

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

**YEM DEĞERİNİ ARTIRICI ENZİM GENLERİNİN
PROBİYOTİK ETKİLİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE
KLONLANARAK ÜRETİMİ**

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEM DEĞERİNİ ARTIRICI ENZİM GENLERİNİN PROBİYOTİK
ETKİLİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE KLONLANARAK
ÜRETİMİ**

Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

DOKTORA TEZİ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Bu Tez/...../2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....
Prof.Dr. Numan ÖZCAN
DANIŞMAN

İmza.....
Prof.Dr. H. Rüştü KUTLU
ÜYE

İmza.....
Prof.Dr. Burhan ARIKAN
ÜYE

İmza.....
Prof.Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
ÜYE

İmza.....
Doç.Dr. M. Sait EKİNCİ
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Zootečni Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma DPT Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: DPT.2005K120320-B

• **Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

YEM DEĞERİNİ ARTIRICI ENZİM GENLERİNİN PROBİYOTİK ETKİLİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE KLONLANARAK ÜRETİMİ

Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof.Dr. Numan ÖZCAN
Yıl: 2007, Sayfa: 140

Jüri: Prof.Dr. Numan ÖZCAN
Prof.Dr. H. Rüştü KUTLU
Prof.Dr. Burhan ARIKAN
Prof.Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Doç.Dr. M. Sait EKİNCİ

Fitazlar, bitkilerdeki fosforun ana depo formu olan fitatdan inorganik fosfatın serbest kalmasını sağlayarak gıda ve yemlerin besleyici değerini artıran enzimlerdir. Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* VTT E-68013'den fitaz geni (*phyC*) PCR tekniği ile çoğaltılmış ve pMK3F'yi oluşturmak için *Escherichia coli*-*Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3'e yerleştirilmiştir. pMK3F rekombinant vektörü ilk önce sıcaklık şoku yöntemi ile *E. coli*'ye aktarılmıştır. *E. coli*'den izole edilen pMK3F plazmidini kullanarak elektrotransfeksiyon yöntemi ile *Bacillus coagulans*'a aktarılmıştır. *E. coli* ve *B. coagulans*'dan elde edilen bu rekombinant plazmidlerin *HindIII* ve *BamHI* enzimleri ile kesilmesi sonucu agaroz jel'de, *phyC*'yi kodlayan 1300 bp büyüklüğündeki DNA fragmenti ile 7200 bp büyüklüğündeki pMK3 vektörü gözlenmiştir. pMK3F rekombinant vektörünün fitaz geni PCR ile çoğaltılmış ve agaroz jelde gözlenerek sonuçlar desteklenmiştir. Fitaz geni, *B. coagulans*'da klonlanmasına rağmen Buğday Kepeği Ekstraktı/Sodyum-fıtat/LB/Agar besi yerinde ve Buğday Kepeği Ekstraktı/Na-fıtat substratları içeren SDS-PAGE'de fitaz aktivitesi tespit edilememiştir.

β -(1,3-1,4)-glukanazlar (likenazlar), β -glukanlar ve likenanlar gibi β -1,3 ve β -1,4 bağları içeren düz β -glukanları hidrolize eden enzimlerdir. *Streptococcus bovis* kökenli likenaz geni pMK3Lik plazmidini oluşturmak için *E. coli*-*Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3'e yerleştirilmiştir. pMK3Lik rekombinant vektörü ilk önce *E. coli*'ye daha sonra da *B. coagulans*'a aktarılmıştır. *E. coli* ve *B. coagulans*'dan elde edilen bu rekombinant plazmidlerin *SmaI* enzimiyle kesilmesi sonucu agaroz jel'de 1800 bp'lik likenaz genine ait bant gözlenmiştir. pMK3Lik plazmidini taşıyan *E. coli* hücrelerinde hem LB/Likenan/Agar besi yerinde hem de SDS-Likenan-PAGE'de likenaz aktivitesi gözlenirken rekombinant *B. coagulans*'da enzim aktivitesi tespit edilememiştir.

Anahtar kelimeler: Fitaz, likenaz, *Bacillus coagulans*, probiyotik, klonlama

ABSTRACT

PhD THESIS

CLONING AND PRODUCTION OF FEED UPGRADING ENZYME ENCODING GENES IN PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA

Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

**DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor: Prof.Dr. Numan ÖZCAN

Year: 2007, Pages: 140

Jury: Prof.Dr. Numan ÖZCAN

Prof.Dr. H. Rüştü KUTLU

Prof.Dr. Burhan ARIKAN

Prof.Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Assoc.Prof. M.Sait EKİNCİ

Phytases can increase the nutritional value of food and feed by liberating inorganic phosphate from phytate, the major storage form of phosphorus in plants. In this study, the phytase gene (*phyC*) from *Bacillus subtilis* VTT E-68013 was amplified by PCR technique and inserted into pMK3 shuttle vector of *Escherichia coli*-*Bacillus* sp. to construct pMK3F. The recombinant vector, pMK3F, was firstly transferred into *E. coli* by heat-shock method. MK3F plasmid isolated from *E. coli* was used to introduce into *Bacillus coagulans* cells by electrotransformation. *HindIII* and *BamHI* digestion of the recombinant plasmids from *E. coli* and *B. coagulans* yielded 1300 bp fragment of DNA carrying the gene encoding *phyC* and 7200 bp fragment of pMK3 vector on agarose gel electrophoresis. Phytase gene of recombinant vector pMK3F was also amplified by PCR and visualized by agarose gel electrophoresis to support the results. Although phytase gene was cloned in *B. coagulans*, phytase enzyme activity was not detected on Wheat Bran Extract/Sodium-phytate/LB/Agar plates and SDS-PAGE gel contains Wheat Bran Extract/Na-phytate as substrats.

β -(1,3-1,4)-glucanases (lichenases) hydrolyse linear β -glucans containing β -1,3 and β -1,4 linkages such as β -glucans and lichenan. Lichenase gene originated from *Streptococcus bovis* was ligated with pMK3 shuttle vector of *E. coli*-*Bacillus* sp. to construct pMK3Lik. The recombinant vector, pMK3Lik, was firstly introduced into *E. coli* and then *B. coagulans*. Digestion of recombinant plasmids from *E. coli* and *B. coagulans* by *SmaI* was showed the 1800 bp lichenase gene band on agarose gel electrophoresis. Although *E. coli* cells carrying pMK3Lik was showed lichenase activity, the enzyme activity was not detected from recombinant *B. coagulans* cells on both LB/Lichenan/Agar plates and SDS-Lichenan-PAGE.

Key words: Phytase, lichenase, *Bacillus coagulans*, probiotic, cloning

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasında bana büyük emeği geçen, beni her konuda yönlendiren ve hiçbir yardımı esirgemeyen danışman hocam sayın Prof.Dr. Numan ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca tez süresince çalışmalarına katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi'nde bulunan diğer hocalarım Prof.Dr. Hasan Rüştü KUTLU ve Prof.Dr. Burhan ARIKAN'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez jürimde bulunan hocalarım Prof.Dr. Mehmet TOPAKTAŞ ve Doç.Dr. M. Sait EKİNCİ'ye de doktora tezime katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmaları sırasında katkılar sağlayan Dr. Ali İrfan GÜZEL'e çok teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarım süresince bana yardımlarından dolayı Yüksek Lisans öğrencileri Müge SAYICI ve Dilek TEKDAL'a ve Lisans öğrencilerinden M. Şeyda KOCABAŞ'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını projeye maddi yönden destekleyen DPT'ye de ayrıca teşekkür ederim.

Akademik hayatım süresince her türlü maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen babam, annem, kardeşim ve ailesi ve eşim Erdal ÖZÜSAĞLAM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XV
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Probiyotikler ve Hayvan Beslenmesindeki Önemi.....	2
1.2. <i>Bacillus coagulans</i> Bakterisinin Probiyotik Olarak Önemi.....	4
1.3. Kanatlı Rasyonlarında Enzim Kullanımı.....	8
1.4. $\beta(1,3-1,4)$ -Glukanaz (Likenaz) Enzimi.....	11
1.5. Fitaz Enzimi.....	15
1.6. PhyC ve PhyL Fitaz Enzimlerinin Özellikleri.....	19
1.7. Tezin Amacı ve Kapsamı.....	21
1.7.1. Araştırmanın Amacı.....	21
1.7.2. Kapsam.....	22
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
2.1. <i>Bacillus coagulans</i> Bakterisi İle İlgili Yapılan Moleküler ve Mikrobiyolojik Çalışmalar.....	23
2.2. Fitaz Enzimi İle İlgili Yapılan Bazı Moleküler ve Mikrobiyolojik Çalışmalar.....	26
2.3. $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) Enzimi İle İlgili Yapılan Bazı Moleküler ve Mikrobiyolojik Çalışmalar.....	29
3. MATERYAL VE METOD.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları.....	35
3.1.2. Kimyasallar.....	36
3.1.3. Aletler.....	36

3.2. Metod.....	36
3.2.1. Bakterilerin Besi Yerlerinde Fenotipik Testlerinin ve Antibiyogramlarının Yapılması.....	36
3.2.2. <i>Bacillus subtilis</i> VTT-E 68013 Bakterisine ait Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	37
3.2.2.1. Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) PCR ile Amplifikasyonu.....	37
3.2.2.1.(1). Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) Amplifikasyonu için Primer Dizaynı.....	38
3.2.2.1(2). <i>Bacillus subtilis</i> 'den Kromozomal DNA İzolasyonu ve RNA'dan Arındırılması.....	40
3.2.2.1(3). PCR Programlama.....	40
3.2.2.1(4). PCR Reaksiyonun Hazırlanması.....	41
3.2.2.1(5). PCR Ürününün Elektrophorezi ve Agaroz Jelden Arıtılması.....	42
3.2.2.2. Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) <i>Escherichia coli</i> 'ye Aktarılması.....	43
3.2.2.2(1). pRS416 Klonlama Vektörünün İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması.....	43
3.2.2.2(2). pRS416 Klonlama Vektörünün <i>SmaI</i> Endonüklazı ile Kesimi.....	44
3.2.2.2(3). Fitaz Geni (<i>phyC</i>) ile pRS416 Plazmid DNA'sının Ligasyonu.....	44
3.2.2.2(4). Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon.....	45
3.2.2.2(5). pRS416F (pRS416+Fitaz (<i>phyC</i>)) Plazmidini Taşıyan <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinin Belirlenmesi.....	45
3.2.2.2(6). <i>Escherichia coli</i> /pRS416F Kolonilerinden İzole Edilen Rekombinant Vektörlerin İnsört ve PCR Analizleri.....	46
3.2.2.3. Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) <i>Escherichia coli</i> - <i>Bacillus</i> sp. Mekik Vektörü pMK3 ile <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	46
3.2.2.3(1). Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) pMK3'e Ligasyonu.....	46
3.2.2.3(2). pMK3F Rekombinant Vektörünün <i>Bacillus coagulans</i> Bakterisine Elektrotansformasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Seçimi.....	48
3.2.2.3(3). <i>Bacillus coagulans</i> /pMK3F'ye İlişkin Plak Testleri.....	48
3.2.2.3(4). Rekombinant pMK3F'ye İlişkin Kesim ve PCR Analizleri.....	48
3.2.2.3(5). Değişik pH'lardaki Besi Yerinde Fitaz Aktivitesinin Tespiti.....	49

3.2.3. <i>Bacillus licheniformis</i> 'e ait Fitaz Geninin (<i>phyL</i>) pMK3	
Klonlama Vektörü ile <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	49
3.2.3.1. Fitaz Geninin (<i>phyL</i>) PCR ile Amplifikasyonu.....	49
3.2.3.1.(1). Fitaz Geninin (<i>phyL</i>) Amplifikasyonu için Primer Dizaynı.....	49
3.2.3.1(2). <i>Bacillus licheniformis</i> 'den Kromozomal DNA	
İzolasyonu ve RNA'dan Arındırılması.....	52
3.2.3.1(3). PCR Programlama.....	52
3.2.3.1(4). PCR Reaksiyonun Hazırlanması.....	53
3.2.3.1(5). PCR Ürününün Elektrophorezi ve Agaroza Jelden Arıtılması.....	54
3.2.3.2. Fitaz Geninin (<i>phyL</i>) <i>Escherichia coli</i> - <i>Bacillus</i> sp.	
Mekik Vektörü pMK3 ile <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	54
3.2.3.2(1). pMK3 Klonlama Vektörünün İzolasyonu	
ve Ligasyona Hazırlanması.....	54
3.2.3.2(2). pMK3 Klonlama Vektörünün <i>SmaI</i> Endonüklazı ile Kesimi.....	55
3.2.3.3(3). Fitaz Geninin (<i>phyL</i>) pMK3'e Ligasyonu.....	55
3.2.4. $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) Geninin	
<i>Escherichia coli</i> - <i>Bacillus</i> sp. Mekik Vektörü	
pMK3 ile <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	56
3.2.4.1. Likenaz Geninin pMK3 Vektörü ile	
<i>Escherichia coli</i> 'ye Aktarılması.....	56
3.2.4.1(1). pMK3 Klonlama Vektörünün ve pL1Hc Plazmidlerinin	
İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması.....	56
3.2.4.1(2). pMK3 Klonlama Vektörünün <i>SmaI</i> Endonüklazı ile Kesimi.....	57
3.2.4.1(3). Likenaz İnsörtünün Hazırlanması.....	58
3.2.4.1(4). Likenaz İnsörtünün Elektrophorezi ve	
Agaroza Jelden Arıtılması.....	58
3.2.4.1(5). Likenaz Geninin pMK3'e Ligasyonu.....	59
3.2.4.1(6). Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon.....	59
3.2.4.1(7). pMK3Lik (pMK3+Likenaz) Plazmidini Taşıyan	
<i>Escherichia coli</i> Kolonilerinin Belirlenmesi.....	59
3.2.4.1(8). <i>Escherichia coli</i> /pMK3Lik'e İlişkin Plak Testleri.....	60

3.2.4.2. Likenaz Geninin <i>Escherichia coli</i> - <i>Bacillus</i> sp. Mekik Vektörü	
pMK3 ile <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	60
3.2.4.2(1). pMK3Lik Rekombinant Vektörünün	
<i>Bacillus coagulans</i> Bakterisine Elektrottransformasyonu	
ve Rekombinant Kolonilerin Seçimi.....	60
3.2.4.2(2). <i>Bacillus coagulans</i> /pMK3Lik'e İlişkin Plak Testleri.....	60
3.2.2.3(3). Değişik pH'lardaki Besi Yerinde	
Likenaz Aktivitesinin Tespiti.....	61
3.2.5. Fitaz ve Likenaz Genlerini Taşıyan Rekombinant Bakterilere	
İlişkin SDS-PAGE ve Zymogram Analizleri.....	61
3.2.5(1). Bakterilerden Proteinlerin İzolasyonu.....	61
3.2.5(2). Bakterilere Ait Toplam Proteinlerin	
SDS-PAGE'de Karşılaştırılması.....	62
3.2.5(3). Bakteriyel Proteinlerin SDS-Buğday Kepeği Ekstraktı/	
Sodyum Fitat-PAGE ve SDS-Likenan-PAGE'de	
Karşılaştırılması.....	62
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	63
4.1. Bulgular.....	63
4.1.1 Bakterilerin Enzim Aktiviteleri ve Değişik Antibiyotiklere Dirençleri.....	63
4.1.2. Fitaz Geninin Klonlanmasına Yönelik Bulgular.....	65
4.1.2.1. <i>Bacillus subtilis</i> VTT E-68013'e Ait Fitaz Geninin (<i>phyC</i>)	
<i>Escherichia coli</i> 'ye Aktarılması.....	65
4.1.2.1(1). Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) PCR ile Amplifikasyonu.....	65
4.1.2.1(2). Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) pRS416 Vektörüne Ligasyonu.....	66
4.1.2.1(3). pRS416F (pRS416+Fitaz) Vektörünü Taşıyan	
Rekombinant <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinin Tespiti.....	66
4.1.2.1(4). <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinden pRS416F Plazmidinin	
İzolasyonu ve İnsört ve PCR Analizi.....	67
4.1.2.2. Fitaz Geninin (<i>phyC</i>) <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	69
4.1.2.2(1). Fitaz Geni (<i>phyC</i>) ile pMK3 Vektörünün Ligasyonu.....	69
4.1.2.2(2). pMK3F (pMK3+Fitaz) Vektörü Taşıyan	

