesaplanan kesim desenine göre yürütülen jelde *Nde*I enziminin tek noktada keseceği, *Xho*I ile kesimde 3531 ve 2024 bç büyüklüğünde, *Eco*RI / *Xba*I ikili kesiminde ise 3530, 1477 ve 548 bç büyüklüğünde bantların gözleneceği öngörülmüştür. Yürütülen jelde oluşan kesim deseni *Nde*I ve *Xho*I kesimleri plazmidi doğrulamıştır ancak *Eco*RI / *Xba*I ikili kesiminde 3 bant yerine 4-5 ve 1.5 civarında iki bant gözlenmiştir.



Şekil 4.34. pPicZαAmyE plazmidi için elde edilen transformasyon plakasından seçilen 2 klondan elde edilen plazmid izolatlarının *NdeI*, *XhoI* ve *EcoRI* / *XbaI* enzimleriyle kesiminin jel elektroforez görüntüsü. P: halka plazmid, M; molekül ağırlık standardı

Son bir değerlendirme amacıyla pPicZαAmyE(1)'in kalıp olarak kullanıldığı ve sırasıyla 2 ve 0.9 kbç büyüklüğünde fragmanlar oluşturması beklenen AmyEFPml/AmyERKpn ve AmyEF/AmyER primer çiftleri ile PCR denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu denemede beklenen büyüklükte fragmanlar oluşmuştur (Şekil 4.35).

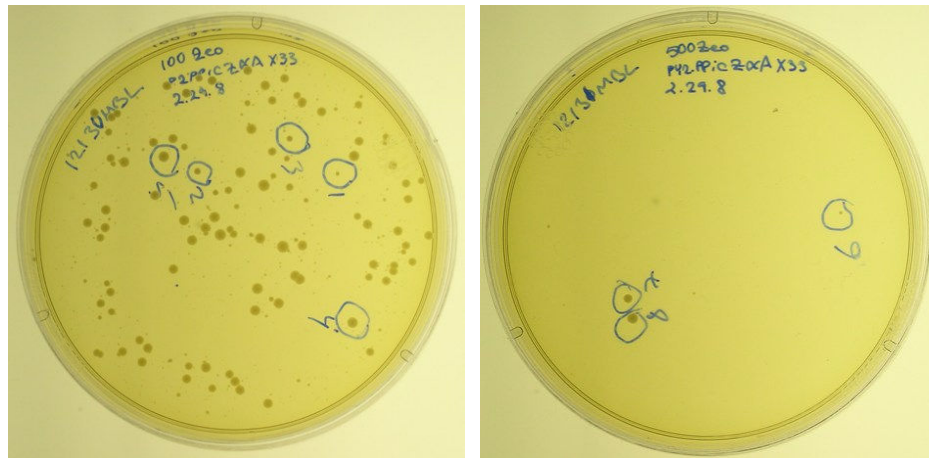


Şekil 4.35. pPicZαAmyE(1) plazmidi için genin tamamını ve içinden AmyEFR bölgesini amplifiye etmek için yapılmış PCR sonrası yürütülen agaroz jeli görüntüsü. M: Moleküler ağırlık standardı, P: halka pPicZαAmyE (1)

pPicZaAmyE(1) halka plazmidi PPicZaA vektöründe bulunan 3-AOX1fo ve 5-AOX1re primerleriyle dizi analizine gönderilmiştir. Bu dizi analizi ligasyonun gerçekleştiği noktada, genin 5'- ucunun eklendiği yerden 5 baz çifti öncesinde bulunan *Pml*I enziminin kesim bölgesinde 6 baz çiftinin (5'-CAC TTA-3') kayba uğradığını göstermiştir. Bu kaybın *Pml*I enziminin zaman zaman hatalı kesim yapmasıyla oluşabilecek bir kısalmadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu noktada oluşan baz çifti kaybı sadece *Eco*RI kesim bölgelerinden biri ile çakıştığı için bu notada *Eco*RI ile kesim olanağı kalmamıştır. Ancak, eksilme 3'ün katı şeklinde olduğu için açık okuma penceresinde kayma olmamış ve genin kodlamasında bir değişiklik oluşmamıştır. Bu eksilme, ancak dizi belirlendikten sonra anlaşılabilmiş olup aynı zamanda *Eco*RI enziminin kullanıldığı kesimlerde kesim deseninin eksik bant sayısı ile oluşması durumuna açıklık getirmiştir.

4.3.5.5. Konukçu *Pichia pastoris*'e transformasyonu ve amyE⁺ rekombinant klonların eldesi

pPicZaAmyE(1) halka plazmid *Sac*I enzimi yardımıyla tekrar linearize edilerek saflaştırılmıştır. Elektroporasyon yoluyla *P. pastoris* KM71H hücrelerine transformasyon sonrasında elde edilen plakalarda üreyen kolonilerden rastgele olarak 8 adedi seçilmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. pPicZaAmyE vektörü ile transforme edilen *P. pastoris* KM71H hücreleri için elde edilen plakalar.

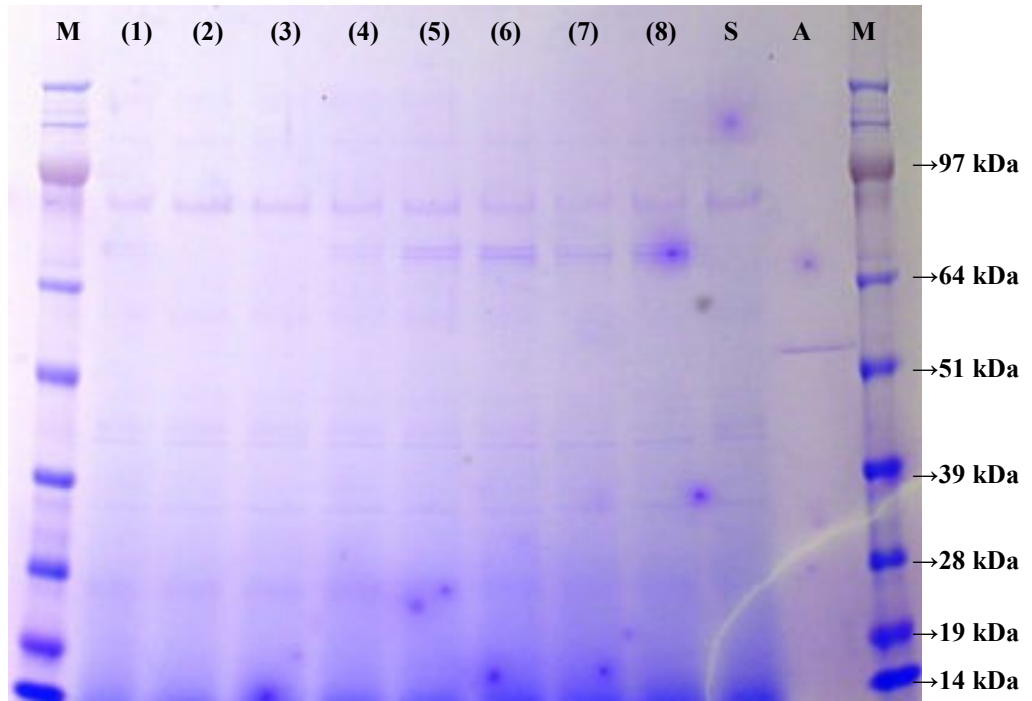
Çizelge 4.4. Seçilmiş 8 adet transformant suş için geliştirilen induksiyon kültürlerinin absorbans ve optik yoğunluk (OD) değerleri.

Suş (<i>P. pastoris</i> pPicZαAmyE klon #1-8 veya kontrol suş <i>P. pastoris</i> KM71H)	600 nm dalgaboyunda absorbands ölçümleri (1:40/1:80 ^a)												Optik yoğunluk (OD)					
	YSD			BMGY			BMMY			YSD			BMGY			BMMY		
	21. saat	24. saat	0. saat ^b	18. saat	0. saat	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat	21. saat	24. saat	0. saat ^a	18. saat	0. saat	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat
Klon 1	0.041	0.112	0.02	0.188	0.226	0.519	0.343	0.365	0.346	1.64	4.48	0.80	7.52	9.04	20.76	27.44	29.20	27.68
Klon 2	0.068	0.167	0.02	0.208	0.218	0.548	0.328	-	-	2.72	6.68	0.80	8.32	8.72	21.92	26.20	-	-
Klon 3	0.075	0.183	0.02	0.196	0.256	0.508	0.314	-	-	3.00	7.32	0.80	7.84	10.24	20.32	25.08	-	-
Klon 4	0.079	0.180	0.02	0.181	0.245	0.549	0.396	0.330	0.340	3.16	7.20	0.80	7.24	9.80	21.96	31.68	26.04	27.20
Klon 5	0.084	0.183	0.02	0.209	0.260	0.538	0.325	0.340	0.347	3.36	7.32	0.80	8.36	10.40	21.52	26.00	27.20	27.76
Klon 6	0.069	0.152	0.02	0.197	0.225	0.467	0.275	0.330	0.279	2.76	6.08	0.80	7.88	9.00	18.68	22.00	26.40	22.32
Klon 7	0.073	0.201	0.02	0.159	0.228	0.451	0.253	0.313	0.311	2.92	8.04	0.80	6.36	9.12	18.04	20.24	25.04	24.88
Klon 8	0.065	0.167	0.02	0.184	0.260	0.477	0.287	0.300	0.280	2.60	6.68	0.80	7.36	10.40	19.08	22.96	24.00	22.40
<i>P. pastoris</i> X33	0.035	0.102	0.02	0.159	0.259	0.535	0.330	0.350	0.361	1.40	4.08	0.80	6.36	10.36	21.40	26.40	28.00	28.88

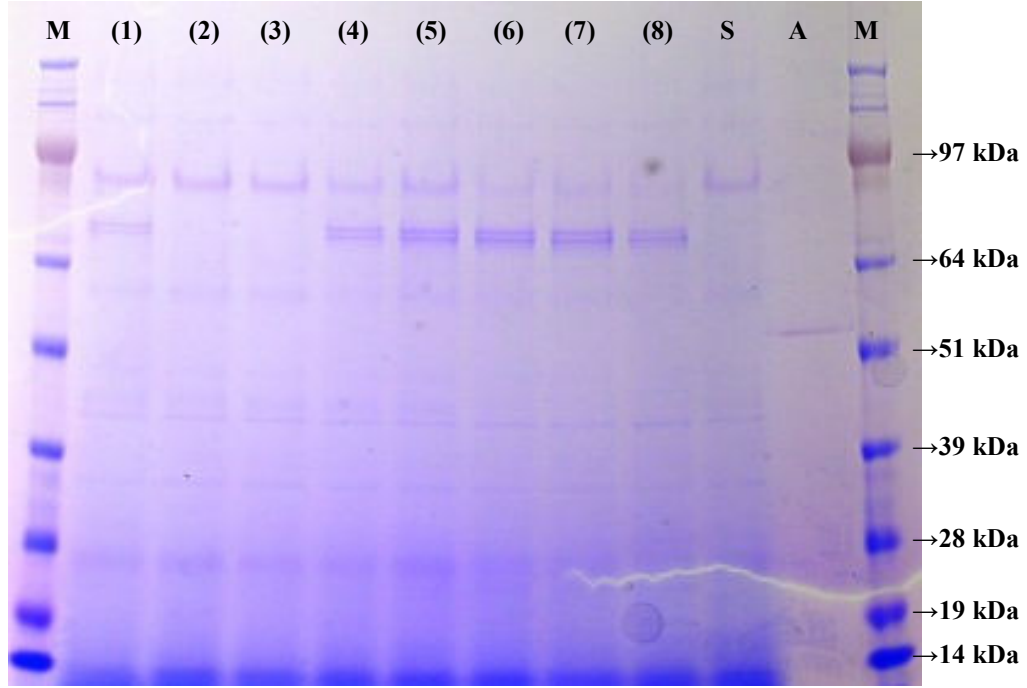
^a Absorbans ölçümlerinde YSD, BMGY besiyerlerinde yapılan ölçümlerde ve BMMY için ilk 12 saatte yapılan ölçümlerde 1:40'lık dilüsyon hazırlanmış, BMMY 24. saatten itibaren okunabilir değerler alınabilmesi 1:80'lik dilüsyonlarla çalışılmıştır.

^b Teorik olarak ayarlanan hücre yoğunluğu veya hesaplanan OD.