Rekombinant <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinin Tespiti.....	69
4.1.2.2(3). <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinden pMKF Plazmidinin İzolasyonu ve İnsört ve PCR Analizi.....	70
4.1.2.2(4). Rekombinant pMK3F Plazmidinin <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	72
4.1.2.2(5). Rekombinant <i>Bacillus coagulans</i> Kolonilerinden pMK3F Plazmidinin İzolasyonu ve İnsört ve PCR Analizi.....	73
4.1.2.2(6). Değişik pH'lardaki Besi Yerinde Rekombinant Bakterilerin Fitaz Aktivitesinin Tespiti.....	74
4.1.2.2(7). Fitaz Genini (<i>phyC</i>) Taşıyan Rekombinant Bakterilerin SDS-PAGE'de Toplam Proteinleri Profillerinin İncelenmesi ve Zymogram Analizleri.....	76
4.1.2.3. <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 603'e Ait Fitaz Geninin (<i>phyL</i>) <i>Escherichia coli</i> 'ye Aktarılması.....	78
4.1.2.3(1). Fitaz Geninin (<i>phyL</i>) PCR ile Amplifikasyonu.....	78
4.1.2.3(2). Fitaz (<i>phyL</i>) Geninin pMK3 Vektörünün Oluşturulması ve Rekombinant <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinin Tespiti.....	79
4.1.2.3(3). <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinden pRS416F Plazmidinin İzolasyonu, İnsört ve PCR Analizi.....	80
4.1.2.3(4). <i>Escherichia coli</i> /pMKFM1 ve pMK3FM2 Rekombinant Kolonilerinin Besi Yerinde Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	82
4.1.3. β -(1,3-1,4)-Glukanaz (Likenaz) Geninin <i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	83
4.1.3.1. Likenaz Geninin <i>Escherichia coli</i> 'e Aktarılması.....	83
4.1.3.1(1). Likenaz Geni ile pMK3 Vektörünün Ligasyonu.....	83
4.1.3.1(2). pMK3Lik (pMK3+Likenaz) Vektörü Taşıyan Rekombinant <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinin Tespiti.....	84
4.1.3.1(3). <i>Escherichia coli</i> /pMK3Lik Rekombinant Kolonilerinin Besi Yerinde Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	84
4.1.3.1(4). Rekombinant pMK3Lik Plazmidinin	

<i>Bacillus coagulans</i> 'a Aktarılması.....	86
4.1.3.1(5). pMK3Lik Plazmidinin İzolasyonu ve İnsört Analizi.....	89
4.1.3.1.(6). Değişik pH'lardaki Besi Yerinde Rekombinant Bakterilerin Likenaz Aktivitesinin Tespiti.....	89
4.1.3.1.(7). Rekombinant Bakterilerin SDS-Likenan-PAGE'de Likenaz Aktivitesi Tayini ve SDS-PAGE'de Toplam Proteinleri Bakımından İncelenmesi.....	91
4.2. Tartışma.....	94
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	99
KAYNAKLAR.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	122
EKLER.....	123
EK-1. BESİ YERİ VE SOLÜSYONLAR.....	123
EK-2. PROTOKOLLER.....	132

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. <i>Bacillus</i> ve <i>Lactobacillus</i> cinsleri arasında yer alan <i>Bacillus coagulans</i> bakterisinin temel özellikleri.....	4
Çizelge 1.2. Bazı kanatlı yem maddelerindeki toplam fosfor, fitat fosforu ve toplam fosfordaki fitat fosfor oranları.....	10
Çizelge 1. 3. Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri.....	18
Çizelge 3.1. <i>phyC</i> fitaz geninin baz dizilimi ve kodladığı proteinin amino asit dizini.....	38
Çizelge 3.2. <i>PhyC</i> Fitaz geninin <i>B. subtilis</i> DNA'sından amplifikasyonu için Thermal Cycler'a uygulanan program.....	41
Çizelge 3.3. <i>PhyC</i> Fitaz geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.....	42
Çizelge 3.4. pRS416 vektörünün <i>SmaI</i> endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri.....	44
Çizelge 3.5. Fitaz geni (<i>phyC</i>) ile pRS416 vektörü için hazırlanan ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	45
Çizelge 3.6. Fitaz geni ile pMK3 vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	47
Çizelge 3.7. <i>phyL</i> fitaz geninin baz dizilimi ve kodladığı proteinin amino asit dizini.....	50
Çizelge 3.8. Fitaz geninin (<i>phyL</i>) <i>B. licheniformis</i> DNA'sından amplifikasyonu için Thermal Cycler cihazına uygulanan program.....	53
Çizelge 3.9. Fitaz geninin (<i>phyL</i>) amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri.....	54
Çizelge 3.10. pMK3 vektörünün <i>SmaI</i> endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri.....	55
Çizelge 3.11. Fitaz geni ile pMK3 vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	56
Çizelge 3.12. pMK3 vektörünün <i>SmaI</i> endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri.....	57
Çizelge 3.13. pL1Hc vektörünün <i>HincII</i> endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri.....	58

Çizelge 3.14. Likenaz geni ile pMK3 vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri...	59
Çizelge 4.1. Bakterilerin besi yerlerinde enzim aktiviteleri.....	64
Çizelge 4.2. Bakterilerin değişik antibiyotiklere dirençleri.....	65
Çizelge 4.3. Rekombinant bakterilerin değişik pH'larda üreme durumları.....	75
Çizelge 4.4. Rekombinant bakterilerin değişik pH'larda fitaz aktivitesi.....	76
Çizelge 4.5. Likenaz geni taşıyan rekombinant bakterilerin değişik pH'larda üreme durumları.....	90
Çizelge 4.4. Likenaz geni taşıyan rekombinant bakterilerin değişik pH'larda likenaz aktivitesi.....	91

Şekil 1.1. <i>Bacillus coagulans</i> bakterisinin Gram boyama sonrası görüntüsü.....	5
Şekil 1.2. Arpa β -glukanının $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar ile Enzimatik depolimerizasyonu	12
Şekil.1.3. Fitik asitin (A) ve fitik asit şelatının (fitat) (B) yapısı.....	15
Şekil 1.4. Fitik asitin (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis dihidrojen fosfat) mikrobiyal fitazlarla (EC 3.1.3.8) D-myo-inositol 1,2,4,5,6 pentakis dihidrojen fosfat ve inorganik fosfata hidrolizi.....	16
Şekil 1.5. PhyC ile PhyL ve diğer fitazların aminoasit sıraları.....	20
Şekil 1.6. <i>Bacillus</i> fitazlarının filogenetik ağacı.....	21
Şekil.3.1. <i>PhyC</i> Fitaz geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri.....	40
Şekil 3.2. pRS416 plazmidinin yapısı.....	43
Şekil 3.3. pMK3 plazmidinin yapısı.....	47
Şekil 3.4. <i>phyL</i> Fitaz geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri.....	52
Şekil 3.5. pL1Hc plazmidinin yapısı.....	57
Şekil 4.1. <i>B. subtilis</i> VTT E-68013 ve <i>B. coagulans</i> DSM1 suşlarının Buğday Kepeği Ekstraktı/MedyumI/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerinde fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	63
Şekil 4.2. <i>B. licheniformis</i> DSM 603 ve <i>B. subtilis</i> VTT E-68013 suşlarının Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerinde fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	64
Şekil 4.3. Fitaz genine ait PCR ürününün agaroz jelde görüntüsü.....	65
Şekil 4.4. LB/X-gal/Amp/Agar'lı besi yerinde pRS416F (pRS416+Fitaz geni) plazmidini taşıyan rekombinant <i>E. coli</i> kolonilerin seçimi.....	67
Şekil 4.5. pRS416F plazmidinin agaroz jelde insört analizi.....	68
Şekil 4.6. pRS416F plazmidinin yapısı.....	68
Şekil 4.7. LB/X-gal/Amp/Agar'lı besi yerinde pMK3F (pMK3+Fitaz geni) plazmidini taşıyan rekombinant <i>E. coli</i> kolonilerin seçimi.....	70

Şekil 4.8. pMK3F plazmidinin agaroz jelde insört analizi.....	71
Şekil 4.9. pMK3F plazmidinin yapısı.....	71
Şekil 4.10. A: MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde üreyen pMK3F plazmidini taşıyan rekombinant <i>B. coagulans</i> kolonileri ve kontrol plağı.....	72
Şekil 4.11. A: Orijinal <i>B. coagulans</i> ve fitaz genini taşıyan rekombinant <i>B. coagulans</i> bakterilerinin MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde üremesi, B: Orijinal <i>B. coagulans</i> ve fitaz genini taşıyan rekombinant <i>B. coagulans</i> bakterilerinin Buğday Kepeği Ekstraktı/MedyumI/Sodyum Fitat/Agar besi yerinde üremesi....	73
Şekil 4.12. <i>B.coagulans</i> /pMK3F plazmidinin agaroz jelde insört analizi.....	74
Şekil 4.13. Bakterilerin (<i>B. subtilis</i> VTT E-68013, <i>E. coli</i> /pMK3F, <i>B. coagulans</i> /pMK3F) değişik pH'larda Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar besi yerinde fitaz aktivitesi....	75
Şekil 4.14. Değişik bakterilere ait protein profillerinin SDS-PAGE'de karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.15. Bakterilerin değişik substratlar içeren SDS-PAGE'de renatürasyon sonrası enzim aktivitesi bakımından karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.16. Değişik bakterilerin nişastalı besi yerinde α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi.....	78
Şekil 4.17. <i>B. licheniformis</i> DSM 603 Fitaz genine ait PCR ürününün agaroz jelde görüntüsü.....	79
Şekil 4.18. Transformasyon sonrası X-Gal ve Ampisilin içeren katı besi yerinde oluşan mavi-beyaz koloniler.....	80
Şekil 4.19. pMK3FM1 ve pMK3FM2 plazmidlerinin agaroz jelde insört analizi.....	81
Şekil 4.20. pMK3FM1 plazmidinin yapısı.....	81
Şekil 4.21. pMK3FM2 plazmidinin yapısı.....	82
Şekil 4.22. <i>E. coli</i> /pMK3FM1 ve <i>E. coli</i> /pMK3FM2 bakterilerinin Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerinde fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	83
Şekil 4.23. pMK3Lık plazmidinin yapısı.....	84

Şekil 4.24. <i>E.coli</i> /DH5 α ve <i>E.coli</i> /pMK3Lik bakterisinin LB / Likenan / Ampisilin / Agar besiyerinde üreme durumları ve Likenaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	85
Şekil 4.25. <i>E.coli</i> /DH5 α ve <i>E. coli</i> /pMK3Lik bakterisinin LB/Likenan/Agar besiyerinde Likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	86
Şekil 4.26. MedyumI/Kanamisin/Agar besiyerinde üreyen pMK3Lik plazmidini taşıyan rekombinant <i>B. coagulans</i> kolonileri ve kontrol plağı.....	87
Şekil 4.27. <i>B. coagulans</i> ve <i>B. coagulans</i> /pMK3Lik bakterilerinin MedyumI/Likenan/Kanamisin/Agar besiyerinde üreme durumu ve Likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	88
Şekil 4.28. <i>B. coagulans</i> ve <i>B. coagulans</i> /pMK3Lik bakterilerinin MedyumI/Likenan/Agar besiyerinde üreme durumu ve Likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	88
Şekil 4.29. pMK3Lik plazmidinin agaroz jelde insört analizi.....	89
Şekil 4.30. Rekombinant bakterilerin değişik pH'larda LB/Likenan/Agar besiyerinde likenaz aktivitesi.....	90
Şekil 4.31. Değişik bakterilerin SDS-Likenan-PAGE'de renatürasyon sonrası likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması.....	92
Şekil 4.32. Değişik bakterilere ait protein profillerinin SDS-PAGE'de karşılaştırılması.....	93

SİMGELER VE KISALTMALAR

A, G, C, T	: Adenin, Guanin, Sitozin, Timin
Amp/Amp ^r	: Amfisilin/Amfisilin direnç geni
bç	: Baz çifti
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CFU	: Colony Forming Unit
CMC	: Karboksimetilselüloz
CMCaz	: Karboksimetilselülaz
dk	: Dakika
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
GRAS	: Genellikle Güvenilir Olarak Kabul Edilen (Generally Regarded as Safe)
Kan/Kan ^r	: Kanamisin/Kanamisin direnç geni
kbç	: Kilobaz çifti
kDa	: Kilodalton
K _m	: Michaelis constant
l	: Litre
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LB	: Luria Bertani
M	: Molar
mA	: Miliamper
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi (Multiple cloning site)
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
OD	: Optical Density

PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEG	: PolyEthylene Glycole
pmol	: Pikomol
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TCA	: Trichloroacetic Acid
TE	: Tris-EDTA
U	: Ünite
V	: Volt
VTT	: Technical Research Centre of Finland
X-gal	: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside
α	: Alfa
β	: Beta
μ F	: Mikrofarat
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
Ω	: Ohm
v/v	: Hacim/Hacim (volume/volume)
w/v	: Ağırlık/Hacim (weight/volume)

1. GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde hayvanın sağlıklı ve iyi bir performansa sahip olmasının büyük önemi vardır. Hayvanın büyüme hızı, yemden yararlanması ve sağlığı sindirim kanalının fonksiyonuyla yakından ilgilidir. Sindirim sisteminde patojenik mikroorganizmaların ve ishalin kontrolü amacıyla hayvan yemlerine katılmakta olan antibiyotikler ve büyüme uyarıcı maddeler bağırsaklarda patojen bakterilerle birlikte yararlı mikroorganizmaların da çoğalmasını engellemektedirler. Ayrıca patojen bakterilerin, kullanılan antibiyotik ve büyümeyi uyarıcı maddelere karşı zamanla direnç kazanması nedeniyle bu maddelerin etkilerinde azalma olmakta, bağırsak florasının tahrip edilmesiyle iyileşme gecikmekte ve çoğu kez de patojen bakterilerin bağırsak mukozasında dominant hale geçmesi ile sonuçlanmaktadır. Öte yandan, gereksiz antibiyotik kullanımına bağlı olarak kanatlı ürünlerinde antibiyotik kalıntıları meydana gelmektedir. Aynı zamanda bu kalıntılar, insanlarda gıda zehirlenmelerine neden olan ancak kanatlılarda önemli bir performans kaybı oluşturmeyen *Salmonella* ve *Campylobacter* gibi patojenik mikroorganizmalarda zamanla çoklu antibiyotik direncinin gelişmesine neden olmaktadır. Direnç kazanan patojenik mikroorganizmalarla kontamine kanatlı ürünleri insanlar tarafından tüketildiğinde, tedavi amaçlı olarak kullanılan antibiyotiklerin etkilerinde bir azalma meydana getirmektedir. Bu gibi durumlar da insan sağlığını tehdit etmektedir.

Bu nedenlerden dolayı antibiyotiklerin yerine kullanılabilecek yem katkı maddeleri üzerinde pek çok çalışma yürütülmekte olup organik asitler, prebiyotikler, çeşitli bitki ekstraktları ve probiyotikler gibi alternatif yem katkı maddeleri üzerinde durulmaktadır (Alp ve Kahraman, 1996).

Hayvan beslemede yemden yararlanma oranının artırılması için rasyonlara çeşitli enzimler katkı maddesi olarak ilave edilmektedir. Bu enzimler, bakteri, fungus ve maya gibi mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Ancak enzimler, direk yeme ilave edildiğinde midedeki asiditeden ve/veya proteaz aktivitesinden, pelete katıldığı durumlarda da peletleme sırasında 70-90°C'ye erişen yüksek sıcaklıktan dolayı denatüre olabilmektedir. Bu olumsuzluk kanatlıların bağırsak mikroflorasından seçilen

bakterilere enzim genleri aktararak ilgili enzimleri doğrudan bağırsakta üretmekle giderilebilir.

1.1 Probiyotikler ve Hayvan Beslenmesindeki Önemi

Probiyotikler, hayvanların sindirim kanalındaki mikrofloranın ekolojik dengesini düzene sokmak, mikroflora içerisindeki potansiyel patojen mikroorganizmaların zararlı hale gelmesini önlemek ve hayvanların yemden yararlanmalarını arttırmak gibi amaçlarla içme suyu ya da yem içerisine karıştırılarak verilen bir grup canlı bakteri, maya ve mantar kültürleri içeren biyolojik ürünlerdir (Fuller, 1989; Hooper, 1989; Aytuğ, 1989). Probiyotikler, birçok ülkede büyüme faktörü olarak sığır, koyun, keçi, domuz, kanatlı, at ve küçük ev hayvanlarının rasyon veya diyetlerinde 1970’li yıllardan beri kullanılmaktadır (Nemeskery, 1983; McCormick, 1984; Fuller, 1989; Vanbelle ve ark., 1990). Probiyotik mikroorganizmaların canlı olması ve en azından tek hücre proteini (Single Cell Protein-SCP) limitleri altında hayvanlara yedirilmesi gerekmektedir. Tek hücre proteini canlı veya ölü olarak hayvanlara verilebilir ancak hayvan bunu, protein, enerji ve vitamin olarak değerlendirir. Probiyotikler ise ölü olarak verildiğinde besleme açısından etkileri ihmal edilebilir. Probiyotikler yemlerin sindirimini artırmaktan çok, sindirim sisteminin sağlıklı çalışmasına ve genel bağışıklık sistemini güçlendirerek hayvanın sağlığı üzerine dolaylı etkiye bulunurlar.

İyi bir probiyotik; patojen olmamalı, mide ve duodenum’dan geçişi sırasında buradaki yüksek asitliğe toleranslı olmalı, ince bağırsağın üst kısmından geçişi sırasında safra tuzlarına karşı dirençli olmalı, bağırsak epitel hücrelerinde kısa sürede kolonize olup çoğalmalı, çeşitli organik asitleri üreterek bağırsağın pH’sını düşürmeli, antimikrobiyal maddeler üreterek patojen mikroorganizmaların sindirim sisteminde barınmalarını önlemeli, peletleme sırasında yüksek sıcaklığa toleranslı olup canlılığını sürdürmeli, yemlerde kullanılan antimikrobiyal maddelere dirençli olmalı, depolanma süresince canlılığını ve stabilitesini korumalı, konukçuya spesifik olmalı, antikor üretimini teşvik ederek bağışıklık sistemini güçlendirmelidir (Nousiainen ve Setälä, 1993; Tuncer, 2000).

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar genellikle *Lactobacillus* türleri (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*), *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *S. faecium*, *S. diacetylactis* ile *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *B. toyli* ve *B. licheniformis* gibi basiller ve *Aspergillus oryzae*, *Bifidus bifidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis candida* gibi bakteri, fungus ve maya kültürleridir (Jonsson, 1985; Wu, 1987; Aytuğ, 1989; Fuller, 1989, 1990).

Karma yem endüstrisinde kullanılan probiyotikler, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus* gibi bakteriler ve bazı mantar ve mayaları içermektedir. Probiyotik olarak kullanılan canlı kültürlerin iki temel formu bulunmaktadır: Bunlardan birincisi probiyotiklerin ısı ve neme duyarlı vejetatif formları olup, bu formlar mide asidinden etkilenebilmekte ve peletleme esnasında canlılıklarını kısmen kaybedebilmektedirler. İkincisi ise, güçlü mide asidinden, antibiyotiklerden, yüksek sıcaklık ve depolama süresinden doğal olarak korunmuş olan spor formlarıdır. Ancak tüm yararlı mikroorganizmaların özellikle Laktik Asit Bakterileri (LAB)'nin spor formu yoktur.

Ruminant probiyotiği olarak genellikle *S. cerevisiae* ve *A. oryzae* gibi mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Newbold, 1995). Bu mikroorganizmalar ile beslenen hayvanlarda selülitik bakteri popülasyonunun ve sindirimin arttığı bildirilmiştir (Van Horn ve ark., 1984; Weidmeier ve ark., 1987). Süt sığırlarında, *A. oryzae* katkılı yemle beslenen grupta süt veriminde %4.3 oranında, *S. cerevisiae* katkılı yemle beslenen grupta ise %5.1 oranında bir artışın olduğu gözlenmiştir (Wallace ve Newbold, 1992).

Genellikle kanatlı probiyotiği olarak kullanılan ve sindirim sisteminin doğal bir mikroflorası olan LAB ise; bağışıklık sistemini uyarıcı etkilerinin yanı sıra bağırsakta hızla kolonize olabilmeleri, mide ve safra asitlerine olan dirençleri ve laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriosin üretme yeteneklerinden dolayı önemli bir yere sahip olmalarına karşın sporsuz bakteriler oldukları için depolama süresince canlılıklarını kaybedebilmektedirler (Stavrik ve Kornegay, 1995; Noursiainan ve Setela, 1993). Ancak, LAB'lerinden olan *L. plantarum*'un *L. acidophilus*'a nazaran farklı çevre koşullarına daha dayanıklı olduğu bildirilmektedir (Anonymous, 1997).

Buna karşın, *Bacillus* grubu mikroorganizmalar spor oluşturabilmeleri nedeni ile oldukça stabil olup nem ve sıcaklık değişimlerine karşı dirençli olmalarından dolayı peletleme işlemi esnasında canlılıklarını koruyabilmektedirler. Maya ve *Streptococcus*lar, peletleme işlemi esnasında canlı kalabilme yetenekleri bakımından *Lactobacillus* ve *Bacillus* arasında yer almaktadır (Sissions, 1989; Dawson ve ark., 1990).

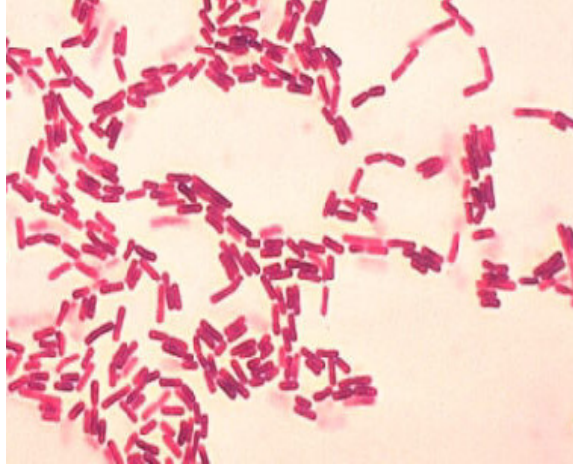
1.2. *Bacillus coagulans* Bakterisinin Probiyotik Olarak Önemi

Lactobacillus sporogenes bakterisi Horowitz-Wlassowa ve Nowotelnov tarafından (1933) izole edilerek tanımlanmış ve daha sonra *B. coagulans* ile benzer karakteristik özellikler göstermesi nedeni ile *B. coagulans* olarak sınıflandırılmıştır. “Bergey’s Manuel of Determinative Bacteriology” kitabının 8. baskısında; spor oluşturan, laktik asit üreten, fakültatif veya aerobik olan ve katalaz üretenlerin *Bacillus* cinsi içerisinde sınıflandırılması gerektiği bildirilmiştir. Bazı ticari ürünler halen *L. sporogenes* olarak etiketlenmekte ancak bunların *B. coagulans* olarak yeniden isimlendirilmesi gerekmektedir (Vecchi ve Drago, 2006). Öte yandan *B. coagulans* bakterisi, hücrede endosporun oluşum yeri (*B. coagulans*’da terminal; diğer *Bacillus*’larda sentral veya subterminal), sitokrom-c oksidazın olmayışı ve nitratı nitrite indirgeyememesi nedenleriyle de *Bacillus*’lardan farklılık göstermektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. *Bacillus* ve *Lactobacillus* cinsleri arasında yer alan *Bacillus coagulans* bakterisinin temel özellikleri (Vecchi ve Drago, 2006)

Özellikler	<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Katalaz	+	+	-
Oksidaz	-	+	-
Nitrat indirgeme	-	+	-
Spor	+	+	-
Hareketlilik	+	+	-/+
Laktik asit üretimi	+	-	+
Meso-diaminopimelik asit	+	+	-/+

Probiyotikler içerisinde yer alan *B. coagulans*; Gram (+), fakültatif ya da aerobik, patojen olmayan, laktik asit üreten ve sporlu bir bakteridir (Anonymous, 2003a) (Şekil 1.1.). Bakterinin gelişebildiği sıcaklık optimumu 35-50°C arasında olup pH optimumu 5.5-6.5 arasında değişebilmektedir. Asit üretmesine rağmen maltoz, manitol, rafinoz ve sükrozun fermentasyonundan gaz üretmemektedir. Asit üretmesinden dolayı süt ürünleri, meyve ve sebzelerde bozulmalara sebep olduğu bildirilmektedir (Anderson, 1984; Cosentino ve ark., 1997; Ramon-Blanco ve ark., 1999; DeClerk ve ark., 2004). Ancak bunun aksine laktik asit ve bazı suşların da termostabil alfa-amilaz gibi diğer ürünleri üretmesi nedenleriyle endüstriyel açıdan önem taşımaktadır (Payot ve ark., 1999; Batra ve ark., 2002; Yoon ve ark., 2002).



Şekil 1.1. *Bacillus coagulans* bakterisinin Gram boyama sonrası görüntüsü (Anonymous, 2006a)

Probiyotiklerin konakçıda yararlı olabilmesi için mide asidine, lizozime ve safra asidine dirençli olması gerekmektedir (Tuomola ve ark., 2001). Hyronimus ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada, üç *B. coagulans* suşunun (ikisi ticari, biri sığır dışkısından izole edilmiş (*B. coagulans* BCI₄) suşlar) pH 2.5 ve 3.0'da canlılıklarını sürdüremediklerini bildirmişlerdir. Bunun aksine, Adami ve Cavazzoni (1993)'nin yaptıkları çalışmada ise *B. coagulans* CNCMI-1061 suşunun, kanatlılarda probiyotik olarak kullanıldığında, vejetatif hücrelerin canlılıklarını %50 oranında koruduğunu belirlemişlerdir. Bu nedenle, aside direncin değişik *B. coagulans* suşlarında farklılık gösterebileceği sonucuna varılmıştır (Adami ve Cavazzoni, 1993). Safraya dirençlilik

açısından *B. coagulans* BCI₄ suşu az derecede de olsa toleranslı bulunmasına rağmen test edilen diğer iki suş hassas olarak sınıflandırılmıştır (Hyronimus ve ark., 2000).

Probiyotikler açısından mikroorganizmaların bağırsak epitel hücrelerine tutunması kolonizasyonun ilk aşaması olmasından dolayı önemli bir kriterdir (Tuomola ve ark., 2001). Ancak in-vitro çalışmaların çok fazla bulunmamasına rağmen domuzlarda yapılan bir çalışmada *B. coagulans*'ın bağırsak epiteline tutunma yeteneğinin olmadığı, geçici olarak bağırsakta kaldığı ve konakçıya verildikten bir hafta sonra dışarıya atıldığı bildirilmiştir (Adami ve Cavazzoni, 1993).

Probiyotiklerin mide ve safra asidine dirençli olması, bağırsak epitel hücrelerine tutunması gibi kriterlerin yanı sıra potansiyel patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermesi, işlenmesi ve depolanması süresince canlılığını ve stabilitesini devam ettirmesi de gerekmektedir. Probiyotiklerce organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit ve bakteriosinler gibi çeşitli antimikrobiyal maddeler üretilmektedir. Farelerde, *B. coagulans*'ın, bağırsakta vancomycin dirençli *Enterococ* yoğunluğunu azalttığı bildirilmektedir (Donskey ve ark., 2001). Ancak bazı araştırmacılar da *B. coagulans*'ın vancomycin dirençli *Entereococ*'ların gelişimini engelleyecek uçucu olmayan maddeleri üretme yeteneği olmadığını belirtmektedirler (Wilson ve Perini, 1988). Sığır dışkısından izole edilen *B. coagulans* I₄ suşunun, plazmid üzerinde kodlanan ve birçok patojen ve gıda bozulmalarına sebep olan mikroorganizmalar üzerine etkili olan Coagulin adı verilen bakteriosin benzeri maddeler üretmesi nedeniyle bazı *B. coagulans*'ların antimikrobiyal maddeler üretmesi, suşa bağlı bir özellik olarak görünmektedir (Hyronimus ve ark., 1998).

Probiyotiklerin teknolojik işlemlere dayanıklılığı, bunların pazarlanması sırasında canlılığını ve aktivitesini korumasına neden olur. Bu nedenle liyofilize olarak satılır ve işlem görme aşaması ve muhafazası sırasında da canlılığını sürdürmesi istenir. Mikroorganizmaların spor formları olumsuz çevre şartlarına vejetatif hücrelere nazaran daha dirençlidirler. Bu özellikten dolayı sporlar daha uzun süre canlılıklarını sürdürebilirler (Sanders ve ark., 2001). Kanatlılarda probiyotik amaçlı kullanılmak üzere liyofilize hale getirilmiş *B. coagulans* CNCM I-1061 suşunun (0.5×10^{11} CFU/g (%50 spor içeriyor)) 5 yıl sonrasında spor içeriği

değişmezken vejetatif hücre sayısının %20-30 azaldığı bildirilmektedir (Adami ve Cavazzoni, 1993).