BMGY besiyerinde 12 ve 24 saat geliştirilen hücre kültürlerinin süpernatantlarıyla hazırlanan örneklerin yürütüldüğü SDS-PAGE jeline salgı proteinleri bantlar halinde birbirinden ayrılmıştır (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39). Klon 1, 4, 5, 6, 7 ve 8'in moleküler ağırlığı 70 kDa civarında olan rekombinant amilazı ürettiği gözlenmiştir. Klon 2, 3 ve kontrol KM71H suşlarında bu bant bulunmamaktadır.



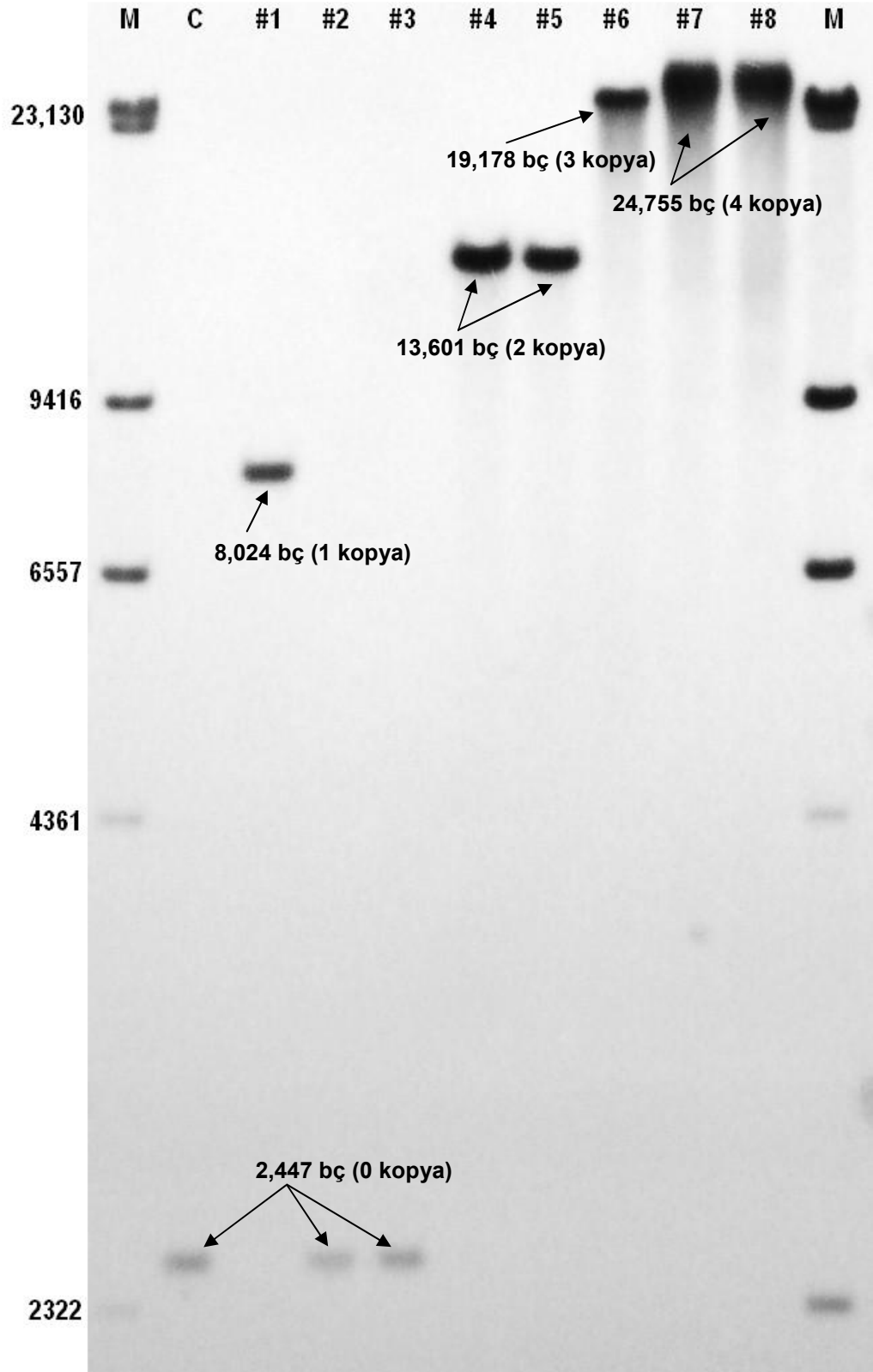
Şekil 4.38. Elde edilen *P. pastoris* klonlarının 12 saatlik kültür süpernatantları ile hazırlanan örneklerin yürütüldüğü % 4-12'lik Bis-Tris SDS-PAGE jeli. (1-8): transformantlar; M: Seeblue® molekül ağırlık standardı; S; Transforme edilmemiş konukçu suşa ait örnek; A: 500 ng standart bakteriyel amilaz (Sigma 6380).



Şekil 4.39. Elde edilen *P. pastoris* klonlarının 24 saatlik kültür süpernatantları ile hazırlanan örneklerin üretiltiği % 4-12'lik Bis-Tris SDS-PAGE jeli. (1-8): transformantlar; M: Seeblue® molekül ağırlık standardı; S; Transforme edilmemiş konukçu suşa ait örnek; A: 500 ng standart bakteriyel amilaz (Sigma 6380).

Klonların amilaz geni kopya sayılarının belirlenmesi

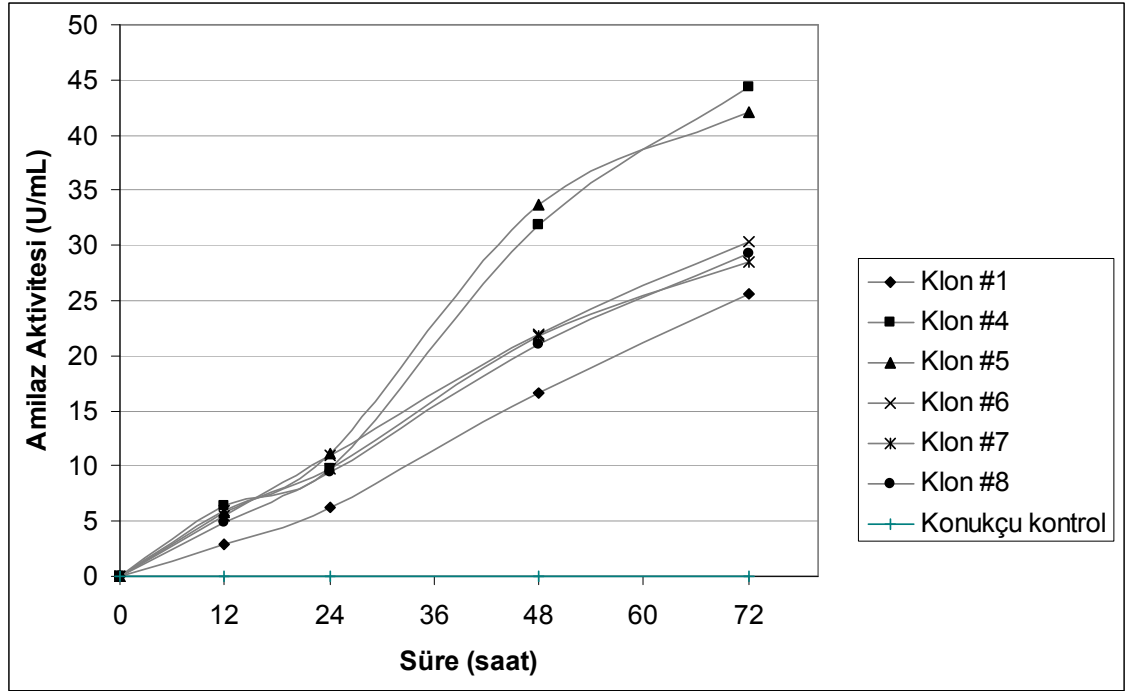
Seçilmiş 8 transformant suşun kromozomları izole edilerek *Bst*EII endonükleazı ile kesilmiştir. Bu örnekler 1kb ve DIG moleküler ağırlık standartları ile birlikte agaroz jelde yürütülmüş ve sonrasında AOX1 probu ile Southern analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.40). Bu analiz sonucunda kontrol konakçı suşun yanı sıra, klon #2 ve #3 numaralı klonlarda da gen ilavesinin olmadığı doğrulanmıştır. Ayrıca, transfer edilen geni içeren klonlarda entegrasyonun AOX1 lokusundan, çoklu kopya içeren klonlarda eklentilerin ardışık bağlantı halinde gerçekleştiği anlaşılmıştır. Şekil 4.40'dan anlaşılabileceği gibi klon #1'in bir kopya, klon #4 ve #5'in ikişer kopya, klon # 6'nın üçkopya, klon #7 ve #8'in ise dörder kopya amyE geni içermektedir.



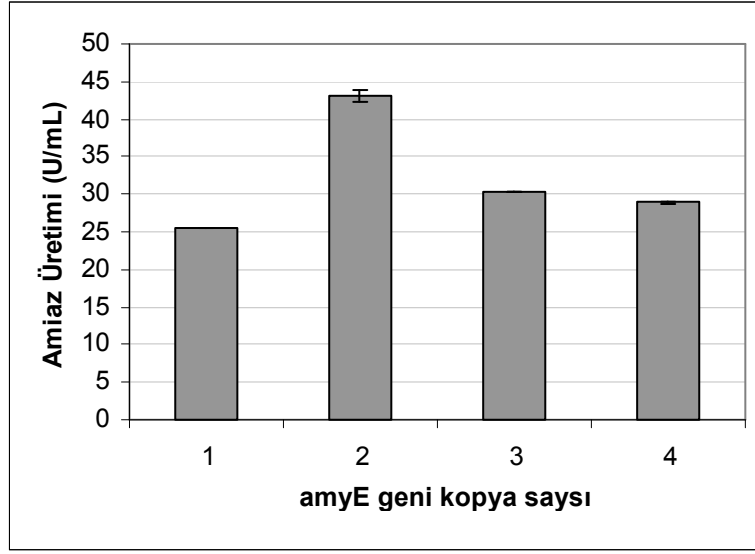
Şekil 4.40. Seçilmiş 8 klonda amyE geni kopya sayılarını belirlemek için gerçekleştirilen Southern analizi ile elde edilen film görüntüsü. M: DIG molekül ağırlık standardı, C; Kontrol örneği olarak konukçu *P. pastoris* KM71H; #1-8: transformasyon plakalarından seçilen 8 klon.

4.3.5.6. Rekombinant amilaz üretimi ve kaynak suşun salgılama potansiyeli ile kıyaslama

Seçilen pozitif klonların amilaz üretimleri fermantasyon süresince alınan hücre dışı sıvısı örneklerinde amilaz aktivitesi fluorometrik yöntemle tayin edilerek izlenmiştir (Şekil 4.41). Üç gün sürdürülen fermentasyon sonunda en yüksek amilaz aktivitesine 2 kopya gen barındıran klon 4 ve klon 5 ile ulaşıldığı ve aktivitenin ortalama 43,170 mU/mL düzeyinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.42). Standart amilaz kullanılarak gerçekleştirilen hesaplama ile amilaz miktarının 21.95 mg/L seviyesinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.41. amyE genini içeren klonların amilaz üretimleri.



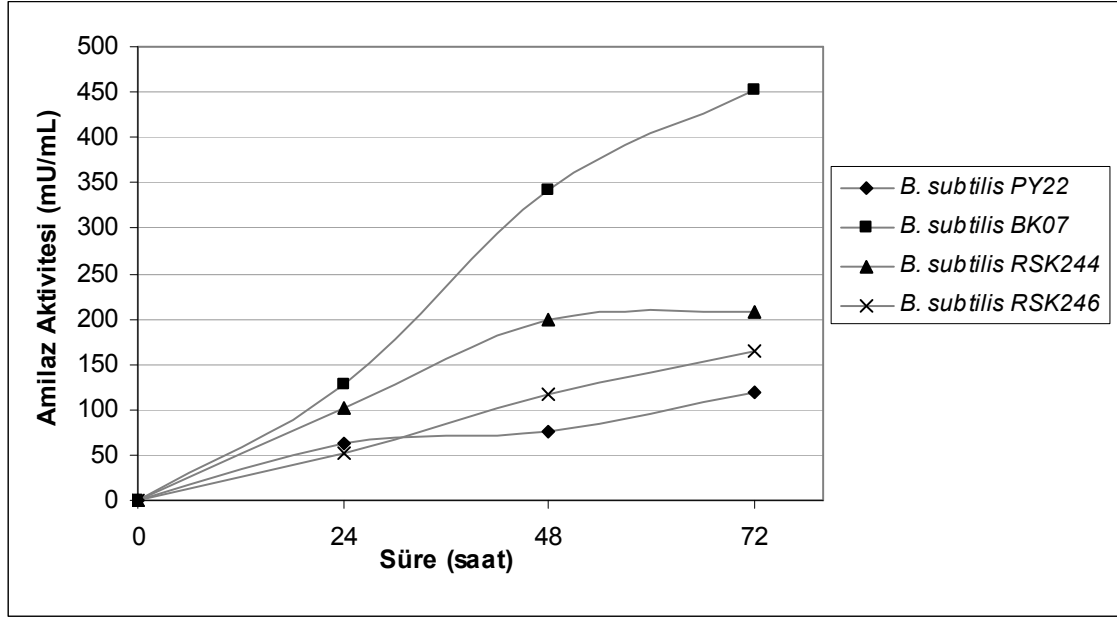
Şekil 4.42. amyE genini içeren klonların gen kopya sayıları ve 3. gün itibariyle amilaz üretimlerinin kıyaslaması.

Ekspresyon kasetindeki gen kopya sayısının artması genel olarak protein üretim miktarını arttıran bir faktör olarak bilinse de kaynak yetersizliğine bağlı olarak transkripsiyon ve translasyonda oluşabilecek darboğazların oluşabildiği ve gen kopya sayısının artmasına karşılık ekspresyon düzeylerinde düşüşün görüldüğü durumlar literatürde mevcuttur (Macaulay-Patrick vd 2005). Inan vd (2006) çalışmalarında, *P. pastoris*'e yaptıkları gen (Na-ASP1) aktarımı ile elde ettikleri 1-4 adet gen kopyası içeren klonları incelediklerinde, kopya sayısı ile hücre dışına salgılamanın doğru orantılı olmadığını göstermiş, bu durumun salgılama mekanizmasının doygunluğa ulaşmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Bacillus türlerinde 3 günlük çalkalamalı fermantasyon süresince hücre dışı sıvılarının amilaz aktiviteleri de belirlenmiştir (Şekil 4.43). Üçüncü gün itibariyle *B. subtilis* PY22'in hücre dışı sıvısında amilaz aktivitesinin 120 mU/mL düzeyinde olduğu belirlenmiştir.

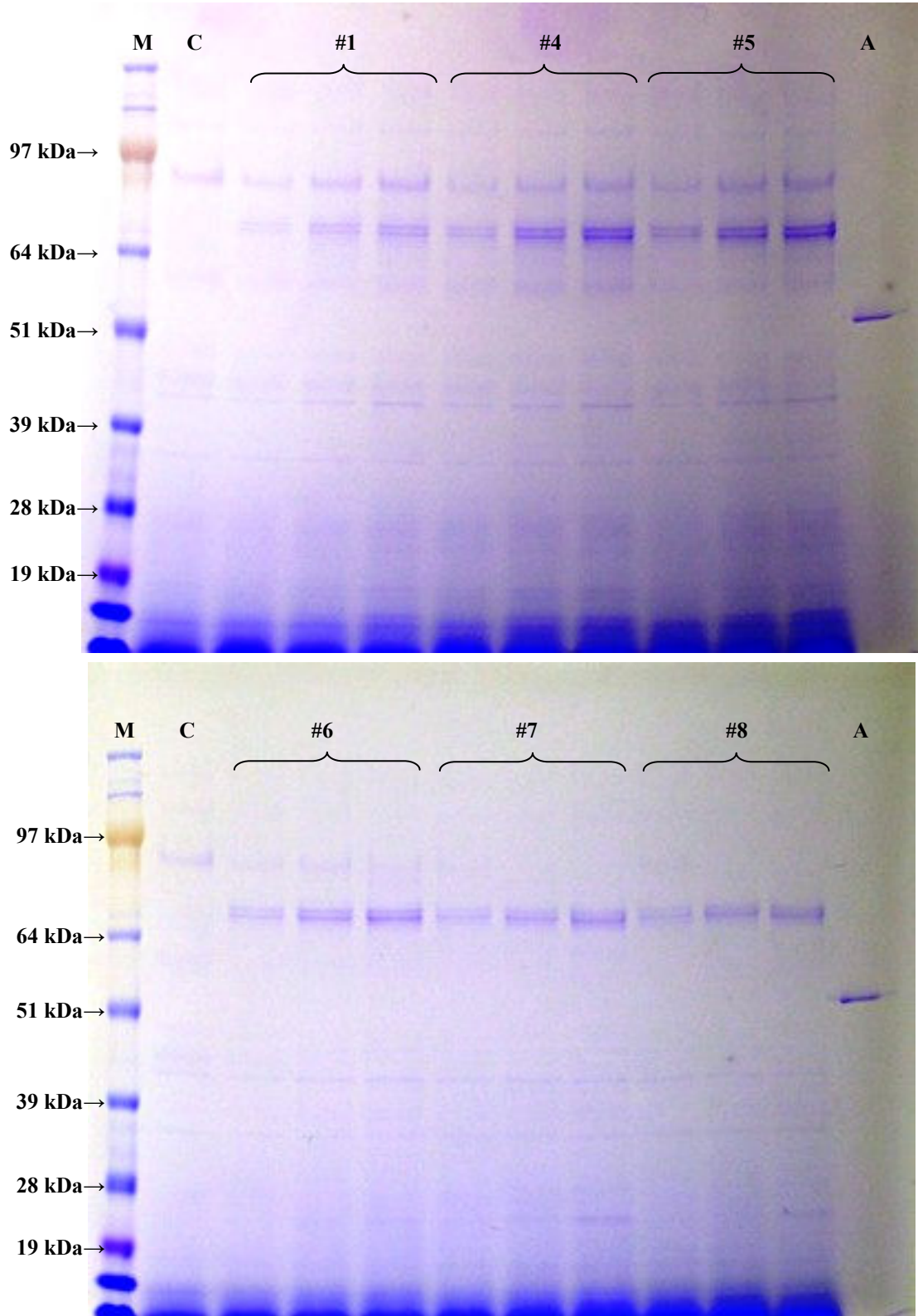
Kültür sıvısında tespit edilen α -amilaz aktivitesi bakımından bir kıyaslama yapıldığında, *B. subtilis* PY22 ile yapılan üretimin 3. gününde aktivite değerinin 120 mU/mL civarında olduğu ve *P. pastoris* ile rekombinant üretimde indüksiyonun başlatılmasını takip eden aynı süre içinde α -amilaz aktivitesinin 45 U/mL seviyesine

çıkıldığı belirlenmiştir. Üretici organizmalar, besiyerileri, başlangıç hücre yoğunlukları ve üretim koşullarındaki farklılıklardan ötürü bire bir kıyaslamaların yanıltıcı olabileceği gerçeği de göz önünde bulundurularak, aynı yöntemle belirlenen iki ölçüm arasında yaklaşık 370 kat artış olduğu görülmüştür.



Şekil 4.43. *Bacillus* suşları ile gerçekleştirilen 3 günlük fermantasyonda hücre dışı sıvıda tayin edilen amilaz aktiviteleri.

İndüksiyonlu ve çalkalamalı inkübasyon ile pozitif klonlarla yapılan üretimlerden elde edilen 24. 48. ve 72. saat hücre dışı kültür sıvısı örnekleri SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.44). Bu şekilde, dizi analizi ile teorik olarak 67,909 Da civarında olması beklenen amilaz bandı gözlenmiş ve fermantasyon süresi ilerledikçe bandın daha belirgin olarak ortaya çıktığı görülmüştür. Bu jel görüntülerinde de 4 ve 5 numaralı klonların diğerler klonlara kıyasla daha kalın amilaz bantları oluşturduğu görülebilmektedir. Bu aşamada ileride yapılacak saflaştırma aşamaları için 4 numaralı klonun kullanılması kararı verilmiştir. Ayrıca, konukçu *P. pastoris*'e has protein bantları bakımından 60-70 kDa civarında yoğunluk olmadığı görülmüştür. Bu durumun molekül ağırlığına bağlı olarak gerçekleştirilebilecek saflaştırma aşamalarında kolaylık sağlayacak bir avantaj olarak değerlendirilebilecektir.



Şekil 4.44. amyE genini içeren klonların sırasıyla 24. 48. ve 72. saat fermantasyon örneklerinin SDS-PAGE analizi ile elde edilen jel görüntüleri. M: protein moleküler ağırlık standardı; C; Kontrol örneği olarak konukçu *P. pastoris* KM71H; #1, #4-8: amyE genini içeren klonlar; A: 500 ng standart bakteriyel amilaz (Sigma 6380).

4.3.5.7. Rekombinant enzimin saflaştırılması

İki kopya amyE geni içeren 4 numaralı klon kullanılarak 200 mL sıvı besiyerinde metanol indüksiyonlu üretim gerçekleştirilmiştir. İndüksiyon başlangıcını takip eden 96. saatte elde edilen kültür santrifüjlenerek süpernatant amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz ve membran filtrasyonu işlemlerinden geçirilerek üretilen rekombinant amilaz kısmen saflaştırılmış ve konsantre edilmiştir.

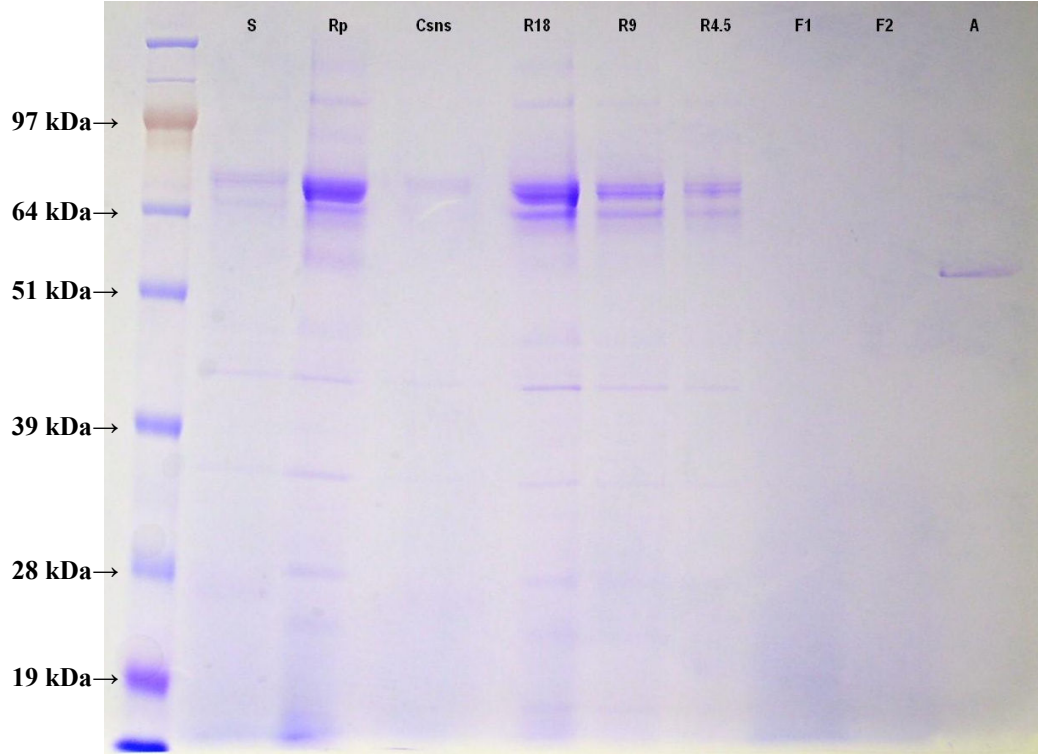
Kültür süpernatantının ve kısmi saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonun protein miktarları ve amilaz aktivitelerinin belirlenmesi suretiyle işlemin verim tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Rekombinant amilazı kısmen saflaştırmak için uygulanan işlemlerden elde edilen bazı değerler.

	Hacim (mL)	Amilaz Aktivitesi (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Toplam Aktivite (U)	Verim (%)
Kültür Süpernatantı	200	8.93	15.39	0.58	1,786	100
Saflaştırılmış Örnek	7.5	26.38	1.4	18.84	197.85	11

Kısmi saflaştırma işlemlerinden elde edilen çeşitli fraksiyonlar %10 akrilamid içerikli, 10 kuyulu jel kullanılarak SDS-PAGE analizine tabi tutulmuştur (Şekil 4.45). Bu jelden anlaşıldığı kadarıyla, filtrat fraksiyonlarına yüksek MA'lı proteinlerin geçişi olmamıştır. Kısmi saflaştırma işlemi sırasında verimin nisbeten düşük oranda (%11) gerçekleşmesine büyük olasılıkla amonyum sülfat çöktürme işlemi sırasında çöktürülemediği için proteinlerin bir kısmının yitilmesinin sebep olduğu düşünülmektedir. Ancak, düşük saflaştırma verimine rağmen, 32.48 kat saflaştırılmanın sağlanabildiği bu kısmi saflaştırma işleminin amacına ulaştığı görülmektedir.