B. coagulans bakterisinin spor formunun dış tabakası kalın olup ısıya, kimyasallara, aside ve radyasyona direnci yüksektir. Su veya yemle birlikte kanatlı hayvanlara verildiğinde ve uygun koşullarda (vücut sıcaklığı, asitliği, safra ve diğer salgılarda) spor formundan aktif vejetatif hücrelere dönüşebilmektedir. *B. coagulans*'ın spor formu termostabildir. Peletleme sırasında ve depolama süresince canlılığını koruyabilmektedir. Ayrıca spor formu, mide ve safra salgılarından etkilenmeden canlılığını sürdürebilmekte ve bağırsağa ulaştığında hızla kolonize olabilmektedir. Sindirim sistemine yerleştikten sonra laktik asit ve diğer antogonistik maddeler üreterek patojenik bakterilerin gelişmesini engellerken, bağırsakta *L. acidophilus*'un gelişimini teşvik etmektedir. Ancak bağırsağın doğal mikroflorası olmadığı için sporları (yarı konukçul (semi-resident)) vücuttan yavaş bir şekilde atılmaktadır. Bu nedenle probiyotik olarak kullanıldığında *B. coagulans*'ın hayvanlara günlük olarak verilmesi gerekmektedir (Anonymous, 2003b).

Yem katkısı olarak *B. coagulans*, kanatlılar ve domuz gibi hayvanlarda etkili bir şekilde büyümeyi uyarıcı etkiye sahiptir. Sindirimi artırır ve *E. coli* ve *Staphylococcus* gibi enfeksiyona neden olan bakterilere karşı koruyucu olarak görev yapar. Probiyotik olarak civcivlerde 1-2 milyon, broylerde ise 6-12 milyon spor önerilmektedir (Anonymous, 2003a).

Yapılan bir çalışmada *B. coagulans* ile beslenen (%0.04 oranında) civcivlerde kontrol grubuna göre canlı ağırlık kazancı önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca %0.04 *B. coagulans* ve %0.05 Zn-bacitracin ilavesi ile yem çevrim etkenliği oldukça artmıştır. *B. coagulans* bağırsak pH'sını düşürmekte ve fekal amonyak konsantrasyonunu önemli derecede azaltmaktadır. *B. coagulans* katkısı ile dışkıda *B. coagulans* ve *Lactobacillus* miktarı artmakta ve *Staphylococcus* ve *Coliform* miktarı azalmaktadır (Anonymous, 2003a).

Kanatlılarda yapılan başka bir çalışmada ise, probiyotik olarak *B. coagulans*'ın broylerde performansa etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada 3 grup oluşturulmuştur: Sadece standart diyetin verildiği kontrol grubu, standart diyet + virginamisin ve standart diyet + *B. coagulans* CNCM I-1061. Çalışma sonucunda

probiyotik katkılı diyetle beslenen grubun kontrol ve virginamisin katkılı gruplara nazaran performanslarının (canlı ağırlık, günlük canlı ağırlık kazancı ve yem dönüşüm oranı) daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar antibiyotiklerin oluşturduğu sakıncalı durumlardan dolayı (ette ve dışkıda antibiyotik kalıntılarının bulunması gibi) bu bakterinin antibiyotiklere alternatif olacak şekilde probiyotik amaçlı kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Cavazzoni ve ark., 1998).

Adami ve Cavazzoni (1998)'nin yaptıkları çalışmada, domuzlarda probiyotik olarak *B. coagulans*'ın dışkıdaki seçilen bakteri grupları üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada; kontrol grubu, *B. coagulans* CNCM I-1061'in probiyotik olarak verildiği grup ve yeme Zn-bacitracin ilave edildiği olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Seçilen bakteri grupları (LAB, *Lactococcus*, *Enterococcus*, aerobik ve anaerobik cocci, toplam ve fekal Koliform, *Clostridia*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*) 1. gün, 1, 4 ve 10. haftalarda belirlenmiştir. Çalışma sonunda, antibiyotiğe kıyasla probiyotik kullanımı ile *Enterococcus* ve Koliform (özellikle fekal koliform) miktarında azalma tespit etmişlerdir. Günlük *B. coagulans* verilmesi ile bu bakteri enterik mikroflaraya entegre olmuştur. Araştırmacılar bu probiyotiğin antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

1.3. Kanatlı Rasyonlarında Enzim Kullanımı

Hayvansal üretimde amaç birim masraf başına daha fazla ürün üretmektir. Kanatlı eti ve yumurtası üretiminde tüm masrafların yaklaşık %65-70 gibi büyük kısmını yem giderleri oluşturmaktadır. Yem maliyetinin önemli bir kısmını oluşturan ve kanatlı karma yemlerinde %60-70 düzeylerinde yer alan yem hammaddeleri mısır, buğday, arpa, çavdar, yulaf gibi tahıllardır (Polat ve ark., 1999).

Kanatlı yemlerinde fazla miktarda arpa ve buğday kullanıldığında bağırsakta viskozite artmakta ve yapışkan dışkı (sticky dropping) denilen fizyolojik bir rahatsızlık oluşmaktadır (Bedford, 1991). Bu olumsuzluklara sebep olan ve özellikle arpada %2-8 oranında bulunan $\beta(1,3-1,4)$ -glukan (Hesselman ve Aman, 1986; Hesselman ve Thomke, 1982) ve buğdayda bulunan arabinoksilanlardır. Tek mideli olan kanatlı hayvanlar selüloz, arabinoksilanlar, beta glukanlar, pektinler gibi nişasta

tabiatında olmayan polisakkaritleri enzimatik olarak sindiremezler ve bu maddelerce zengin yemlerden bu sebeple yeterli düzeyde yararlanamazlar. Bunun sonucu olarak, canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanmanın düşmekte ve bu nedenle etlik piliç rasyonlarında arpa ve buğday sınırlı düzeyde kullanılmaktadır (Bedford, 1991).

Selülitik enzimlerin rasyonlara karıştırılıp belli bir süre inkübasyona bırakılmasından sonra bu yemlerin hayvana yedirilmesi halinde, endosperm hücre duvarının yumuşaması ve buradaki polisakkaritlerin ince bağırsakta kısmi olarak parçalanıp yemde mevcut nişasta ve proteinlerin daha iyi sindirilmelerine ve etkili şekilde ete çevrilmesine sebep olmaktadır (Hesselman ve Aman, 1986). Ayrıca karışık bağı β -glukanaz enziminin kullanımı da kanatlılarda yapışkan dışkı oluşumunu ortadan kaldırarak bu tür yemlerin kanatlı rasyonlarında daha güvenli bir şekilde kullanılmalarına imkan vermektedir (Havenstein ve ark., 1992).

Arpa içeren rasyonlara β -glukanaz eklenmesi etlik piliçlerde yem çevrim etkinliğini ve canlı ağırlık artışını geliştirmekte, yumurtacılar da ise altlık nemliliğini azaltmaktadır. Arpa içeren rasyonlara enzim eklenmesiyle rasyonun sindirilebilirliği, buğday kontrol rasyonuna eşit veya daha fazla olmaktadır. β -glukanaz ilavesiyle tanenin hücre duvarı daha hızlı eridiğinden nişasta ve protein sindirimi ince bağırsağın daha ön kısımlarında meydana gelmektedir (Bedford, 1991).

Son yıllarda kanatlı yemlerinde fitaz enzimi kullanımı da gündeme gelmiştir. Fitaz tek mideli hayvanların sindirim sisteminde ya hiç ya da çok az üretilmekte fakat bu enzim bağırsakta yemlerle alınan fitatı parçalayamamakta ve dolayısıyla fitat fekal materyalde birikmektedir (Jongbloed ve ark., 1992; Iqbal ve ark., 1994; Maenz ve Classen, 1998). Bu nedenle fitat entansif hayvancılığın yapıldığı alanlarda fosfor kirliliğine neden olmaktadır. Özellikle yoğun olarak üretimi yapılan domuz ve kanatlı hayvanların yetiştiriciliğinde fosfor kirliliği global bir problem haline gelmiştir (Jongbloed ve ark., 1997). Ayrıca fitik asitin değişik tuzları antibesleyici etkiye sahiptir. Fitik asit, besleme açısından önemli olan kalsiyum, çinko, magnezyum ve demir gibi elementler ve proteinlerle suda çözünmez kompleksler oluşturmakta, bu da tahıl ve baklagillerin insan ve hayvanlarda besleyici değerini sınırlandırmaktadır (Harland ve Morris, 1995). Bu nedenlerden dolayı son yıllarda tek mideli hayvanlarda bitki fosforunun kullanımını artırmak ve fitik asitin değişik

tuzlarının olumsuz etkilerini elemine etmek için *Aspergillus* sp. fitazları yem katkısı olarak kullanılmaktadır (Mroz ve ark., 1994). Fitaz enzimi kullanımı Avrupa’da giderek yaygınlaşmış ve bazı Avrupa ülkelerinde bu zorunlu hale getirilmiştir (Kutlu, 2000).

Kanatlı karma yemlerinde kullanılan tahıllar ve küspelerdeki toplam fosforun yaklaşık 2/3’ü fitin fosforu (fitik asitin kalsiyum-magnezyum tuzları) formunda olup sindirim aktivitesi yokluğu nedeniyle kanatlı hayvanlarca yararlanılamamaktadır. Bu yemlere fitaz enzim ilavesi, fitin fosfordan yararlanmayı artırmakta, rasyonlarda inorganik fosfor (dikalsiyum fosfat gibi) kullanımını ve dışkı ile atılımını azaltmakta ve sonuç olarak çevre kirliliğini kontrol etmektedir. Rasyonlara ilave edilen fitaz enzimi aktivitesini myo-inositol-hekzafosfata bağlı fitik asiti tri-di ve mono fosfatlara ve ortofosfata dönüştürerek göstermektedir (Kutlu, 2000). Bazı kanatlı yem maddelerindeki toplam fosfor, fitat fosforu ve toplam fosfordaki fitat fosfor oranları Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Bazı kanatlı yem maddelerindeki toplam fosfor, fitat fosforu ve toplam fosfordaki fitat fosfor oranları (Selle ve Ravindran, 2006)

Yem Maddesi	Toplam P (g/kg)	Fitat-P (g/kg)	Oran (%)
Tahıllar			
Arpa	3.21	1.96	61.0
Mısır	2.62	1.88	71.6
Sorgum	3.01	2.18	72.6
Buğday	3.07	2.19	71.6
Yağlı Tohum Küspeleri			
Kanola küspesi	9.72	6.45	66.4
Pamuk tohumu küspesi	10.02	7.72	77.1
Soya fasulyesi küspesi	6.49	3.88	59.9
Yan Ürünler			
Pirinç kepeği	17.82	14.17	79.5
Buğday kepeği	10.96	8.36	76.3

Etlik piliçlerde yapılan çalışmalarda daha düşük monokalsiyum fosfat veya toplam fosfor oranlarında fitaz enzimi ilavesinin verim kayıplarını önlediği saptanmıştır (Schöner ve Hoppe, 1992; Simons ve Versteegh, 1993; Harter-Denis,

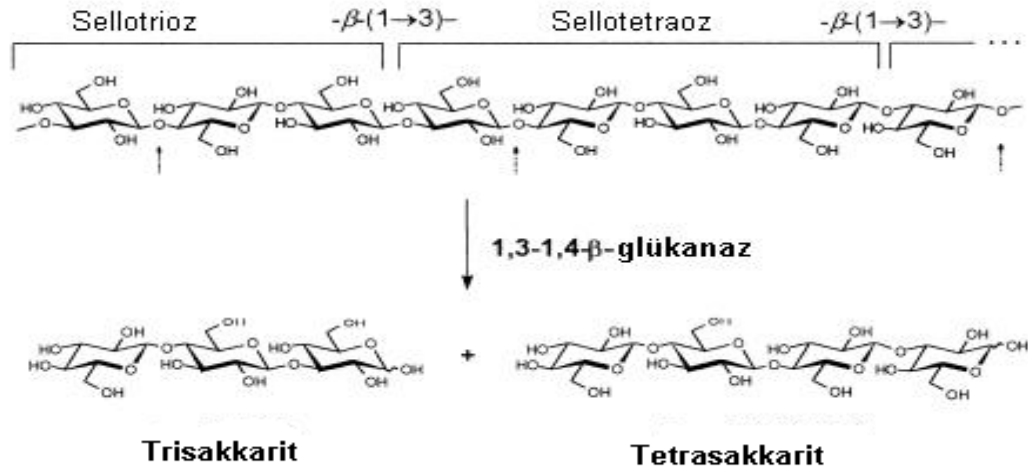
1999). Benzer sonuçlar bildiricın (Konca ve Bahtiyarca, 1996) ve hindilerde de (Ravindran ve ark., 1993) elde edilmiştir. Yumurta tavukları üzerinde yürütölen başka bir çalışmada ise, düşük toplam fosfor düzeylerine sahip karmalara fitaz ilavesi ile normal fosfor düzeylerinde elde edilenlere benzer verim alınabildiğı gözlenmiştir (Simons ve ark., 1992; Simons ve Versteegh, 1993; Gordon ve Roland, 1997). Midilli ve ark. (2003)'nın yürüttüğü bir çalışmada, broylerde, mısır-soyaya dayalı rasyonlara, mikrobiyal fitaz enziminin çeşitli düzeylerde katılmasının, canlı ağırlık ve yemden yararlanma oranları üzerine etkisinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde olumlu olduğı, deneme gruplarında yem tüketimi, kalsiyum, fosfor ve magnezyum miktarının yükseldiğı, karkas randımanlarının daha yüksek olduğı ve serum fosfor konsantrasyonunun matematiksel olarak artış gösterdiğini saptamışlardır.

1.4. $\beta(1,3-1,4)$ -Glukanaz (Likenaz) Enzimi

$\beta(1,3-1,4)$ -glukanlar, *Poaceae* familyası bitkilerinin hücre duvarı polisakkarit bileşikleri olup *Graminae* familyasının özellikle ticari öneme sahip arpa, sorgum, pirinç, buğday ve çavdar gibi tahılların endosperm hücre duvarında bulunur (Stone ve Clarke, 1992).

β -glukanlar genel olarak $\beta-1,4$ ana zincirine $\beta-1,3$ yan zincirlerinin bağlanmasıyla oluşmuştur. Arpa ve yulafın yapısında bulunan β -glukanın %85'inde 2 veya 3 adet $\beta-1,4$ bağı ile bağı ana zinciri 1 adet $\beta-1,3$ yan zinciri takip ederken, geriye kalan %15'inde çok sayıda $\beta-1,4$ bağına sahip ana zinciri 1 adet $\beta-1,3$ bağı izlemektedir (Classen ve Bedford, 1991).

Endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz, nişastalı tohumların endosperm duvarında bulunan karışık bağı $\beta(1,3-1,4)$ -glukanları hidrolize eden enzimdir (Lloberas ve ark., 1991). Arpa β -glukanının $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz ile hidrolizi sonucunda bir trisakkarit (3-O- β -cellobiosyl-D-glucopyranose) ve bir tetrasakkarit (3-O- β -cellotriosyl-D-glucopyranose) oluşmaktadır (Planas, 2000) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Arpa β -glukanının $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar ile enzimatik depolimerizasyonu (Planas, 2000)

Bitkilerin yanısıra bakteri, fungus gibi birçok mikroorganizma da önemli düzeyde $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz kaynağıdır. Ancak bitki ve mikrobiyal kaynaklı enzimler birbirlerinden aminoasit sıraları ve üç boyutlu yapıları gibi birtakım özellikler bakımından farklılıklar gösterirler. Bitki enzimleri glycosyl hidrolaz 17 familyasına ait iken, mikrobiyal enzimler glycosyl hidrolaz 16 familyasına aittir (Henrissat, 1991; Henrissat ve Bairoch, 1993, 1996).

Bakteriyel $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar bira sanayinde de önemli bir yere sahiptir. Malt yapımı sırasında endojen (içsel) $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar sıcaklıkla inaktif olurlar ve fazla miktardaki yüksek moleküler ağırlığa sahip β -glukanlar bira yapımının son aşamasında jelatinimsi görünümün yanı sıra düşük filtrasyon oranı ve ekstrakt veriminin düşmesi gibi önemli sorunlara neden olabilmektedirler. Bu nedenle sıcaklığa karşı dirençli bakteriyel $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar mashing (bira yapımında ezilmiş arpa ile su karışımı aşaması) sırasında viskoziteyi azaltmak için oldukça sık kullanılmaktadır (Stone ve Clarke, 1992; Godfrey, 1983). Hayvan yemlerine özellikle broyler ve domuz yemlerine bakteriyel β -glukanazları içeren enzimatik karışımların eklenmesiyle arpaya dayalı yemlerde sindirilebilirlik artmakta ve sağlıkla ilgili problemler (yapışkan dışkı oluşumu) azalmaktadır (Stone ve Clarke, 1992; White ve ark., 1983).

Birçok *Bacillus* türü likenaz enzimi üretmekte olup bunlardan *B. subtilis* (Cantwell ve McConnell, 1983; Murphy ve ark., 1984; Hinchliffe, 1984), *Bacillus amyloliquefaciens* (Hofemeister ve ark., 1986), *Bacillus macerans* (Borriss ve ark., 1988, 1990), *Bacillus circulans* (Bueno ve ark., 1990a, 1990b), *Bacillus polymyxa* (Gosalbes ve ark., 1991), *B. licheniformis* (Lloberas ve ark., 1991), *Bacillus brevis* (Louw ve Watson, 1993) ve alkalifilik *Bacillus* sp. N137 (Tabernero ve ark., 1994) bakterilerine ait likenaz genleri klonlanmış ve karakterize edilmiştir. *Bacillus* likenazları 25-30 kDa moleküler ağırlığında olup izoelektrik noktası pI 7.5-9.1, pH optimumu ise *B. brevis* (pH 9.0) ve alkalophilik *Bacillus* sp. N137 (%80'den fazla aktivitesini pH 7.0-12.0) enzimleri dışında nötr (pH 6.0-7.5) seviyesindedir. Enzimlerin sıcaklık optimumu bakteriler arasında farklılık göstermekte olup *B. polymyxa* likenazında 45°C (Borris ve Zemek, 1981), *B. subtilis* (Olsen ve ark., 1991), *B. amyloliquefaciens* (Olsen ve ark., 1991), *B. licheniformis* (Lloberas ve ark., 1988) kökenlilerde 55°C, *B. macerans* (Olsen ve ark., 1991), *B. brevis* (Louw ve Watson, 1993), *Bacillus* sp. N137 (Tabernero ve ark., 1994) kökenlilerde 65°C'dir. Spesifik aktivite 1200-4500 µmol/dk/mg (arpa beta glukanın hidrolizindeki indirgenen şeker miktarı) ve K_m değerleri arpa β -glukanı için 1,2-1,5 mg/ml ve likenan için 0,8-2 mg/ml'dir.

$\beta(1,3-1,4)$ -glukanazları kodlayan genler *Bacillus* olmayan türlerden de izole edilmiştir. Bunların ürettiği enzimlerin katalitik bölgeleri ile *Bacillus* kökenli enzimlerin katalitik bölgeleri arasında yüksek homoloji bulunurken, değişik fonksiyonlara sebep olan ek bölgelere de sahiptirler. *Ruminococcus flavefaciens*'deki *xynD* genini taşıyan DNA fragmenti ksilanaz (N ucunda) ve $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (C ucunda) alt ünitelerinden oluşan bifonksiyonel enzimi kodlar (Flint ve ark., 1989, 1993). *Clostridium thermocellum* *licB* geni, *Bacillus* enzimleriyle homoloji gösteren katalitik bölgeye sahip bir likenaz enzimi üretir (Schimming ve ark., 1991; Zverlov ve ark., 1994). *Fibrobacter (Bacterioides) succinogenes* likenaz gen ürününün katalitik bölgesi *Bacillus* ve *C. thermocellum* likenazları ile benzer amino asit sırasına sahiptir (Erfle ve ark., 1988; Teather ve Erfle, 1990). *Bacillus* kökenli olmayan $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar farklı fonksiyonlar gösteren ek bölgelerin bulunması nedeniyle, *Bacillus* enzimlerinden daha büyük olmasına rağmen benzer biyokimyasal

özellikler gösterirler: *R. flavefaciens* (90 kDa) (Flint ve ark., 1993), *C. thermocellum* (38 kDa, pH optimumu 6.6-10.0, sıcaklık optimumu 80°C) (Schimming ve ark., 1991), *F. succinogenes* (37 kDa, pH optimumu 6.0, sıcaklık optimumu 50°C) (Erfle ve ark., 1988). Fungal likenazlar da *Orpinomyces* (26 kDa, pH optimumu 6.0, sıcaklık optimumu 45°C) (Chen ve Ljungdahl, 1997) ve *Talaromyces emersonii*'den (40.7 kDa, pH optimumu 4.8, sıcaklık optimumu 80°C) (Planas, 2000) karakterize edilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada kullanılan *S. bovis* $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni *E. coli* ve tekrar *S. bovis*'de klonlanarak eksprese edilmiştir (Ekinci, 1997). Familya 16 $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlarını kodlayan genlerin rumen bakterisi *F. succinogenes* (Teather ve Erfle, 1990) ve *R. flavefaciens* (Flint ve ark., 1993)'den klonlandığı bildirilmiştir. *S. bovis* likenaz gen ürünü yaklaşık 26 kDa'dur. Enzim aktivitesi 50°C'ye kadar stabil iken bu sıcaklığın üzerine çıktıkça enzim aktivitesinde önemli derecede azalma meydana gelmektedir. Enzimin pH optimumu ise 6.5'dir. *S. bovis* β -glukanazı *C. thermocellum*, *B. subtilis* ve *R. flavefaciens* β -glukanazları ile sırasıyla %53.3, %55 ve %50.7 oranında benzerlik göstermektedir (Ekinci ve ark., 1997).

β -glukan endohidrolazların üç tipi; endo-1,4- β -glukanaz veya karboksimetilselülaz (EC.3.2.1.4), endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz veya likenaz (EC.3.2.1.73) ve β -glukan endohidrolaz veya endo-1,3(4)- β -glukanaz (EC.3.2.1.6)'dır. Bunların hepsi $\beta(1,3-1,4)$ -glukanlarını indirgeyebilir ancak substrat spesifiteleri arasında farklılıklar bulunur. *S. bovis*'in endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazının substrat spesifitesi ise likenan ya da arpa β -glukanı gibi karışık bağlı β -glukanlar ile sınırlıdır (Ekinci, 1997).

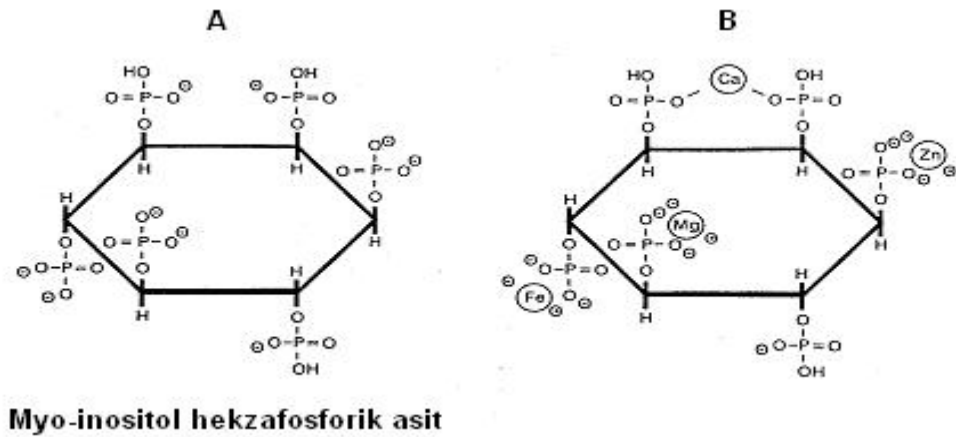
Bakteriyel $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar *E. coli*, *Bacillus* suşları, *S. cerevisiae* ve transgenik arpa ve tütün bitkileri gibi çeşitli canlılarda eksprese edilmiştir (Planas, 2000). Bunlardan *S. bovis* $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni *E. coli* ve tekrar *S. bovis*'de klonlanarak eksprese edilmiştir (Ekinci, 1997). Başlıca enzim aktivitesi *E. coli*'de hücre içindeyken gram pozitif bakterilerde hücre dışındadır. Bu gen aynı zamanda *Enterococcus faecalis*'e de aktarılmıştır (Ekinci, 1997).

Transgenik bitkiler termostabil bakteriyel likenazların ekspresyonunda konakçı olarak kullanılmıştır. Yeşil maltın fırında kurutulması esnasında yüksek sıcaklıktan zarar görmemesi amacıyla *B. amyloliquefaciens* ve *B. macerans*'dan bir hibrid $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzim geni de arpa bitkilerinde klonlanarak ve eksprese edilmiştir (Jensen ve ark., 1996; Hovarth ve ark., 2000).

Son zamanlarda funguslardan da $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzimi tespit edilmiştir. Likenaz'ı kodlayan ilk fungal gen anaerobik fungus *Orpinomyces*'den 1997 yılında klonlanmıştır (Chen ve Ljungdahl, 1997). Tahıl β -glukanları üzerine etkili üç enzim fungal bitki patojeni *Cochliobolus carbonum*'da belirlenmiştir (Gorlach ve ark., 1998). Bunlardan ikisi aynı gen (*MLG1*) tarafından üretilmekte olup karışık bağlı β -glukanların yanısıra 1,3- β -glukanlar üzerine de etkilidir. Üçüncü enzim muhtemelen likenaz olup bu genin klonlanması üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

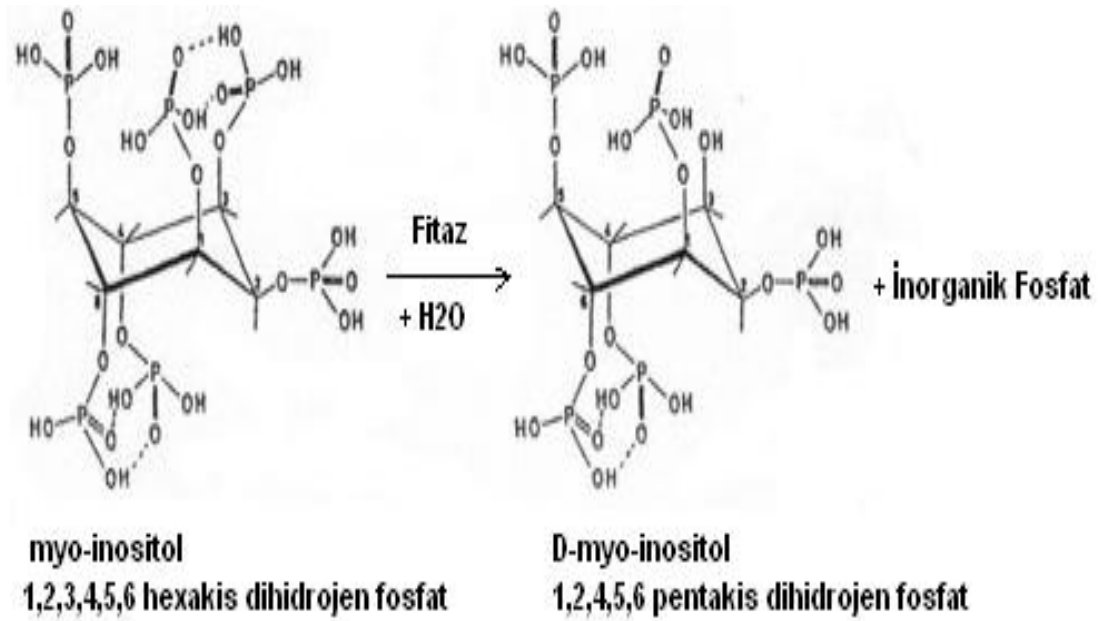
1.5. Fitaz Enzimi

Fitik asit; tahıl, baklagil ve yağlı tohumlarda fosforun ana depo formudur. Kimyasal olarak tam tarifi myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hekza-dihidrojen fosfat'tır (IUPAC-IUB, 1977). Fitik asitin tuzları fitat olarak tanımlanır. Fitat, fitik asitin potasyum-magnezyum ve kalsiyum tuzlarının karışımıdır (Şekil 1.3).



Şekil.1.3. Fitik asitin (A) ve fitik asit şelatının (fitat) (B) yapısı (Anonymous, 2006b)

Fitaz (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase), fitik asiti (myo-inositol hekzafosfat), inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositol'e hidrolize eden enzimdir (Kerovuo, 2000) (Şekil 1.4). Bitkilerde, hayvansal dokularda ve çeşitli mikroorganizmalarda fitaz aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (Miksch ve ark., 2002).



Şekil 1.4. Fitik asitin (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis dihidrojen fosfat) mikrobiyal fitazlarla (EC 3.1.3.8) D-myo-inositol 1,2,4,5,6 pentakis dihidrojen fosfat ve inorganik fosfata hidrolizi (Anonymous, 2006c)

Fitatı parçalayan enzimler IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry) tarafından iki sınıfa ayrılmıştır: Fitatın D3 pozisyonundaki ortofosfatı uzaklaştıran 3-fitaz (myo-inositol-hekzakisfosfat 3-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.8) ve myo-inositol halkasındaki L-6 (D-4) pozisyonundaki defosforilasyonu sağlayan 6-fitaz (myo-inositol-hekzakisfosfat 6-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.26). Mikrobiyal fitazlar genellikle 3-fitaz sınıfında yer alırken bitkisel kökenli fitazlar 6-fitaz sınıfında yer almaktadır (Konietzny ve Greiner, 2002).

Fitaz enzimi, bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunmasına rağmen yapılan son araştırmalar mikrobiyal fitazların biyoteknolojik

uygulamalar için en ümit verici olduğunu göstermiştir (Pandey ve ark., 2001; Vohra ve Satyanarayana, 2003). Bakteri, maya ve funguslardan fitaz enzimleri karakterize edilmiş olup, günümüzde ticari olarak fitaz enzimi üretiminde toprak fungusu olan *Aspergillus* üzerinde durulmaktadır. Ancak substrat spesifitesi, proteolizize karşı direnç göstermesi ve katalitik aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilmektedir (Konietzsyn ve Greiner, 2004).

Bakteriyel fitazların ortalama olarak moleküler ağırlığı (40-55 kDa) glukolizasyon farkı olduğu için fungal fitazlardan (80-120 kDa) daha küçüktür (Choi ve ark., 2001; Golovan ve ark., 2000; Han ve Lei, 1999; Kerovuo ve ark., 1998; Rodriguez ve ark., 2000a; Van Hartingveldt ve ark., 1993).