Ayrıca, santrifüj işleminde 50,000 Da molekül ağırlığının altında olan proteinlerde göreceli bir azalma görülmekle birlikte filtre altı sıvıya geçen amilaz olmaması sebebiyle de kısmi saflaştırma işleminin genel olarak başarılı olduğu söylenebilir.



Şekil 4.45. Saflaştırma işlemlerinin çeşitli aşamalarından alınan örneklerin SDS-PAGE (NuPAGE®, 10% Bis-Tris Gel) görüntüsü. Bu jelde görülen kulvarlar: *S*, hücre kültür süpernatantı; *Rp*, daha önceki saflaştırma denemesinde elde edilen filtre üstü sıvı; *Csns*, amonyum sülfat çöktürmesi sonra santrifüjlenen sıvının süpernatantı; *R18*, *R9* ve *R4.5*, saflaştırma sonunda elde edilen filtre üstü sıvısından sırasıyla 18µl, 9 µl ve 4,5 µl hacimlerde örnek yüklemeleri; *F1* ve *F2*, sırasıyla ilk ve son Centriplus® santrifüjlü filtrasyondan elde edilen filtre altı sıvısından örnekler; *A*, 500 ng standart amilaz proteini (Sigma 6380).

4.3.5.8. Rekombinant enzimin karakterizasyonu

Gerçekleştirilen SDS-PAGE analizlerine ait jel görüntülerinde rekombinant amilaz proteinine ait bantların çoğul bantlar halinde bulunduğu gözlenmektedir. Bu durum proteinin glikozilasyona uğradığını ve maya hücresinin kendisine ait salgılama döngüsünden geçerek hücre dışına salgılandığını göstermektedir.

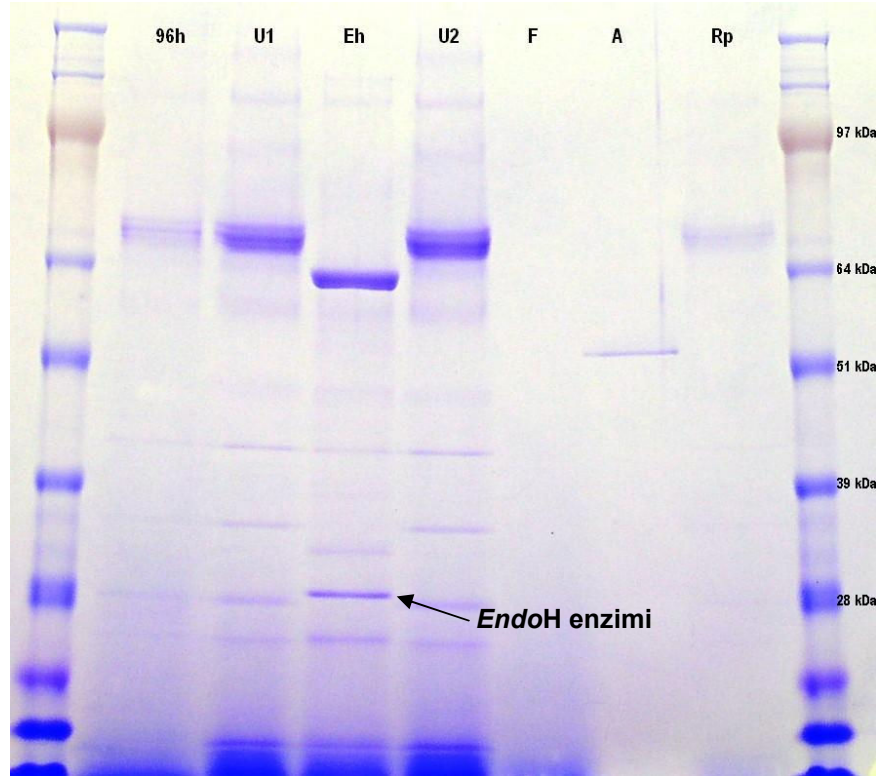
Prokaryotlarda glikozilasyon çok nadir gerçekleşir ve *Eubacteria* grubunda bulunan bakteriler tarafından glikozile edildiği bilinen çok sınırlı sayıda protein mevcuttur (Benz ve Schmidt 2002). Buna karşılık, ökaryotların gelişkin glikozilasyon mekanizmalarının olduğu ve bunun özellikle de rekombinant protein üretiminde avantaj olarak görüldüğü de bilinmektedir (Cereghino ve Cregg 2000). Üretilen rekombinat α -amilaz için Şekil 4.30'da verilen aminoasit dizisinde de belirtildiği üzere bu proteinin maya hücresinde N-glikozilasyona uğrayabileceği 11 konum teorik olarak mevcuttur. Protein bu noktalarda önce asparajin amino asidine ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) bağlanarak “çekirdek” glikozilasyona tabi tutulur, daha sonra endoplazmik retikulumda veya Golgi aparatında bu tetradekasakarit yapıda eklemeler veya kısaltmalar yapılarak terminal (uç) bölge oluşturulur. Üretilen her protein molekülü aynı mekanizma ile glikozile ediliyor olsa da glikozilasyon uzantılarının uç bölgeleri sentezlenen protein aynı olsa dahi bir molekülden diğerine farklılık gösterebilir ve heterojenlik oluşturur (El-Rubeai 2002).

Glikozilasyonun doğrulanması ve rekombinant proteinin gerçek molekül ağırlığının tespiti için protein denatüre edildikten sonra uygun tampon çözelti karışımı içinde *EndoH* enzimi ile muamele edilmiştir. Daha sonra gerçekleştirilen SDS-PAGE analizi sayesinde deglikozile olmuş proteine ait bandın 64 kDa'nun biraz altında olduğu görülmüştür (Şekil 4.46).

Teorik olarak 41 amino asitten oluştuğu düşünülen (Sasamoto vd 1989) sinyal peptidi kesildikten sonra 67,909 Da molekül ağırlığında olacağı hesaplanan proteinin deglikozilasyon sonrasında daha düşük bir molekül ağırlığında bant (yaklaşık 60 kbç) olarak gözlenmesi, öncül proteinin translasyon sonrası proteoliz ile mofiye edilmiş veya hücre duvarından salgılama (translokasyon) aşamasında proteinin tahmin edilenden daha uzun bir kısmının kesilmiş (cleaved) olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Nitekim, mayada ekspres edilen proteinler için proteolitik işleme ile istem ve kontrol dışı olarak kesilme olabileceği literatürde belirtilmiştir (Romanos vd 1992).

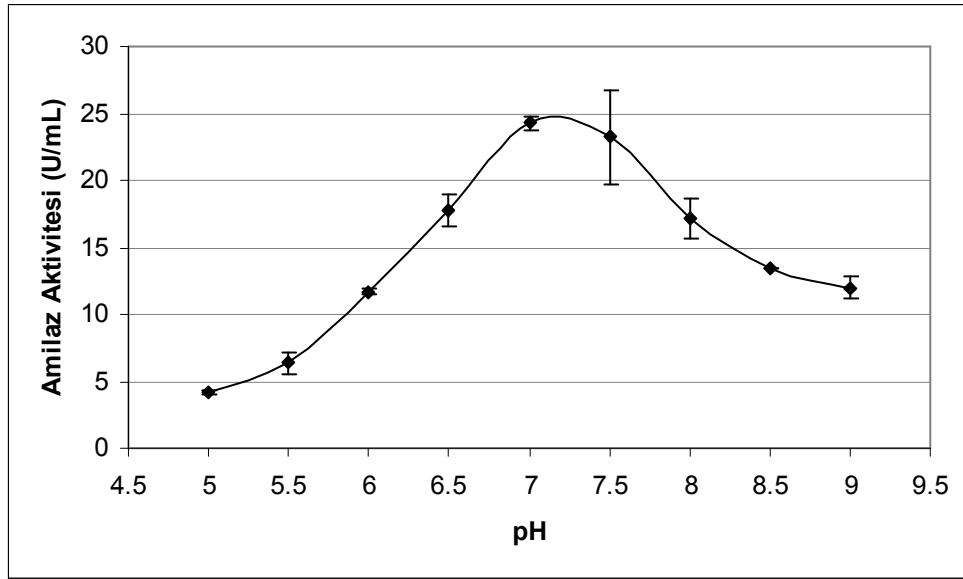
B. subtilis tarafından salgılanan amilaz proteinleri kaynak organizmaya bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Örneğin Yamane vd (1984) bir *B. subtilis* suşunun 477 amino asit okuma penceresi olan 53 kDa molekül ağırlığında bir amilazın yanı sıra

karboksil ucundan kısaltılmış bir diğer amilazı da genetik kod olarak taşıdığını ve ürettiğini göstermişlerdir. Daha yakın tarihli bir çalışmada Ohdan vd (1999) araştırdıkları bir *B. subtilis* suşunu kullanarak, biri karboksil ucu tarafından diğerinden %28 daha kısa olan iki amilaz üretmiş ve saflaştırmışlardır. Bu amilazların her ikisinin de aynı aktivite özelliklerini taşıdığı belirtilmiştir. Molekül ağırlığının aktivite üzerinde farklılık yaratıcı bir faktör olmadığını gösteren çalışmalar bir yana, glikozilasyonun aktivite üzerinde, özellikle stabilitenin artırılması üzerinde oldukça etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Srimathi ve Jayaraman 2005).



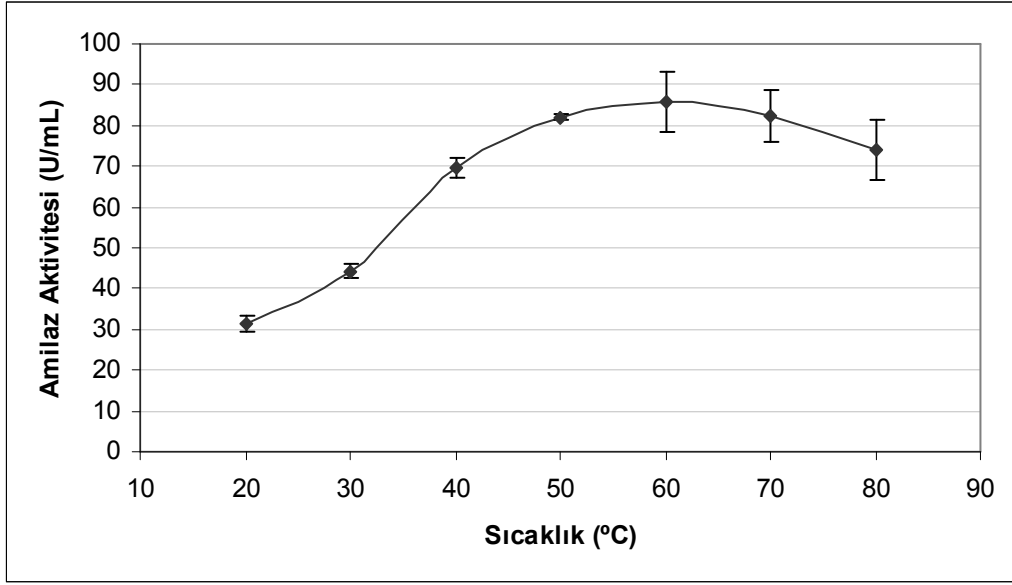
Şekil 4.46. Saflaştırma işlemlerinin çeşitli aşamalarından alınan örneklerin ve *EndoH* enzimi ile muamele edilen kısmi saflaştırılmış amilazın SDS-PAGE (NuPAGE®, 10% Bis-Tris Gel) görüntüsü. Bu jelde görülen kulvarlar: 96h, hücre kültür süpernatantı; U1 ve U2, saflaştırma sonunda elde edilen filtre üstü sıvı; Eh, *EndoH* enzimi ile deglikozilasyonu sağlanmış kısmen saflaştırılmış amilaz; Rp, saflaştırma sonunda elde edilen filtre üstü sıvısı; F, Centriplus® santrifüjlü filtrasyondan elde edilen filtre altı sıvısından örnek; A, 500 ng standart amilaz proteini (Sigma 6380).

Kısmen saflaştırılmış amilaz çözeltisi çeşitli pH'lara ayarlanmış fosfat tamponu ile 40 kat seyreltilmiş ve bu şekilde hazırlanan dilüsyonların amilaz aktiviteleri DNSA reaktifi yardımıyla spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.47'de verilen grafik ile gösterilmiştir. Bu grafikte üretilen rekombinant enzimin optimum aktivitesini pH 7 civarında sergilediği görülmektedir.