İzole edilen fitazların çoğunun pH optimumu 4.5-6.0 arasında yer almaktadır. Ancak *Bacillus* sp.'ye ait nötral veya alkali fitazlar da bulunmaktadır (Choi ve ark., 2001; Kim ve ark., 1998a). *Aspergillus niger* fitazının (phyA) pH optimumu ise asidik sınırlarda olup 2.5 ve 5.5'dir. Bu iki sınır arasında aktivitede azalma meydana gelmektedir. Mikrobiyal fitazların çoğunun sıcaklık optimumu ise 45-60°C arasında yer almaktadır. Ancak Pasamontes ve ark. (1997a,b), *A. fumigatus*'a ait sıcaklığa dirençli fitazın 100°C'ye kadar olan sıcaklıklarda 20 dakikalık inkübasyonlarda sadece %10'luk kayıpla aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Fitaz aktivitesi *Aerobacter aerogenes* (Greaves ve ark., 1967), *Pseudomonas* sp. (Irving ve Cosgrove, 1971), *B. subtilis* (Powar ve Jagannathan, 1982), *Klebsiella* sp. (Shah ve Parekh, 1990), *B. subtilis* (natto) (Shimizu, 1992), *E. coli* (Grenier ve ark., 1993), *Enterobacter* sp.4 (Yoon ve ark., 1996) ve *Bacillus* sp. DS11 (Kim ve ark., 1998a) gibi bakterilerde saptanmıştır. Sadece *Bacillus* ve *Enterobacter* grubu bakteriler ekstraselüler fitaz üretirken, *E. coli*'nin ürettiği fitaz periplazmik boşlukta birirmektedir (Kerovuo, 2000). Ayrıca *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *T. candida*, *Debaryomyces castelii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Schwanniomyces castelii*, *Aspergillus* sp. gibi maya ve funguslar da doğal olarak fitaz üretmektedir (Shieh ve Ware, 1968, Nayini ve Markakis, 1984; Lambrechts ve ark., 1992; Mochizuki ve Takahashi, 1999). Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri Çizelge 1.3'de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri (Greiner ve Konietzny, 2006)

Fitaz Kaynağı	pH optimumu	Sıcaklık optimumu (°C)	Spesifik aktivite (U/mg)
<i>Aspergillus niger</i>	2.2, 5.0-5.5	55-58	50-103
<i>Aspergillus terreus</i>	5.0-5.5	70	142-196
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5.0-6.0	60	23-28
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5	50	11
<i>Aspergillus caespitosus</i>	5.5	80	-
<i>Emmericella nidulans</i>	6.5	-	29-33
<i>Myceliophthora thermophila</i>	5.5	-	42
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6.0	65	110
<i>Penicillium simplicissimum</i>	4.0	55	3
<i>Penicillium lycii</i>	5.5	58	1080
<i>Cladosporium</i>	3.5	40	909
<i>Pichia anomala</i>	4.0	60	-
<i>Candida krusei</i>	4.6	40	1210
<i>Escherichia coli</i>	4.5	55-60	811-1810
<i>Klebsiella terrigena</i>	5.0	58	205
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.0, 5.5	50, 60	224, 297
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4.5, 5.2	68	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	4.5	60	23
<i>Citrobacter braaki</i>	4.0	50	3457
<i>Pseudomonas syringae</i>	5.5	40	769
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	4.0	45	-
<i>Bacillus subtilis</i>	6.5-7.5	55-60	9-15
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7.0-8.0	70	20

Fitaz enzimi üreten bu mikroorganizmalardan fitaz geni klonlanarak eksprese edilmiştir. *Bacillus* sp. fitazı *E. coli*'de (Kim ve ark., 1998b), *B. amyloliquefaciens* fitazı *B. subtilis*'de (Kim ve ark., 1999), *S. occidentalis* fitazı *Candida boidinii*'de (Nakamura ve ark., 1999), *A. ficuum* fitazı *Nicotiana tabacum*'da (Ullah ve ark., 1999), *A. fumigatus* fitazı *Pichia pastoris* (Rodriguez ve ark., 2000b) ve *A. niger*'de (Pasamontes ve ark., 1997a), *A. niger* fitazı, *E. coli*'de (Phillipphy ve Mullaney, 1997), *S. cerevisiae* (Han ve ark., 1999) ve *P. pastoris*'de (Yao ve ark., 1998; Han ve Lei 1999) klonlanmış ve eksprese edilmiştir.

1.6. PhyC ve PhyL Fitaz Enzimlerinin Özellikleri

B. subtilis VTT E-68013'e ait PhyC fitaz enziminin moleküler ağırlığı 43 kDa olup maksimum aktiviteyi pH 7.0 ve 55°C'de göstermektedir. Dar bir pH optimum sınırına sahip olup pH 7.0 ve 8.0 arasında maksimum aktivitesinin %60'ını gösterir. Enzim, fitik asit için oldukça spesifiktir. β -merkaptοethanol, dithiotreitol ve indirgenmiş glutathione gibi indirgeyici maddeler enzim aktivitesini önemli derecede etkilememektedir. Kuvvetli fosfat inhibitörü olan vanadate sadece yüksek konsantrasyonlarda (10 mM) %40 enzim aktivitesini inhibe etmekte olup diğer bir kuvvetli inhibitör olan fluroid yüksek konsantrasyonlarda bile enzim aktivitesini inhibe etmemektedir. Ancak diğer fitazların aksine PhyC yüksek substrat konsantrasyonlarında sadece orta derecede inhibe olmaktadır (16 mM fitik asit'te %30'dan daha az inhibisyon) (Kerovuo, 2000).

Kalsiyum, PhyC enzimi için önemli bir role sahiptir. Enzim, kalsiyum konsantrasyonlarını aşan molar konsantrasyonlarındaki EDTA gibi şelatlama kimyasallarınca tamamen inhibe olmaktadır. Bu durum muhtemelen enzimden Ca^{+2} iyonlarının uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Fitik asit konsantrasyonlarını aşan kalsiyum konsantrasyonları da enzimi inhibe etmektedir (Kerovuo, 2000).

PhyC enziminin termostabilitesi kuvvetli bir şekilde Ca^{+2} 'ye bağlıdır. Enzim, 5 mM Ca^{+2} varlığında, 60°C'de 10 dakika inkübasyon sonrasında %90 aktivitesini koruyabilmektedir. Ancak Ca^{+2} 'nin olmadığı aynı koşullarda enzim aktivitesi gözlenmemektedir. 5 mM Ca^{+3} varlığında 100°C'de 10 dakika inkübasyon sonrasında ise enzim %20 aktivite gösterebilmektedir. Ayrıca enzim, 100°C uygulandıktan sonra 25°C'de 1 saat inkübe edildiğinde %44 aktivitesini yeniden kazanabilmektedir. Ancak yeniden katlanma süresi uzatıldığında daha yüksek bir enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Bu sonuçlar PhyC'nin, diğer çoğu fitazların aksine termostabil bir enzim olduğunu, kalsiyumun kuvvetli bir stabilize edici özelliği olduğunu ve sıcaklıkla denatürasyondan sonra kısmen aktivitesini kazanabileceğini göstermiştir. Ancak Ca^{+2} 'nin olmadığı durumlarda denatürasyon sonrasında renatürasyonda Ca^{+2} 'nin olsa bile enzim tamir edilememektedir (Kerovuo, 2000).

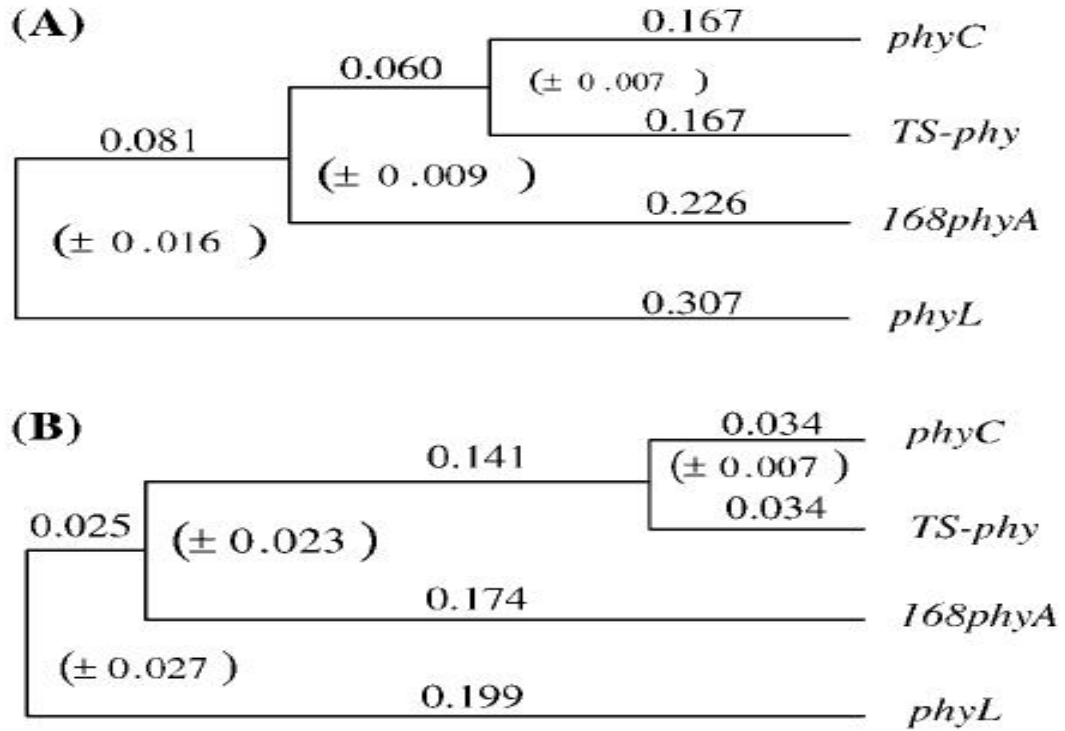
PhyC fitazı, kalsiyumun varlığında ve yokluğunda, papain, pankreatin ve tripsine karşı dirençlidir. Ancak kalsiyumun varlığı ve yokluğu durumunda pepsine karşı hassastır. Bu hassasiyet düşük pH sonucu enzimin denatüre olması enzimi pepsine daha hassas yapabilmektedir (Kerovu, 2000).

B. licheniformis DSM 603'e ait PhyL fitaz enziminin moleküler ağırlığı 47 kDa'dur. pH optimumu 7.0 olup sıcaklık optimumu 65°C'dir. PhyL enzimi, 1mM CaCl₂ varlığında 95°C'de 15 dakika inkübasyon sonrasında %61, 30 dakika sonra %40 aktivitesini tekrar kazanabilmektedir. PhyL fitazı 381 amino asiti kodlarken PhyC fitazı 383 aminoasitten oluşmaktadır. PhyL fitazının sinyal peptidi PhyC ile hiçbir benzerlik göstermemektedir (Şekil 1.5.) (Tye ve ark., 2002).

phyC	1	mnhsktlllt	aaaglmItcg	avssqakhkL	SDPYHFTVNA	AAETEPVDTA	50
TS-phy	1	mnhsktlllt	aaaglmItcg	avssqakhkL	SDPYHFTVNA	AAETEPVDTA	50
I68phyA	1	mkvpktlls	taaglllslt	atsvsa-HYV	NEEHHPKVT	HTETDPVASG	49
B.lich	1	mnfyktlls	tlaasls-P	SWSSLPHNEA	AAHKEFTVTA	DAETEPVDTP	49
phyC	51	GDAADPAIW	LDPKTPQNSK	LITTNKESGL	VVYSLDGKML	HSYNTGKLNN	100
TS-phy	51	GDAADPAIW	LDPKNPQNSK	LITTNKESGL	AVYSLEGKML	HSYHTGKLNN	100
I68phyA	50	DGAADPAIW	VHEKHPEKSK	LITTNKESGL	VVYDLGKQL	HSYFEGKLNN	99
B.lich	50	DGAADPAIW	VHPKQPEKSR	LITTNKESGL	IVYDLGKQL	AAYPFGKLNN	99
phyC	101	VDIRYDFPLN	GKKVDIAAAS	NRESEGKNTIE	IYAIDGKNGT	LQSMTPDHP	150
TS-phy	101	VDIRYDFPLN	GKKVDIAAAS	NRESEGKNTIE	IYAIDGKNGT	LQSITDPNHP	150
I68phyA	100	VDLRYDFPLN	GEKIDIAAAS	NRESEGKNTIE	VYAIDGDKGK	LKSITDPNHP	149
B.lich	100	VDLRYNPLD	GEKIDIAAGS	NRESEGKNTVE	IYAPDGEKSK	LENIVNPQKP	149
phyC	151	IATAINEVYG	FTLYHSQKTG	KYYAMVTGKE	GEFEQYELKA	DNGYISGKE	200
TS-phy	151	IASAIDEVYG	FSLYHSQKTG	KYYAMVTGKE	GEFEQYELNA	DNGYISGKE	200
I68phyA	150	ISTNISEVYG	FSLYHSQKTG	AFYALVTGKQ	GEFEQYELVD	GGKGYVTGKE	199
B.lich	150	IQTDIQEVYG	FSLYHSQKTG	KFYAMVTGKN	GEFEQYELFD	NGKQVVEGKE	199
phyC	201	VRAFKNNSQT	EGMAADDEYG	RLYIAEEDDA	IWKFSAEPDG	GSNGTVIDRA	250
TS-phy	201	VRAFKNNSQT	EGMAADDEYG	SLYIAEEDDA	IWKFSAEPDG	GSNGTVIDRA	250
I68phyA	200	VREFKLNSQT	EGLVADDEYG	NLYIAEEDDA	IWKFNAEPGG	GSKGQVVDRA	249
B.lich	200	VRSFKMSSQT	EGLAADDEYG	KMYIAEEDVA	IWSFSAEPDG	GDKGKIVDRA	249
phyC	251	DGRHLTRDIE	GLTIYYAADG	KGYLMASSQG	NSSYAIYDRQ	GKNKYVADFR	300
TS-phy	251	DGRHLTPDIE	GLTIYYAADG	KGYLLASSQG	NSSYAIYERQ	GQNKYVADFQ	300
I68phyA	250	TGDHLTADIE	GLTIYYAPNG	KGYLMASSQG	NNSYAMYERQ	GKNRYVANPE	299
B.lich	250	DGPHLTSDIE	GLTIYYGEDG	EGYLIASSQG	DDRYAIYDRR	GENDYVTAFS	299
phyC	301	ITDGPETDGT	SDTDGIDVLG	PGLGPEYPFG	IFVAQDGENI	DHGQKANQNF	350
TS-phy	301	ITDGPETDGT	SDTDGIDVLG	PGLGPEYPFG	LFVAQDGENI	DHGQKANQNF	350
I68phyA	300	ITDGEKIDGT	SDTDGIDVLG	PGLGPKYPYG	IFVAQDGENI	DNGQAVNQNF	349
B.lich	300	IEDGKEIDGT	SDTDGIDVIG	PGLGKTPYPG	IFVAQDGENI	ENGQAPANQNF	349
phyC	351	KIVPWRIAD	QIGPRPLANE	QVDPRKLTDR	SGK.....		383
TS-phy	351	KMVPWRIAD	KIGFHPQVNK	QVDPRKMTDR	SGK.....		383
I68phyA	350	KIVSWEQIAQ	HLGEMPDLHK	QVNPRKLDKR	SDG.....		382
B.lich	350	KIVSWEKID	ALDDKPDIDD	QVDPRKLKNR	AK.....		381

Şekil 1.5. PhyC ile PhyL ve diğer fitazların aminoasit sıraları (Sinyal peptidler küçük harflerle belirtilmiştir.) (Tye ve ark., 2002)

Bu sonuçlar filogenetik olarak PhyC ile PhyL'nin birbirinden uzak olduğunu göstermiştir. PhyL ile PhyC amino asit sırası bakımından %67, DNA baz sırası bakımından da %68 benzerlik göstermektedir (Tye ve ark., 2002) (Şekil 1.6.).