Şekil 4.47. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflaştırılan amilazın çeşitli pH'larda gösterdiği aktivite değerleri.

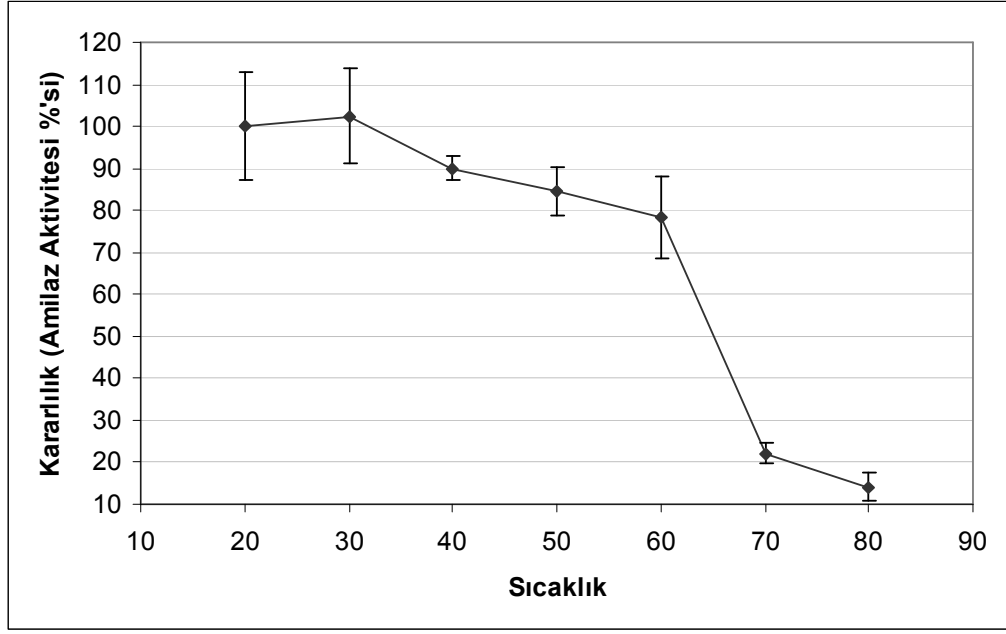
Buna bağlı olarak pH 6.9'a ayarlanmış MOPS tamponu içerisinde 40 kat seyreltilerek hazırlanan rekombinant amilaz çözeltileri kullanılarak çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen amilaz aktivitesi analizlerine ait sonuçlar Şekil 4.48'de verilmektedir. Rekombinant amilazın 50-70 °C'de yüksek aktivite sergilediği ve en yüksek aktiviteyi 60 °C'de gösterdiği görülmüştür. Bakteriler için amilazlarının en aktif olduğu sıcaklık genellikle optimum gelişme gösterdikleri sıcaklığa karşılık gelmektedir (Doyle 2000). Bu çalışmada rekombinant olarak üretilen α -amilaz kaynak bakterinin optimum gelişme sıcaklığı olan 50 °C'den yaklaşık 10 °C daha yüksek sıcaklıkta en yüksek aktiviteyi sergilemiştir.



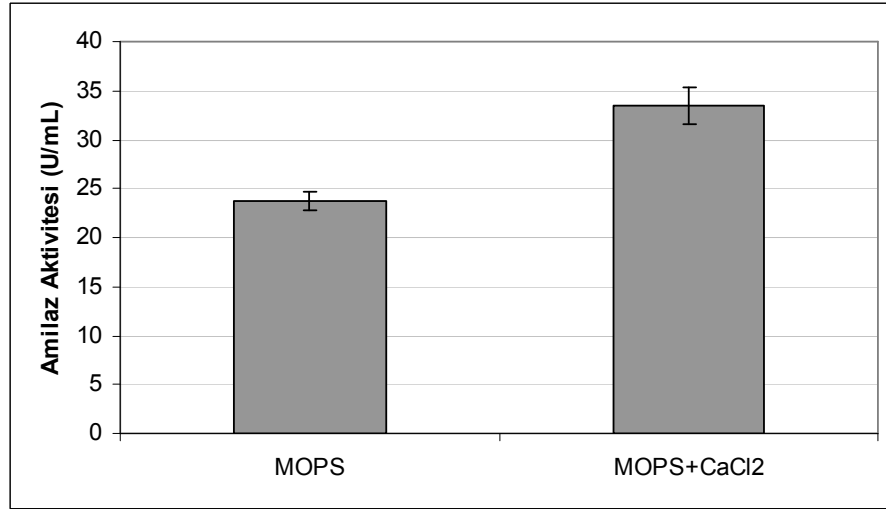
Şekil 4.48. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflaştırılan amilazın çeşitli sıcaklıklarda gösterdiği aktivite değerleri.

Şekil 4.49’de verilen grafik, değişik sıcaklıklarda 1 saat bekletilen amilaz çözeltilerinin oda sıcaklığında gerçekleştirilen aktivite analizleri sonucu elde edilen kararlılık değerlerini göstermektedir. Rekombinant amilazın optimum aktivite gösterdiği 60 °C’de 1 saat bekletilmesi sonrasında aktivitesini %80 oranında koruduğu görülmektedir.

pH 6.9’a ayarlanmış MOPS tamponu içerisinde 40 kat seyreltilerek hazırlanan rekombinant amilaz çözeltilisine 0.1 M CaCl_2 ilave edilmesi halinde enzim aktivitesinde %41 artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.50).



Şekil 4.49. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflaştırılan amilazın pH 7’de ve değişen sıcaklık koşullarında sergilediği ısıl kararlılık değerleri.



Şekil 4.50. Rekombinant amilazın pH’sı 6.9’a ayarlanmış olan 0.1 M MOPS çözeltisinde ve aynı çözeltide 0.1 M Ca⁺⁺ varlığında aktivite değişimi.

Nagarajan vd (2006) başka bir *B. subtilis* suşunun ürettiği benzer amino asit dizisine sahip ancak karboksil ucundan %28 oranında daha kısa bir amilazın benzer aktivite ve stabilite özellikleri sergilediğini, ancak Ca^{++} varlığında aktivitesinde değişme olmadığını rapor etmişlerdir. Ancak, genel olarak α -amilaz molekül başına 1-10 adet Ca^{++} ile kararlı yapıya kavuşan bir metallo enzim olarak bilinir (Vihinen ve Mäntsälä, 1989). Kararlı yapının sağlanmasında genellikle 1 adet Ca^{++} yeterli olmaktadır (Gupta vd 2003). Örneğin, Messaoud vd (2004) de saflaştırdıkları bir *B. subtilis* amilazının Ca^{++} varlığına duyarlı olduğunu göstermiş ve Ca^{++} varlığında amilazın daha yüksek derecede optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan Ca^{++} konsantrasyonunun enzim yapısının kararlılığının temini için yeterli olduğu düşünülmekle birlikte optimum Ca^{++} konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca, optimum sıcaklık ve pH belirlemeleri Ca^{++} ilavesi olmaksızın gerçekleştirilmiştir. İleride bu enzimin kullanılacağı araştırmalarda veya endüstriyel üretime uyarlama çalışmalarında Ca^{++} varlığında optimum sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi uygun olacaktır.

5. SONUÇ

Bu çalışmanın sonucu olarak:

- 1- *Bacillus subtilis* BK07 suşuna ait amilaz geninin orta bölgesinden 1089 ve 3'-ucunu da kapsayan 411 bç'lik dizi belirlenmiştir. Genin tamamı, özellikle de 5' ucundaki dizi belirlenemediği için bu genin klonlama çalışmalarına devam edilememiştir. Dizi verileri ancak ileride yapılabilecek çalışmalara altyapı oluşturabilecek türden veriler olmuştur.
- 2- *B. subtilis* PY22 suşundan amyE geni uygun kesim bölgelerini de genin iki ucuna ekleyecek primerler yardımıyla PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan ve yaklaşık 2 kbç büyüklüğünde olan genin dizisi belirlenmiş ve bu dizinin *B. subtilis* 168 suşunununkine çok yakın benzerlik taşıdığı anlaşılmıştır.
- 3- *B. subtilis* PY22 suşundan elde edilen gen uygun şekilde çoğaltılarak ve izole edilerek *P. pastoris* KM71H mayasına aktarılmıştır. Elde edilen klonlarda gen kopya sayıları belirlenerek en yüksek amilaz üretimini sağlayan 2 kopya gen bulunduran klon üretim denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Klonların amilaz üretimleri hem fluorometrik bir yöntemle incelenmiş, hem de hücre dışı sıvının SDS-PAGE analizi ile izlenmiştir. Rekobinant enzim üretiminin 22 g/L seviyelerine çıkabildiği görülmüştür.
- 4- Seçilmiş klon ile yapılan çalkalamalı fermentasyon ile elde edilen sıvı kültür santrifüjleme, amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz ve filtrasyon gibi çeşitli işlemlere tabi tutularak kısmen saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma işleminde 32.48 kat saflaştırma sağlanmıştır.
- 5- Kısmen saflaştırma sonucu elde edilen karışım kullanılarak enzimin glikozilasyon, optimum çalışma sıcaklığı ve pH'sı, kalsiyum iyonlarının aktivite üzerine etkisi gibi özellikleri belirlenmiştir. Buna göre rekombinant enzim konukçu suş tarafından üretilirken glikozile edilmekte olup, optimum aktivitesini pH 7-8 arasında nötral pH civarında, termofil sayılabilecek 50-70 °C aralığında 60 °C'de pik maksimum aktiviteye ulaşarak göstermektedir. Enzimin 70 °C'de satbilitesinin zayıfladığı, ancak 60 °C'de 1 saat süreyle aktivitesini

%80 oranında koruduğu belirlenmiştir. Enzimin 0.1 M Ca⁺⁺ iyonu varlığında aktivitesinde %40 artış olduğu belirlenmiştir.

- 6- Bu çalışmanın nihai sonucu olarak, gerek gıda alanında gerekse α-amilaz enziminin kullanıldığı diğer alanlarda değerlendirilebilecek özelliklere sahip bir rekombinat α-amilazı metanol tetiklemesi sayesinde yüksek verimlilikle üretebilen ve hücre dışı sıvıya salgılayabilen yeni bir *P. pastoris* şuşu geliştirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.M., SCHAFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- AMELUNXEN, R.E. and MURDOCK, A.L. 1978. Mechanism of thermophily. *Critical Reviews in Microbiology*, 16 (4): 343-393.
- ANONİM 2003. Avrupa Birliği müktesebatının üstlenilmesine ilişkin Türkiye ulusal programının uygulanmasına, koordinasyonu ve izlenmesine dair Bakanlar Kurulu kararı, T. C. Resmi Gazete, Sayı: 25178.
- ANONİM 2006. Dokuzuncu Kalkınma Planı (2007-2013), TBMM Kararı, T. C. Resmi Gazete, Sayı: 26215.
- ANONYMOUS 2006. U. S. Food and Drug Administration, CFSAN/Office of Food Safety, Agency Response Letter, GRAS Notice No. GRN 000204, <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g204.html>
- ANONYMOUS 2009a. European Patent Office URL: <http://v3.espacenet.com>, search page last accessed 26 May 2009 http://v3.espacenet.com/searchResults?locale=en_EP&TI=alpha+and+amylase&ST=advanced&compact=false&DB=EPODOC
- ANONYMOUS 2009b. URL: <http://www.uniprot.org/>, search page last accessed 10 March 2009
- ANONYMOUS 2009c. Basic Local Allignment Search Tool (BLAST), URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, search page last accessed 10 March 2009
- ARIKAN, B. 2008. Highly thermostable, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99: 3071-3076.
- ASGHER, M., ASAD, M.J., RAHMAN, S.U. and LEGGE, R.L. 2007. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79: 950-955.
- ATKINSON, R.W. 1881. On the diastase of koji. *Proceedings of the Royal Society of London*, 32: 299-332.
- BANNER, D.W., BLOOMER, A.C., PETSKE, G.A., PHILIPS, D.C., POGSON, C.I., WILSON, I.A., CORRAN, P.H., FURTH, A.J., MILMAN, J.D., OFFORD, R.E., PRIDDLE, J.D. and WALEY, S.G. 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined by crystallography at 250 Å resolution, using amino acid sequence data. *Nature*, 255: 609-614.

- BAYSAL, Z., UYAR, F. and AYTEKİN, Ç. 2003. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry*, 38: 1665-1668.
- BEMILER, J.N. and WHISTLER, R.L. 1996. Carbohydrates. In: O.R. Fennema (Editor), *Food Chemistry*, 3rd Ed., Marcel Dekker Inc., pp. 157-224.
- BENZ, I. and SCHMIDT, M.A. 2002. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*, 45 (2): 267-276.
- BERNFELD, P. 1955. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 1: 149-158.
- BERNHARDSDOTTER, E.C.M.J., NG, J.D., GARRIOTT, O.K. and PUSEY, M.L. 2005. Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. *Process Biochemistry*, 40: 2401-2408.
- BLENNOW, A. 2004. Starch bioengineering. In: A.C. Eliasson (Editor), *Starch in Food*, Woodhead Publishing Limited, pp. 97-127, Boca Raton, FL.
- BLENNOW, A., HANSEN, M., SCHULZ, A., JØRGENSEN, K., DONALD, A.M. and SANDERSON, J. 2003. The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy. *Journal of Structural Biology*, 143 (3): 229-241.
- BRIGGS, D.E. 2004. *Brewing: Science and Practice*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 881 pp.
- BUCHHOLTZ, K., KACHE, V. and BORNCHEUER, U.T. 2005. *Biocatalysis and Enzyme Technology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 448 pp.
- BURHAN, A., NISA, U., GOKHAN, C., OMER, C., ASHABİL, A. and OSMAN, G. 2003. Enzymatic properties of a thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10): 1397-1403.
- BUTLER, D.P., van der MAAREL, J.E.C. and STEENEKEN, P.A.M. 2004. Starch-acting enzymes. In: A.C. Eliasson (Editor), *Starch in Food*, Woodhead Publishing Limited, pp. 128-155, Boca Raton, FL.
- CEREGHINO, J.L. and CREGG, J.M. 2000. Heterologous expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- CEREGHINO, G.P.L., SUNGA, A.J., CEREGHINO, J.L. and CREGG, J.M. 2001. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. In: J.K. Setlow (Editor), *Genetic Engineering. Principles and Methods*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 157-169, New York.

- CHO, H.Y., KIM, Y.W., KIM, T.J., LEE, H.S., KIM, D.Y., KIM, J.W., LEE, Y.W., LEE, S.B. and PARK, K.H. 2000. Molecular characterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH4-2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1478: 333-340.
- COS, O., RAMON, R., MONTESINO, J.L. and VALERO, F. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methyltrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, 5: 17.
- DALY, R. and HEARN, M.T.W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production, *Journal of Molecular Recognition*, 18: 119-138.
- DAS, K., DOLEY, R. and MUKHERJEE, A.K. 2004. Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional food of India. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40: 291-298.
- DECOCK, P. and CAPELLE, S. 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science and Technology*, 16 (1-3): 113-120.
- DEMAIN, A.L. 2005. Industrial mycology: past, present and future. In: Z. An (Editor), *Handbook of Industrial Mycology*, Marcel Dekker, pp. 1-25, New York.
- DRAPRON, R. and GODON, B. 1987. Role of enzymes in baking. In: J.E. Kruger and D. Lineback (Editors), *Enzymes and their role in cereal technology*, AACC Pres, pp. 281-324, St. Paul.
- DONALD, A.M. 2004. Understanding starch structure and functionality. In: A.C. Eliasson (Editor), *Starch in Food*, Woodhead Publishing Limited, pp. 156-184, Boca Raton, FL.
- DOYLE, R.J. 2000. *Glycomicrobiology*. Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA, 385 pp.
- ELGÜN, A. ve ERTUGAY, Z. 2002. Tahıl İşleme Teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 411 ss.
- EL-RUBEAI, M. 2002. *Glycosylation*. Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA, 225 pp.
- EMORI, M., TAKAGI, M., MARUO, B. and YANO, K. 1990. Molecular cloning, nucleotide sequencing and Expression of the *Bacillus subtilis* (natto) IAM1212 α -amylase structurally similar to but enzymatically distinct from that of *B. subtilis* 2633. *Journal of Bacteriology*, 172 (9): 4901-4908.
- EREM, F. 2007. Normal ve kepekli ekmeklerde sünme etmeni *Bacillus* türlerinin belirlenmesi ve sünme üzerine kinetik çalışmalar. Yükek Lisans Tezi (yayınlanmamış), Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, 181 ss.

- EVERY, D., MANN, J.D. and ROSS, M. 1992. The relationship of dextrins in bread to staling and crumb gumminess. In: The Proceedings of the 42nd Royal Australian Chemical Institute, Cereal Chemistry Conference. pp. 179-186. Christchurch, New Zealand.
- FERRARI, E., JARNAGIN, A.S. and SCHMIDT, B. 1993. Commercial production of extracellular enzymes. In: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and R. Losick (Editors) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria, American Society for Microbiology, pp. 917-937, Washington, D.C.
- FRIGARD, T., ANDERSSON, R. and AMAN, P. 2002. Gradual enzymatic modification of barley and potato amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 47: 169-179.
- FRITZE, D. 2002. *Bacillus* Identification – traditional approaches. In: R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, P. de Vos (Editors) Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives, Blackwell Publishing, pp.100-122, Malden, MA.
- FUJIMOTO, Z., TAKASE, K., DOUI, N., MOMMA, M., MATSUMOTO, T. and MIZUNO, H. 1998. Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *Journal of Molecular Biology*, 277 (2): 393-407.
- GALLANT, D.J., BOUCHET, B. and BALDWIN, P.M. 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, 32: 177-191.
- GRAY, J.A. and BEMILLER, J.N. 2003. Bread staling: molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 1-21.
- GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38: 1599-1616.
- GUZMÁN-MALDONADO, H. and PAREDES-LÓPEZ, O. 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35 (5): 373-403.
- HAGIHARA, H., IGARASHI, K., HAYASHI, Y., ENDO, K., IKAWA-KITAYAMA, K., OZAKI, K., KAWAI, S. and ITO, S. 2001. Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4): 1744-1750.
- HAKI, G.D. and RAKHSHIT, S.K. 2003. Developments in industrially thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 98: 17-34.
- HANNAH, L.C. and JAMES, M. 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Current Opinion in Biotechnology*, 19 (2): 160-165.

- HAYASHIDA, S., TERAMOTO, Y. and INUOE, T. 1988. Production and characteristics of raw-potato-starch-digesting α -amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (6): 1516-1522.
- HENKIN, T.M., GRUNDY, F.J., NICHOLSON, L.W. and CHAMBLISS, G.H. 1991. Catabolite repression of α -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* lacI and galR repressor. *Molecular Microbiology*, 5 (3): 575-584.
- HERBORT, M., KLEIN, M., MANTING, E.H., DRIESSEN, A.J.M. and FREUDL R. 1999. Temporal expression of *Bacillus subtilis* secA gene, encoding a central component of the preprotein translocase. *Journal of Bacteriology*, 181 (2): 493-500.
- HORVÁTOVÁ, V., JANEČEK, Š. and ŠTURDÍK, E. 2001. Amylolytic enzymes: molecular aspects of their properties. *General Pysiology and Biophysics*, 20: 7-32.
- HUANG, H., RIDGWAY, D., GU, T. and MOO-YOUNG, M. 2003. A segregated model for heterologous amylase production by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 407-413.
- INAN, M., ARYASOMAYAJULA, D., SINHA, J. and MEAGHER, M.M. 2006. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(4): 771-778.
- INAN, M., FANDERS, S.A., ZHANG, W., HOTEZ, P.J., ZHAN, B., MEAGHER, M.M. 2007. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). In: J.M. Cregg (Editor), *Pichia Protocols, Methods in Molecular Biology Series*, 389, 2nd edition, Humana Press Inc., pp. 65-75, Totowa, NJ.
- JARNAGIN, A.S. and FERRARI, E. 1992. Extracellular enzymes: gene regulation and structure function relationship studies. In: R.H. Doi and R.E. McLaughlin (Editors), *Biology of Bacilli*, Butterworth-Heinemann Ltd., pp.189-217, Boston, MA.
- JUNIOR, A.V., DO NASCIMENTO, J.R.O. and LAJOLO, F.M. 2006. Molecular cloning and characterization of an α -amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21): 8222-8228.
- JOHANNES, T.W. and ZHAO, H. 2006. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3): 261-267.
- KATO, S., ISHIBASHI, M., TATSUDA, D., TOKUNAGA, H. and TOKUNAGA, M. 2001. Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary α -amylase secreted from methylotrophic yeast, *P. pastoris*. *Yeast*, 18: 643-655.

- KIRAN, Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU, U. and ARIKAN, B. 2005. Effects of carbon sources and various chemicals on the production of novel amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. K-12. *Turkish Journal of Biology*, 29: 99-103.
- KIRK, O., BORCHERT, T.V. and FUGLSANG, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351.
- KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I., ALBERTINI, A.M., ALLONI, G., AZEVEDO, V., BERTERO, M.G., BESSIERES, P., BOLOTIN, A., vd 1997. The complete genome sequence of the gram positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390 (6657): 249-256.
- KUROKAWA, T., LEE, C., SHIOMI, N., NAKANO, A. and KATOH, S. 2002. Secretion of α -amylase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* and characterization of its C-terminus with an anti-peptide antibody. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 35 (12): 1277-1281.
- LAGRAIN, B., LEMAN, P., GOESART, H. and DELCOUR, J.A. 2008. Impact of thermostable amylases during bread making on wheat bread crumb structure and texture. *Food Research International*, 41: 819-827.
- LEE, C.Y., NAKANO, A., SHIOMI, N., LEE, E.K. and KATOH, S. 2003. Effects of substrate feed rates on heterologous protein expression by *Pichia pastoris* in DO-stat fed-batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4): 358-365.
- MACAULAY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B. and HARVEY, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22: 249-270.
- MARCO, J.L., BATAUS, L.A., VALÊNCIA, F.F., ULHOA, C.J., ASTOLFI-FILHO, S. and FELIX, C.R. 1996. Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis* α -amylase produced by *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 746-752.
- MATSUURA, Y., KUSUNOKI, M., HARADA, W. and KAKUDO, M. 1984. Structure and possible catalytic residues of taka-amylase A. *Journal of Biochemistry*, 95 (3): 697-702.
- MC TIGUE, M A., KELLY, C.T., DOYLE, E.M. and FOGARTY, W.M. 1995. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 570-573.
- MESSAOUD, E.B., ALI, M.B., ELLEUCH, N., MASMOUDI, N.F. and BEJAR, S. 2004. Purification and properties of a maltoheptaose- and altohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 662-666.

- MISHRA, S., NORONHA, S.B. and SURAIISKUMAR, G.K. 2005. Increase in enzyme productivity by induced oxidative stress in *Bacillus subtilis* cultures and analysis of its mechanism using microarray data. *Process Biochemistry*, 40: 1863-1870.
- MITSUKI, S., MUKAE, K., SAKAI, M., GOTO, M., HAYASHIDA, S. and FURUKAWA, S. 2005. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing α -amylases from various *Bacillus* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 410-416.
- NAGARAJAN, D.R., RAJAKOPALAN, G. and KRISHNAN, C. 2006. Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming alpha-amylase from a new *Bacillus subtilis* KCC103. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73 (3): 591-597.
- NAJAFI, M.F., DEOBAGKAR, D. and DEOBAGKAR, D. 2005. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 41: 349-354.
- NAKANO, A., LEE, C.Y., YOSHIDA, A., MATSUMOTO, T., SHIOMI, N. and KATOH, S. 2006. Effects of methanol feeding methods on chimeric α -amylase expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(3): 227-231.
- NEIDLEMAN, S.L. 1991. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technology*, 45 (1): 88-91.
- OHDAN, K., KURIKI, T., KANEKO, H., SHIMADA, J., TAKADA, T., FUJIMOTO, Z., MIZUNO, H. and OKADA, S. 1999. Characteristics of two forms of α -amylases and structural implication. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10): 4652-4658.
- OLEMPSKA-BEER, Z.S., MERKER, R.I. and DITTO, M.D. 2006. Food processing enzymes from recombinant organisms- a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45 (2): 144-158.
- OUTTRUP, H. and JORGENSEN, S.T. 1998. The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. In: R. Berkley (Editor) *Applications and Systems of Bacillus and Relatives*, Blackwell Science Inc., pp. 206-218, Boston, MA.
- ÖZCAN, N. and ALTINALAN, A. 2001. Molecular cloning of an α -amylase gene from *Bacillus subtilis* RSKK246 and its expression in *Echerichia coli* and in *Bacillus subtilis*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25: 197-201.
- ÖZCAN, N. 2003. *Bacillus subtilis* ORBA97 suşuna ait endüstriyel α -amilaz geninin *Echerichia coli* ve *Bacillus subtilis* YB886'da klonlanması ve ekspresyonu. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26: 35-40.