Şekil 1.6. *Bacillus* fitazlarının filogenetik ağacı. A: DNA seviyesinde filogenetik mesafe, B: Protein seviyesinde filogenetik mesafe (Tye ve ark., 2002)

1.7. Tezin Amacı ve Kapsamı

1.7.1. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı; Genetik Mühendisliği ve Biyoteknolojik Yöntemleri kullanarak bakteriyel kökenli fitaz ve $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) enzim genlerini, probiyotik bakteriler arasında yer alan *B. coagulans*'a aktarmak ve eksprese etmek; böylece yem iyileştirici enzimleri üreten yeni rekombinant probiyotikler geliştirmektir.

1.7.2. Kapsam

Bu tezin kapsamı aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

A) Fitaz Geni ile İlgili Kapsam

1. *B. subtilis* VTT E-68013'e ait veya başka bir bakteriyel orijinli (*B. licheniformis*) fitaz genini PCR tekniği ile bu bakterinin kromozomundan çoğaltarak, bu geni *E. coli-Bacillus* sp. mekik vektörü ile ara konakçı *E. coli*'de klonlamak,
2. Fitaz genini pMK3 vektörü aracılığıyla probiyotik etkili *B. coagulans* bakterisinde klonlamak ve eksprese etmek,
3. Fitaz geninin yerleştirildiği rekombinant vektörü izole ederek insört ve PCR analizlerini göstermek,
4. Fitaz genini taşıyan rekombinant *B. coagulans* ve *E. coli* suşları tarafından üretilen fitaz enziminin SDS-PAGE jelde moleküler ağırlıklarını ve enzim aktivitelerini belirlemektir.

B) $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) Geni ile İlgili Kapsam

1. $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) genini *E. coli-Bacillus* sp. mekik vektörü (pMK3) ile ara konakçı *E. coli*'de klonlamak,
2. Likenaz genini pMK3 vektörü aracılığıyla probiyotik etkili *B. coagulans* bakterisinde klonlamak ve eksprese etmek,
3. Likenaz geninin takıldığı rekombinant vektörü izole ederek insört analizi ile göstermek,
4. Likenaz genini taşıyan rekombinant *B. coagulans* ve *E. coli* suşları tarafından üretilen Likenaz enziminin SDS-PAGE jelde moleküler ağırlıklarını ve enzim aktivitelerini belirlemektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Bacillus coagulans* Bakterisi İle İlgili Yapılan Moleküler ve Mikrobiyolojik Çalışmalar

Cornelis ve ark. (1982), *EcoRI* enzimiyle kısmen kesilmiş *B. coagulans* kromozomal DNA'sını bakteriofaj lambda vektör sistemiyle *E. coli* K12'de klonlamışlar ve termostabil α -amilaz enzim aktivitesini petri plaklarında iyodin boyama yöntemiyle belirlemişlerdir. Araştırmacılar üzerinde kendine ait promotörü bulunan aktif geni içeren 3.31 kbç büyüklüğündeki *EcoRI* fragmentini pBR322 vektörüne yerleştirerek pAMY2 oluşturmuşlardır. Amilaz enziminin periplazmik olduğunu ve moleküler büyüklüğünün 60.000 Da olduğunu bildirmişlerdir.

Sekiguchi ve ark. (1984), *B. coagulans* bakterisinden beta-isopropylmalate dehidrogenaz (2-hydroxy-4-methyl-3-carboxyvalerate:NAD⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.85) genini *E. coli* C600 bakterisinde klonlamış ve eksprese etmişlerdir. Araştırmacılar saflaştırdıkları enzimin eşit moleküler ağırlığa sahip iki alt üniteden oluştuğunu bildirmişlerdir. Enzim aktivitesi 0.5 mM Mn⁺², Mg⁺² ve Co⁺² varlığında artmaktadır. Enzim, 0.2 mM p-choloromercuribenzoate tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edilmekte ancak inhibasyon 1 mM dithiothreitol ile tamamen ortadan kalkabilmektedir.

Suzuki ve Tomura (1986), *B. coagulans* ATCC 7050'den (fakültatif termofil) oligo-1,6-glukosidaz'ı saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığının 60.000 Da ve izoelektrik noktasının 4.3 olduğu bildirmişlerdir. Proteinin amino ucundaki terminal aminoasiti threonin'dir. Araştırmacılar bu enzimin, *Bacillus cereus* ATCC 7064 (mezofil) ve *Bacillus thermoglucosidasius* KP 1006 (obligat termofil) ile homoloji gösterdiğini ve aminoasit kompozisyonlarındaki prolin içeriğine göre termostabilitenin arttığını (mezofil-fakültatif / termofil-obligat/termofil) belirtmişlerdir.

Kitazono ve ark. (1992), *B. coagulans*'dan prolin iminopeptidaz'ı kodlayan geni klonlamış, baz dizisi belirlemiş ve *E. coli*'de eksprese etmişlerdir. Enzimi kodlayan gen 861 bç'den oluşmakta ve 287 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Araştırmacılar *tac* promotor bölgesi taşıyan vektörle klonlama sonucunda, bu

promotoru taşımayan ilk klonu göre, 200 kat daha fazla ekspresyon sağlamışlardır. SDS-Poliakrilamid jel deneyleri sonucunda enzimin moleküler ağırlığının 33 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Hyronimus ve ark. (1998), sığır dışkılarından proteaza hassas, antibakteriyel maddeler üreten *B. coagulans* I4 suşunu izole etmişler ve bu bakterinin bakteriosin benzeri ürettiği engelleyici maddeye Coagulin adı vermişlerdir. Coagulin'in 60°C'de 90 dakika stabil kaldığını, optimum pH aralığının 4-8 olduğunu ve α -amilaz, lipaz ve organik solventlerden (%10 v/v) etkilenmediğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, coagulin'in indikatör hücrelere karşı bakterisidal ve bakteriyolitik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Coagulin'in SDS-PAGE'de moleküler ağırlığını yaklaşık 3-4 kDa olarak belirlemişlerdir.

Keating ve ark. (1998), *B. coagulans*'ın ürettiği α -amilaz enziminin maltoz hidrolizi için pH optimumunun 5.0, nişastanın hidrolizi için ise 6.0 olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptıkları deneyler sonucunda, *B. coagulans*'a ait α -amilaz enziminin farklı substratlara göre pH optimumunun değiştiğini bildirmişlerdir.

Batra ve ark. (2002), bir sıcak su kaynağından izole edilen *B. coagulans* RCS3 suşunun önemli derecede β -galaktosidaz enzimi ürettiğini belirlemişlerdir. Enzim üretiminin maksimum 50°C'de olmasına rağmen en yüksek enzim aktivitesinin 65°C ve enzimin yarılanma süresinin 2 saat olduğunu tespit etmişlerdir. Sıcaklıkta 2°C'lik düşüşün enzimin yarılanma süresini 15 saate artırdığını ancak enzim aktivitesini önemli derecede değiştirmediklerini bildirmişler ve bunun sonucu olarak da iyi bir enzim aktivitesi ve stabilizasyonu için 63°C'yi önermişlerdir. β -galaktosidaz enzimi pH 5-8 arasında stabil iken en yüksek aktiviteyi pH 6-7 arasında göstermiştir. Yapılan tüm deneyler sonucunda termostabilitesi, pH stabilitesi ve iyi bir hidrolitik kapasiteye sahip olması nedenleriyle bu enzimin süt endüstrisi için önemli olabileceği bildirilmiştir.

Yoon ve ark. (2002), *B. coagulans* CK108'e ait termostabil kitozanaz (chitosanase) TCH-2 geninin belirlenen DNA baz sırasının 843 bp'den oluştuğunu ve 280 amino asitlik bir sinyal peptidi kodladığını (32 kDa) bildirmişlerdir. *B. coagulans* CK108'e ait kitozanaz enziminin amino asit sırasının %61.6, %48, %12.6

oranlarında sırasıyla *B. ehemensis*, *B. circulans*, *B. subtilis* ile benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar saflaştırdıkları enzimin yarılanma ömrünün 90°C’de 40 dakika olduğunu ve 37°C’de 30 dakika üre ve guanidin HCl gibi denatürantlarla muamele edildiğinde %50 aktivitesini koruduğunu belirlemişlerdir.

Svadbina ve ark. (2003), termofilik *B. coagulans* K. suşundan iki DNA metiltransferazı, M.BcoKIA ve M.BcoKIB, izole etmişler ve her iki metilazın 5'-CTCTTC-3'/5'-GAAGAG-3' bölgelerini aynı bakteri tarafından üretilen restriksiyon endonükleaz *BcoKI*'a karşı koruduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları deneyler sonucunda M.BcoKIBN6-adenine spesifik metilaz ve M.BcoKIA'nın ise N4-sitozine spesifik metilaz olduğunu belirlemişlerdir. M.BcoKIA, 5'-CTCTTC-3'sirasındaki ilk sitozini metillediğini tespit etmişlerdir.

Mnisi ve ark. (2005), *B. coagulans* 81-11'in genomik kütüphanesini lipolitik aktivite için *E. coli* JM83'de taramışlardır. Lipolitik aktivite veren klondan 2.4 kbç büyüklüğündeki fragment subklonlamış ve DNA baz sırasını belirlemişlerdir. Genin, nükleotid sırasının belirlenmesi sonucunda, 723 bç büyüklüğünde, 240 amino asiti kodlayan ve 27.528 Da büyüklüğünde açık okuma dizisine (ORF) sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar enzimin maksimum aktivitesinin pH 8.0 ve 50°C olduğunu belirlemişlerdir.

Raha ve ark. (2006), *B. coagulans* ST-6 suşundan termostabil ksilanaz genini *L. lactis*'de eksprese etmişlerdir. 750 bç büyüklüğündeki gen çoğaltılarak pMG36e plazmidinin *NheI* kesim noktası içine subklonlama ile klonlamış ve *E. coli* ve *L. lactis*'e transforme etmişlerdir. Araştırmacılar termostabil ksilanaz genini hem *E. coli*'de hem de *L. lactis*'de eksprese etmişlerdir. pMG36e-Xy plazmidini taşıyan *L. lactis*'in bakteriyel kültüründe enzim aktivitesini 390 µg ksiloz/ml/30 dk, plazmid taşımayan hücre kültüründe (negatif kontrol) ise bu miktar 40 µg ksiloz/ml/30 dk olarak bulmuşlardır. Oluşturulan bu reporter vektörünün *E. coli*'nin yanısıra *Lactococcus* için de reporter sistem olarak bir potansiyel oluşturacağı ve *Lactococcal* vektör sistemleri içine dahil edilebileceğini bildirmişlerdir.

Rhee ve ark. (2007), *B. coagulans* bakterisine plazmid DNA aktarmak amacıyla bir elektroporasyon yöntemi geliştirmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda *B. coagulans* P4-102B suşunda bulunan doğal plazmid pMSR0'ın *rep* orijinini içeren

pMSR10 *B. coagulans*/*E. coli* mekik vektörünü de geliştirmişlerdir. Bir takım *Bacillus*/*E. coli* mekik plazmid vektörleri *B. coagulans*'a aktarılamamasına rağmen *Geobacillus stearothermophilus* için geliştirilen pNW33N plazmidini bu bakteriye aktarmışlar ve bakteride stabil bir şekilde kaldığını tespit etmişlerdir. *B. coagulans* P4-102B suşuna, pNW33N ve pMSR10 plazmidlerinin elektrotransformasyonla aktarılmasında transformasyonun etkenliğini 1.5×10^{16} /mol DNA olarak bulmuşlardır.

2.2. Fitaz Enzimi İle İlgili Yapılan Bazı Moleküler ve Mikrobiyolojik Çalışmalar

Shimizu (1992), *B. subtilis* (natto) N-77 suşundan ekstraselüler fitaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin, jel filtrasyonunda moleküler büyüklüğünü 36 kDa, SDS-PAGE'de ise 38 kDa olarak belirlemişler ve monomerik bir protein olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin izoelektrik noktasının pI 6.25 olduğunu ve üretimi ve aktivitesi için Ca^{+2} 'nin gerekli olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, fitazın fitata bağlı aktivite gösterdiğini ve maksimum aktivitenin pH 6.0-6.5 ve 60°C'de olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesi, EDTA, Zn^{+2} , Cd^{+2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} ve Al^{+3} gibi madde ve iyonlar tarafından inhibe olmaktadır.

Kerovuo ve ark. (1998), *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisinden fitaz enzimini saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Saflaştırılan enzim maksimum aktivitesini pH 7.0 ve 55°C'de göstermiştir. İzole edilen enzimin aktivitesi ve stabilitesi için kalsiyum gerekli iken EDTA aktivitesini kısa sürede kaybettirmektedir. *B. subtilis* VTT E-68013'in genomik kütüphanesinden fitaz genini (*phyC*) klonlamışlardır. Araştırmacılar fitaz enziminin pH ve sıcaklık profili nedeni ile yem katkısı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kim ve ark. (1998a), *Bacillus* sp. DS11'e ait fitaz genini *E. coli*'de klonlanmış ve baz dizilerini belirlemişlerdir. 2.2 kb'lık DNA fragmenti üzerinde bulunan fitaz geni, 1.152 nükleotidden oluşmakta ve 383 amino asitlik bir polipeptidi kodlamaktadır. Enzimin moleküler büyüklüğü 41.808 Da'dur. Araştırmacılar bakteriyel kökenli bir fitaza ait baz dizilerinin belirlendiği ilk çalışma olduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve ark. (1998b), Kore’de bir sığır çiftliğinin topraklarından termostabil fitaz üreten bir *Bacillus* izole etmişlerdir. İzole edilen *Bacillus* sp. DS11’den saflaştırdıkları ekstraselüler fitazın SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde moleküler büyüklüğünü 44 kDa olarak bildirmişlerdir. Sıcaklık optimumu 70°C olan enzimin, 5mM CaCl₂ varlığında 90°C’de 10 dakika inkübasyondan sonra orijinal aktivitesinin %50’sini koruduğunu belirlemişlerdir. Enzimin pH optimumun 7.0 olup pH 4-8 arasında stabil kaldığını tespit etmişlerdir.