- ÖZCAN, B.D. 2005. Sıcaklığa dirençli amilaz genlerinin klonlanması üzerine çalışmalar. Doktora Tezi (yayınlanmamış), Çukurova Üniversitesi, Adana, 122 ss.
- ÖZCENGİZ, G. 1996. Biotechnological developments in Turkey. *Critical Reviews in Biotechnology*, 16 (1): 53-94.
- ÖZKAYA, H. ve ÖZKAYA, B. 2005. Öğütme teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No. 30, Ankara, 757 ss.
- PALACIOS, H.R., SCHWARZ, P.B. and D'APPOLONIA, B.L. 2004. Effect of α -amylases from different sources on the retrogradation and recrystallization of concentrated wheat starch gels: relationship to bread staling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (19): 5978-5986.
- PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, V. T., SINGH, D. and MOHAN, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Advanced Biochemistry*, 31: 135-152.
- PAREKH, S., VINCI, V. A. and STROBEL, R. J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 287-301.
- PAYEN, A. and PERSOZ, J. F. 1833. Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions, et leur applications aux arts industriels. *Annales des Chimie et des Physique*, serie 2, 53: 73-92.
- PAIFER, E., MARGOLLES, E., CREMATA, J., MONTESINO, R., HERRERA, L. and DELGADO, J. M. 1994. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*, 10: 1415-1419.
- PORRO, D., SAUER, M., BRANDUARDI, P. and MATTANOVICH, D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31: 245-259.
- POULSEN, P. B. and BUCHOLZ, K. 2002. History of enzymology with emphasis on food production. In: J.R. Whitaker (Editor) Handbook of Food Enzymology, Marcel Dekker Incorporated, pp. 11-20, New York, NY.
- PRIEST, F.G. 1993. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria In: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and R. Losick (Editors) *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, American Society for Microbiology, pp. 917-937, Washington D.C..
- REDDY, N.S., NIMMAGADDA, A. and SAMBASIVA RAO K.R.S. 2003. An overview of the microbial α -amylase family. *African Journal of Biotechnology*, 2(12): 645-648.

- ROMANOS, M.A., SCORER, C.A. and CLARKE, J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8: 423-488.
- RYDBERG, E.H., SIDHU, G., VO, H.C., HEWITT, J., COTE, H.C.F., WANG, Y.L., NUMAO, S., MACGILLIVRAY, R.T.A., OVERALL, C.M. BRAYER, G.D. and WITHERS, S.G. 1999. Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic alpha-amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Science*, 8(3): 635-643.
- SAJEDI, R.H., NADERI-MANESH, H., KHAJEH, K., AHMADVAND, R., RANJBAR, B., ASOODEH, A. and MORIDAN, F. 2005. A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 666-671.
- SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2,344 pp (3 book-set)
- SASAMOTO, H., NAKAZAWA, K., TSUTSUMI, K., TAKASE, K. and YAMANE, K. 1989. Signal peptide of *Bacillus subtilis* α -amylase. *Journal of Biochemistry*, 106: 376-382.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A.J. and WARD, O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1-17.
- SIVARAMAKRISHNAN, S., GANGADHARAN, D., NAMPOOTHIRI, K.M., SOCCOL, C.R. and PANDEY, A. 2006. α -Amylase from microbial sources – an overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2): 173-184.
- SLATTERY, C.J., KAVAKLI, I.H. and OKIDA, T.W. 2000. Engineering starch for increased quality and quantity. *Trends in Plant Science*, 5 (7): 291-298.
- SONENSHEIN, A.L., HOCH, J.A. and LOSICK, R. 1993. *Bacillus subtilis* and Other Gram Positive Bacteria, Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, ASM Press, Washington D.C., 987 pp.
- SONENSHEIN, A.L., HOCH, J.A. and LOSICK, R. 2002. *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives From Genes to Cells, ASM Press, Washington D.C., 629 pp.
- SRIMATHI, S. and JAYARAMAN, G. 2005. Effect of glycosylation on the catalytic and conformational stability of homologous α -amylases. *The Protein Journal*, 24 (2): 79-88.
- STODDARD, F.L. 2004. Starch: Chemistry. In: C. Wrigley, H. Corke and C. Walker (Editors), *Encyclopedia of Grain Science*, Elsevier, pp. 212-219, Kidlington.
- SYNOWIECKI, J., GRZYBOWSKA, B. and, ZDZIEBLO, A. 2006. Sources, properties and suitability of new thermostable enzymes in food processing. *Critical Reviews in Food Processing*, 46: 197-205.

- TAKASE, K., MIZUNO, H. and YAMANE, K. 1988. NH₂-terminal processing of *Bacillus subtilis* α -amylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 263 (23):11548-11553.
- TANYILDIZI, M.S., ÖZER, D. and ELİBOL, M. 2005. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 40: 2291-2296.
- TEXTOR, S.D., HILL, G.A., MACDONALD, D.G. and ST DENNIS, E. 1998. Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 76: 87-93.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. 2008. The Universal Protein Resource (UniProt) *Nucleic Acids Res.* 36:D190-D195 (database edition).
- TRAMOY, P. 2008. Review on the Enzyme Market. CBDM.T® Market and Business Intelligence. <http://www.lifescience-online.com/articles>.
- TSCHOPP, J.F. and CREGG, J.M. 1991. Heterologous gene expression in methylotrophic yeast. In: J.S. Rokem (Editor), *Biology of Methylophils*, Butterworth-Heinemann, pp. 305-322, Boston, MA.
- TULL, D., GOTTSCHALK, T.E., SVENDSEN, I., KRAMHØFT, B.A., PHILIPSON, B.A., BISGÅRD-FRANTZEN, H., OLSEN O. and SVENSSON B. 2001. Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic *Bacillus* α -amylase, produced in *P. pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21: 13-23.
- UGURU, G.C., ROBB, D.A., AKINYANJU, J.A. and SANI, A. 1997. Purification, characterisation and mutagenic enhancement of a thermoactive α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 273-279.
- ÜLGER, C. and ÇIRAKOĞLU, Ç. 2001. α -Amylase production by *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in different PEG solutions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 93-94.
- VAN DER BORGHT, A., GOESAERT, H., VERAVERBEKE, W.S. and DELCOUR, J.A. 2005. Fractionation of wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and factors involved. *Journal of Cereal Science*, 41(3):221-237.
- VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS and H., DIJKHUIZEN, L. 2002. Properties and applications of the starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology* 94: 137-155.
- VIHINEN, M. and MÄNTSÄLÄ, P. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 24 (4): 329-418.

- WACKETT, L.P. 2008. Biomass to fuels via microbial transformations. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12 (2): 187-193.
- WEGNER, E.H. 1983. U. S. Patent 4,414,329.
- WHITAKER, J.R 1996. Enzymes. In: O.R. Fennema (Editor), *Food Chemistry*, 3rd Ed., pp. 431-530.
- WINDISH, W.W. and MHATRE, N.S. 1965. Microbial amylases. *Advances in Applied Microbiology*, 7: 273-304.
- WONG, D.W., BATT, S.B., LEE, C.C. and ROBERTSON, G.H. 2004. High-activity barley α -amylase by directed evolution. *Protein Journal*, 23: 453-460.
- WONG, D.W.S. and ROBERTSON, G.H. 2002a. α -Amylases. In: J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen and D.W. Wong (Editors), *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker Incorporated, pp. 714-718, New York, NY.
- WONG, D.W.S. and ROBERTSON, G.H. 2002b. β -Amylases. In: J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen and D.W. Wong (Editors), *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker Incorporated, pp. 719-726, New York, NY.
- WUBBOLTS, M.G., BUCKE, C., BIELI S. 2000. How to get the biocatalyst. In: A.J.J. Straathof (Editor), *Applied Biocatalysis*, 2nd Edition, Harwood Academic Publishers, pp. 153-211, Amsterdam.
- YAMANE, K., HIRATA, Y., FURUSATO, T., YAMAZAKI, H. and NAKAYAMA, A. 1984. Changes in the properties and molecular weights of *B. subtilis* M-type and N-type α -amylases resulting from a spontaneous deletion. *Journal of Biochemistry*, 96 (6): 1849-1858.
- YANG, M., GALIZZI, A. and HENNER, D. 1983. Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 11: 237-249.
- ZHANG, X., XIE, S., WU, X., JIN, F. and LI, X. 1994. Purification and characterization of thermostable α -amylase II from *Bacillus sp-JF₂* strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 16: 985-990.
- ZHANG, N., DAUBARAS, D.L. and SUEN, W.C. 2005. Heterologous protein expression in yeasts and filamentous fungi. In: Z. An (Editor), *Handbook of Industrial Mycology*, Marcel Dekker, pp. 667-687, New York, NY.

7. EKLER

Ek-1. Çalışmalarda kullanılan çeşitli endonükleaz enzimleri ve bunlar için üretici firmanın tavsiye ettiği tepkime koşulları.

Endonükleaz	Kesim bölgesi	Tampon çözelti ^a	BSA ilavesi ^b	Tepkime sıcaklığı
<i>Bam</i> HI	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	Tampon 3 veya Tampon 2/4	var	37 °C
<i>Bgl</i> II	5'-AGATCT-3' 3'-TCTAGA-5'	Tampon 3	yok	37 °C
<i>Bst</i> EII	5'-GTNACC-3' 3'-CCANTGG-5'	Tampon 3	var	60 °C
<i>Cl</i> aI	5'-ATCGAT-3' 3'-TAGCTA-5'	Tampon 4	var	37 °C
<i>Eco</i> RI	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	<i>Eco</i> RI tamponu veya Tampon 1-4	yok	37 °C
<i>Hind</i> III	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	Tampon 2	yok	37 °C
<i>Kpn</i> I	5'-GGTACC-3' 3'-CCATGG-5'	Tampon 1	var	37 °C
<i>Nde</i> I	5'-CATATG-3' 3'-GTATAC-5'	Tampon 4 veya 2	yok	37 °C
<i>Not</i> I	5'-GCGGCCGC-3' 3'-CGCCGGCG-5'	Tampon 3	var	37 °C
<i>Pml</i> I	5'-CACGTG-3' 3'-GTGCAC-5'	Tampon 1	var	37 °C
<i>Sac</i> I	5'-GAGCTC-3' 3'-CTCGAG-5'	Tampon 1 veya 4	var	37 °C
<i>Stu</i> I	5'-AGGCCT-3' 3'-TCCGGA-5'	Tampon 4 veya Tampon 1-2	yok	37 °C
<i>Xba</i> I	5'-TCTAGA-3' 3'-AGATCT-5'	Tampon 4 veya 2	var	37 °C
<i>Xho</i> I	5'-CTCGAG-3' 3'-GAGCTC-5'	Tampon 4 veya Tampon 2-3	var	37 °C

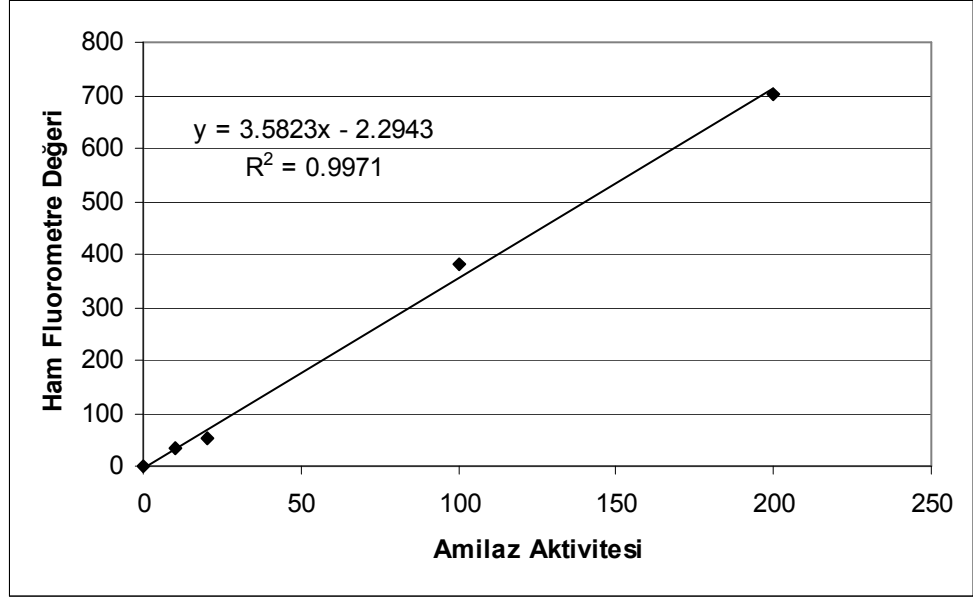
^a Tampon 1 (10 mM Bis-Tris-Propane-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol; 25 °C'de pH 7.0), Tampon 2 (10 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol; 25 °C'de pH 7.9), Tampon 3 (50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol; 25 °C'de pH 7.9), Tampon 4 (20 mM Tris-acetate; 50 mM potassium acetate; 10 mM Magnesium Acetate; 1 mM Dithiothreitol; 25 °C'de pH 7.9), *Eco*RI tamponu (100 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0.025 % Triton X-100; 25 °C'de pH 7.5)

^b BSA için konsantrasyon 100 µg/mL.

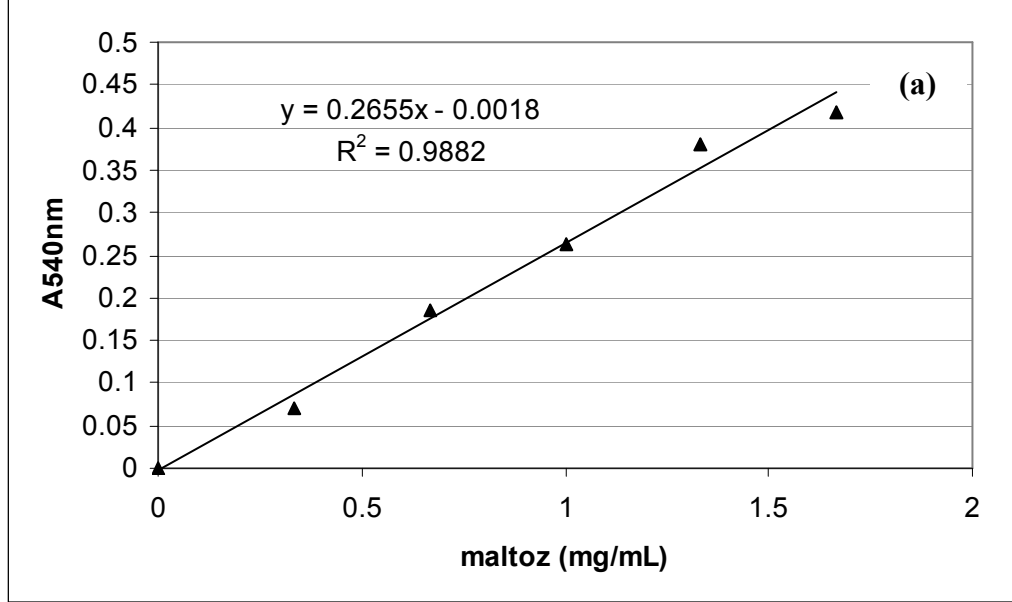
Ek-2. Tez çalışması süresince çeşitli PCR denemeleri için kullanılan primerler ve özellikleri.

Adı	Primer dizisi	Baz sayısı	T _m (°C)	% GC	MA
GWSPF	5'-GAATGTGACAGCATCTAACTATGGAC-3'	26	55.4	42.3	8,003
GWSPR	5'-GAATGTCCATAGTTAGATGCTGTGTCAC-3'	26	55.4	42.3	7,985
AP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	22	51.9	45.4	6,743
AP2	5'-ACAATAGGGCACGCGTGGT-3'	19	59.8	57.8	5,878
AmyEF	5'-GCCATTGACATCTCCG-3'	18	53.1	55.5	5,420
AmyER	5'-CAAATAAAGCACTCCCGC-3'	18	51.6	50.0	5,422
16SF	5'-GCTTGCTCCCTGATGTTAGC-3'	20	56.2	55.0	6,075
16SR	5'-TTGCTCCGTCAGACTTTCG-3'	19	55.0	52.6	5,746
INVF1	5'-CGAGTTCCAATACGGAGAAATCCTGC-3'	26	59.3	50.0	7,964
INVR1	5'-CAATCTGGTAAGAGGTCGGCTGGTAAAG-3'	28	60.4	50.0	8,718
INVF2	5'-TCACGAATACATCTGCCG-3'	18	52.0	50.0	5,444
INVR2	5'-GCCAATCTGGTAAGAGGTC-3'	19	52.6	52.6	5,853
AmyRSTOP	5'-TCAATGGGGAAGAGAACC-3'	19	54.4	52.6	5,911
AmyFATG	5'-ATGTTTGCAAAACGATTCAAAAC-3'	24	53.7	33.3	7,329
PYF1	5'-GCGGTCATCAATCATACCACC-3'	21	55.9	52.3	6,335
PYF2	5'-ATCGTAATCTGGGCGTGTCG-3'	20	57.2	55.0	6,164
PYF3	5'-GCAGGTTTCATCCTCTGTCTCT-3'	21	56.3	52.3	6,339
PYF4	5'-ACGAGGACCGAGAAATACAGTT-3'	22	55.7	45.4	6,802
PYR1	5'-GCGGCATAATCACTGGTGGT-3'	20	58.0	55.0	6,173
PYR2	5'-GACACGCCAGATTACGATTC-3'	21	55.8	52.3	6,3752
PYR3	5'-CTTGAAATGAACCCGCTCCAG-3'	21	56.3	52.3	6,375
PYR4	5'-TTTACCTGGCTCCAATGATTCG-3'	22	55.2	45.4	6,676
AmyFPml1	5'-TCACGTGGATGTTTGCAAAAC GATTCAAAAC-3'	31	60.3	38.7	9,527
AmyRKpn1	5'-AGGTACCTCAATGGGGAAGAGAACC-3'	25	59.9	52.0	7,749
APCOMP1	5'-CATTATGCTGAGTGATATCCCG-3'	22	53.0	45.4	6,725
APCOMP2	5'-TGTTATCCCGTGCGACCA-3'	19	59.8	57.8	5,740
AmyEMATF	5'-TGGAATTGGTCGTTCAATACG-3'	21	53.1	42.8	6,476
AmyEMATR	5'-TCACTGAGGAAGAGAACCGCT-3'	21	57.9	52.3	6,464
ADP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGC GTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTA-3'	49	72.9	61.2	15,164
ADP2	5'-/Phos/AGCTTACCAGCCC/3AmM/-3'	13	46.6	61.5	4,139

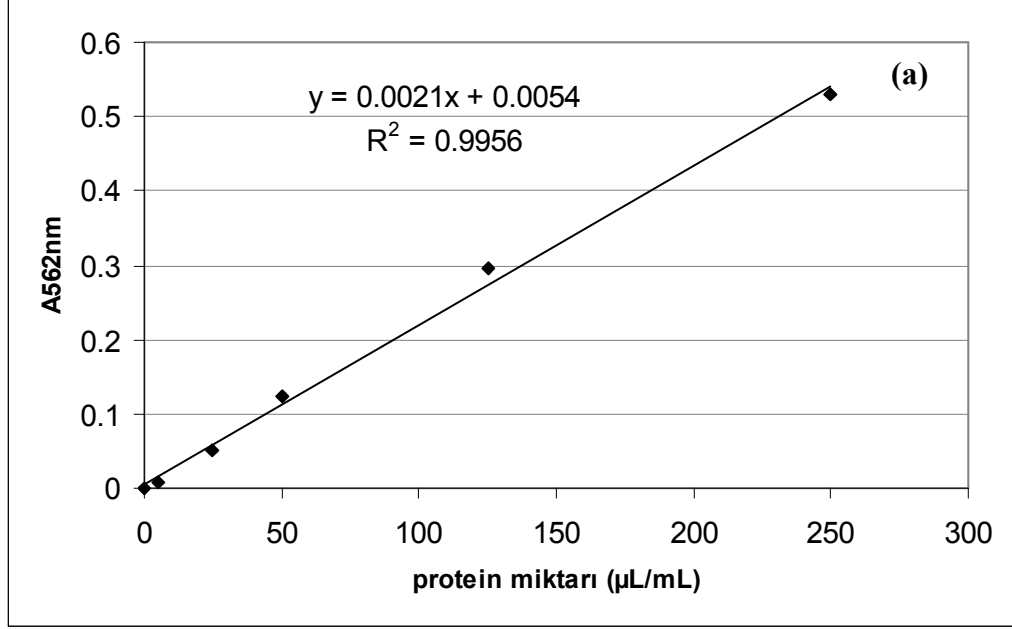
Ek-3. EnzCheck enzimatik analiz kiti ile gerçekleştirilen fluorometrik amilaz aktivitesi analizi için elde edilen standart eğriye bir rnek.



Ek-4. DNSA yöntemine uygun olarak gerçekleştirilen spektrofotometrik amilaz aktivitesi tayinleri için farklı derişimlerde maltoz çözeltileri ile hazırlanan standart eğriye bir örnek (a) ve okumanın gerçekleştirildiği analiz çözeltilerinin görüntüsü (b).



Ek-5. BCA protein tayini için kullanılan standart eğri için bir örnek (a) ve okumanın gerçekleştirildiği analiz çözeltilerinin görüntüsü (b).



Ek-6. DNA dizilerinde bulunan 64 kodon ve bunların kodladığı amino asitler (kısaltmalar parantez içinde belirtilmiştir)

1. baz		2. baz			
		T	C	A	G
T		TTT (Phe/F) fenilalanin	TCT (Ser/S) serin	TAT (Tyr/Y) tirozin	TGT (Cys/C) sistein
		TTC (Phe/F) fenilalanin	TCC (Ser/S) serin	TAC (Tyr/Y) tirozin	TGC (Cys/C) sistein
		TTA (Leu/L) lösin	TCA (Ser/S) serin	TAA (Stop/*) <i>dur</i>	TGA (Stop/*) <i>dur</i>
		TTG (Leu/L) lösin	TCG (Ser/S) serin	TAG (Stop/*) <i>dur</i>	TGG (Trp/W) serin
C		CTT (Leu/L) lösin	CCT (Pro/P) prolin	CAT (His/H) histidin	CGT (Arg/R) arjinin
		CTC (Leu/L) lösin	CCC (Pro/P) prolin	CAC (His/H) histidin	CGC (Arg/R) arjinin
		CTA (Leu/L) lösin	CCA (Pro/P) prolin	CAA (Gln/Q) glutamin	CGA (Arg/R) arjinin
		CTG (Leu/L) lösin	CCG (Pro/P) prolin	CAG (Gln/Q) glutamin	CGG (Arg/R) arjinin
A		ATT (Ile/I) izolösin	ACT (Thr/T) treonin	AAT (Asn/N) asparajin	AGT (Ser/S) serin
		ATC (Ile/I) izolösin	ACC (Thr/T) treonin	AAC (Asn/N) asparajin AAA	AGC (Ser/S) serin
		ATA (Ile/I) izolösin	ACA (Thr/T) treonin	(Lys/K) lizin	AGA (Arg/R) arjinin
		ATG (Met/M) metiyonin, <i>başlangıç</i>	ACG (Thr/T) treonin	AAG (Lys/K) lizin	AGG (Arg/R) arjinin
G		GTT (Val/V) valin	GCT (Ala/A) alanin	GAT (Asp/D) aspartik asit	GGT (Gly/G) glisin
		GTC (Val/V) valin	GCC (Ala/A) alanin	GAC (Asp/D) aspartik asit	GGC (Gly/G) glisin
		GTA (Val/V) valin	GCA (Ala/A) alanin	GAA (Glu/E) glutamik asit	GGA (Gly/G) glisin
		GTG (Val/V) valin	GCG (Ala/A) alanin	GAG (Glu/E) glutamik asit	GGG (Gly/G) glisin

ÖZGEÇMİŞ

Barçın KARAKAŞ 1973 yılında Ankara’da doğdu. İlköğreniminin ilk 3 yılını Ankara’da, kalan kısmını ve orta öğreniminin lise son sınıfa kadar olan bölümünü yurtdışında tamamladıktan sonra lise son sınıfı okuduğu Antalya Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. Lisans eğitimine, 1992 yılında girdiği Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde devam ederek 1997 yılında mezun oldu. Kesintisiz olarak özel bir şirkette 3 yıl çalıştıktan sonra 2000-2003 yılları arasında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans çalışmasını tamamladı. Ekim 2003’te Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora çalışmasına başladı. Aynı kurumda Araştırma Görevlisi olarak Aralık 2003’te atandığı görevine halen devam etmektedir.