Han ve ark. (1999), *A. niger*’e ait fitaz genini (*phyA*) kodlayan 1.4 kbç büyüklüğündeki DNA fragmentini, ekspresyon vektörü olan pYES2’ye takarak bu geni *S. cerevisiae*’de eksprese etmişlerdir. Araştırmacılar, ekstraselüler olarak üretilen bu fitazın iki pH optimumu (2.0-2.5 ve 5.0-5.5) olduğunu ve sıcaklık optimumunun da 55-60°C olduğunu belirtmişlerdir. Bu enzimin moleküler büyüklüğünün yaklaşık 120 kDa ve ticari enzimlere nazaran daha termostabil olduğunu bildirmişlerdir. İn-vitro çalışmalarda rekombinant fitazın, mısır ve soya fasulyesi küspesindeki fitat formundaki fosforu hidrolize ettiğini belirtmişlerdir.

Rodríguez ve ark. (1999), domuz bağırsağından izole edilen bakteriyel suşları fitaz ve asit fosfataz aktivitesi bakımından taramışlardır. 93 koloni arasından Koloni 88 bu iki enzim bakımından en yüksek aktivite göstermiş ve bunun da bir *E. coli* suşu olduğunu belirlemişlerdir. İzolattan, asit fosfataz genini PCR ile amplifiye ederek *P. pastoris*’de klonlamış ve eksprese etmişlerdir. İzole edilen *E. coli* ile *A. niger*’in fitazını karşılaştırmak amacıyla yaptıkları enzimatik çalışmalar sonucunda *E. coli* fitazını yeni bir asit fosfataz/fitaz olarak sınıflandırmışlar ve bu enzimi kodlayan geni de *E. coli app2* olarak isimlendirmişlerdir.

Kerovuo ve Tynkkyen (2000), *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisinden fitaz genini (*phyC*), *Lactobacillus amylovorus* α-amilaz sekresyon sinyalini kullanarak *L. plantarum* 755 suşunda eksprese etmişlerdir. Araştırmacılar, *L. plantarum* 755 bakterisinin kendine ait proteinleriyle kıyaslandığında daha düşük oranda rekombinant fitazı ürettiğini bildirmişlerdir.

Miksch ve ark. (2002), *E. coli*’ye ait bir fitaz geninin baz dizilerini belirlemişler ve diğer bir *E. coli* fitaz geni *appA* ile karşılaştırmışlardır. Bu genin

appA geninin bir mutant formu olduğunu belirlemişlerdir. Bu fitaz enzimini saflaştırmış ve enzimatik özelliklerini belirlemişlerdir.

Tye ve ark. (2002), *B. licheniformis*'e ait fitaz genini (*phyL*) PCR tekniğini de kullanarak klonlamışlardır. Homoloji çalışmaları sonucunda bu gen ile *B. subtilis* 168 suşuna ait fitaz geninin (*168phyA*) benzer olduğunu bildirmişlerdir. *B. licheniformis*'e ait fitaz genini *B. subtilis*'e tekrar aktarmışlar ve bunun sonucunda 100 kat daha fazla enzim ekspresyonunun olduğunu tespit etmişlerdir. İki fitazın da geniş bir pH ve sıcaklık optimumu olduğunu ve yüksek termostabilite gösterdiğini, özellikle *phyL* geninin ürettiği fitazın diğer fitaza göre daha yüksek termostabilitesinin olduğunu, düşük Ca^{+2} konsantrasyonu varlığında 95°C'de 10 dakika denatürasyondan sonra orijinal aktivitesini %80 oranında koruduğunu bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2004), toprak bakterisi olan *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5 suşundan fitaz enzimini izole edip saflaştırmışlardır. Enzimin tek zincirli protein olduğunu ve moleküler ağırlığını SDS-PAGE'de 41.7 kDa olarak belirlemişlerdir. İzoelektrik noktası (pI) 8.7'dir. Enzimin, 37 ve 55°C'de deney yapıldığında iki pH optimumu (3.7 ve 5.5) saptanmış ve 60°C'ye kadar 4 saat stabil kaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, enzimin, EDTA, Al^{+3} ve Co^{+2} ile aktive olduğunu ve aktivitesinin Hg^{+2} ile inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Fitaz genini PCR ile klonlanmış ve DNA sekansı sonucunda ORF bölgesinin 1269 nükleotidden oluştuğunu belirlemişlerdir. Gen *E. coli*'de klonlanmış ve bu bakteride aktif olarak fitaz üretimi sağlanmıştır. Araştırmacılar, enzimin, pH profili ve sıcaklıktaki stabilizasyonu nedeni ile endüstriyel uygulamalar için iyi bir aday olabileceğini bildirmişlerdir.

Zinin ve ark. (2004), *Obesumbacterium proteus*'dan *phyA* fitazını kodlayan geni izole edip baz sırasını belirlemişlerdir. *PhyA* proteini, *Yersinia pestis*'in fosfoanhidrid fosforilazı ile %53 ve *E. coli*'nin fitazı *AppA* ile %47 oranında benzerlik göstermiştir. Araştırmacılar *PhyA* proteininin özelliklerini karakterize etmek amacıyla *phyA* genini *E. coli*'de eksprese etmişlerdir. Saflaştırılan rekombinant *PhyA*'nın spesifik aktivitesini 310 U/mg olarak tespit etmişlerdir. Rekombinant

PhyA, pH 1.5 ile 6.5 arasında aktivite gösterirken pH optimumu 4.9'dur. pH 4.9'da sıcaklık optimumunu 40-45°C olarak bildirmişlerdir.

Cho ve ark. (2005), *Pseudomonas syringae* MOK1'den bir fitaz genini (*phy M*) PCR yöntemi ile klonlamışlardır. Gen 1.287 nükleotidden oluşmakta ve 428 amino asitlik bir polipeptidi kodlamaktadır. Enzimin moleküler ağırlığının 46.652 Da ve histidin asit fosfataz familyasına ait olduğunu bildirmişlerdir. *Phy M* genini kendi sinyal sekansı ile (pEPSS) ve sinyal sekansı olmadan (pEPSM) *E. coli* BL21'de, pET22b ekspresyon vektörü ile subklonlamışlardır. Sonuç olarak, genin kendi sinyal sekansını kullanmadan elde edilen klonda (pEPSM) diğerine göre (pEPSS) 10 kat daha fazla enzim aktivitesi tespit etmişlerdir.

Huang ve ark. (2006), topraktan fitaz enzimi üreten bir *Yersinia intermedia* suşu izole etmişlerdir. Bu fitaz genini (*appA*) PCR yöntemi ile izole etmişler ve 2.354 bç'den oluşan DNA fragmenti üzerinde 441 amino asiti kodlayan 1326 bç büyüklüğündeki açık okuma dizisi bulunduğunu bildirmişlerdir. *AppA* genini *Pichia pastoris*'de fazla miktarda eksprese (over-eksprese) etmişler ve saflaştırılan rekombinant APPA'nın, daha önceden en yüksek aktivite gösterdiği bilinen *Citrobacter braaki* fitazından daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Rekombinant APPA'nın pH 2 ile 6 arasında aktif (optimum 4.5) ve sıcaklık optimumunun da 55°C olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca enzim, pepsin ve tripsine karşı dirençlidir. APPA'nın bu özelliklerinden dolayı yem sanayinde kullanım için oldukça uygun bir fitaz olduğunu belirtmişlerdir.

2.3. β -(1,3-1,4)-glukanaz (Likenaz) Enzimi İle İlgili Yapılan Bazı Moleküler ve Mikrobiyolojik Çalışmalar

Gosalbes ve ark. (1991), *Bacillus polymyxa*'dan ksilanaz ve endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz (likenz)ı kodlayan *xynD* ve *gluB* genlerini *E. coli* ve *B. subtilis*'de klonlamışlardır. Bu iki genin 4.466 kb'lık bir DNA fragmenti üzerinde olduğu ve genlerin birbirinden 155 bç ile ayrıldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca *xynD* geninin 67.8 kDa ve *gluB* geninin ise 27 kDa'luk proteini kodladıkları ve zymogram

analizleri sonucunda her iki peptidin de ksilanaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Schimming ve ark. (1991), *C. thermocellum*'dan moleküler ağırlığı yaklaşık 35.000 Da olan termoaktif $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (likenaz) enzimini kodlayan *licB* genini, *E. coli*'de 1.5 kb'lık DNA fragmenti üzerinde klonlamış ve eksprese etmişlerdir. Bu enzimin, arpa beta glukanı ve likenanda olduğu gibi β -1,3 ve β -1,4 glukanı üzerine etkili iken, sadece 1,3 ya da sadece 1,4 glukosidik bağlar içeren beta glukanlar üzerine etkili olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar enzimin sıcaklık optimumunun 80°C olduğunu ve pH 5-12 arasında aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Louw ve Watson (1993), *B. brevis*'e ait endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzimini kodlayan geni *E. coli*'de klonlamışlardır. Enzimin optimum pH'sını 8-10, optimum sıcaklığını ise 65-70°C olarak bulmuşlardır. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE yöntemi ile 29 kDa olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, enzimi 75°C'de 1 saat inkübe ettiklerinde aktivitesinin %75'ini koruduğunu bildirmişlerdir.

Spilliaert ve ark. (1994), termofilik bakteri *Rhodothermus marinus*'dan pUC18 vektörü ile gen kütüphanesini oluşturup *E. coli*'ye transfer etmişlerdir. Likenanlı plaklarda Kongo-Red boyaması sonucunda 5400 transformanttan 2 adedi aktivite göstermiştir. Her iki koloniden yapılan DNA sekans sonucunda 1.200 bp'lık bir DNA fragmenti tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucunda olgun enzimin moleküler ağırlığını 29.7 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzim likenan, β -glukan ve laminarini hidrolize ederken CMC ve ksilan üzerine aktivite göstermemektedir. Enzimin sıcaklık optimumunu 85°C ve pH optimumunu 7.0 olarak bildirmişlerdir. Enzimin 80°C'de 16 saat inkübasyondan sonra yeniden tüm aktivitesini kazandığını ve yarılanma ömrünün de 85°C'de 3 saat olarak tespit etmişlerdir.

Tabernero ve ark. (1994), alkalifilik *Bacillus sp.* N137'den alkalın endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzimini kodlayan *bgaA* genini izole etmişler ve kendi promotörü ile *E. coli*'de klonlamışlardır. *bgaA* genini taşıyan 1.416 kb'lık DNA fragmentinin nükleotid sırasını belirlemişlerdir. Bu genin kodladığı likenaz

enziminin aktivitesinin pH 6-12 arasında stabil kaldığını, sıcaklık optimumunun 60-70°C olduğunu ve 70°C’de 1 saat inkübasyonundan sonra aktivitesinin %65’ini koruduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu proteinin *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. polymyxa* ve *B. subtilis* gibi *Bacillus* likenazları ile benzer olduğunu da bildirmişlerdir.

Chen ve ark. (1997), *Orpinomyces* sp. suşu PC-2’den 971 bazlık cDNA’dan oluşan ve funguslardan izole edilen ilk likenaz ($\beta(1,3-1,4)$ -D-glukanaz; EC 3.2.1.73) geni olan *licA*’yı *E. coli*’de bir genomik kütüphane oluşturarak tespit etmişlerdir. *E. coli*’nin ürettiği β -glukanazı kültür ortamından saflaştırmışlar ve SDS-poliakrilamid jelde moleküler ağırlığını 27 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin sonundaki amino asit sırasının bakteriyel beta glukanazlar ile yüksek derecede homoloji gösterdiğini, bitki beta-glukanazlarıyla ise homoloji göstermediğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar *licA*’yı kodlayan genomik DNA bölgesinin intron içermediğini de belirtmişlerdir. Öte yandan araştırmacılar bu sonuçlar ile *Orpinomyces*’e ait *licA* geninin bakteriyel orijine sahip olduğunu da belirlemişlerdir.

Ekinci ve ark. (1997), *S. bovis* JB1’in $\beta(1,3-1,4)$ -glukanını hidrolize eden 25 kDa’luk ekstraselüler bir enzim ürettiğini bulmuşlardır. 16 glukosid hidrolaz familyasına ait olan $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzimini kodlayan bu geni izole etmişler ve plazmid vektör pTRW10 ya da pIL253 aracılığıyla tekrar *S. bovis* JB1’e aktarmışlardır. Araştırmacılar rekombinant *S. bovis*’in süpernatantındaki β -glukan aktivitesinin 4-10 kat arttığını bildirmişlerdir. pTRW10 plazmidine bu genin yerleştirilmesiyle oluşturulan rekombinant pTRWL1R plazmidini *L. lactis* IL2661 ve *E. faecalis* JH2-SS’e aktarmışlar ve geni eksprese etmişlerdir. Ancak enzimin ekstraselüler aktivitesinin *S. bovis*’e göre 8-50 kat daha azaldığını gözlemişlerdir.

Heng ve ark. (1997), bağırsakta bulunan bakterilerden biri olan *L. reuteri*’ye, *B. macerans*’ın endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz genini (*bglM*) plazmid üzerinde elektrotransformasyon yöntemini kullanarak aktarmışlardır. Araştırmacılar *Lactobacilli*’nin bu enzimi eksprese ettiğini ve sentezlediğini bildirmişlerdir.

Aşan (2002), rumen bakterilerinden biri olan *S. bovis* JB1’e ait karışık bağlı $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geninin *E. coli-Streptococcus* sp. mekik vektörü pTRW10’da

klonlanmasıyla oluşturulan TL1R vektörünü, termofilik bir laktik asit bakterisi olan *S. thermophilus* FI8976 ve *L. lactis* IL1403 suşlarına elektrotransformasyonla aktararak bu enzimin söz konusu bakterilerce üretimini sağlamıştır. SDS-Likenan-PAGE jellerin incelenmesi sonucu 26 kDa'luk enzime ait proteinin herhangi bir proteazla parçalanma belirtisi göstermediğini bildirmiştir.

Kim ve ark. (2002), *B. circulans*'dan, endo- β -(1,3-1,4)-glukanazı kodlayan geni *E. coli*'de klonlamışlardır. Klonlanan enzim, likenan ve arpa β -glukanını hidrolize ederken karboksimetil selüloz (CMC), laminarin ve ksilan üzerinde aktif değildir. Endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimi aminoasit dizisinin, endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz ürettiği bildirilen *Bacillus* N-137 ve *B. brevis* ile sırasıyla %68 ve 51 oranında homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kim (2003), *B. circulans*'a ait rekombinant pLL200K plazmidinden, endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz'ı kodlayan geni yeni bir mekik vektör olan pLLS920'ye transfer etmiştir. Endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimini *B. subtilis* RM125 ve *B. megaterium* ATCC14945'de üretmek için bu plazmidi (pLLS920) transfer etmiştir. Aktif büyüme boyunca enzim maksimum aktivite ile üretilmiştir. *B. circulans*'a göre rekombinant *B. subtilis* enziminin 83 kez ve rekombinant *B. megaterium* enziminin 7 kat daha aktif olduğunu tespit etmiştir. *E. coli* ürettiği enziminin %10'u besi yerine salgılamak, *B. subtilis* tamamını ve *B. megaterium* yaklaşık %98'ini salgılamaktadır. pLLS920 plazmidinin, *B. megaterium* (%98) ve *B. subtilis* (%51)'de stabil iken *E. coli*'de (%29) stabil olmadığını bildirmiştir.

Akita ve ark. (2005), *B. halodurans* C-125'in toplam genom sekansında bir endo- β -1,3(4)-D-glukanaz geni tespit etmişlerdir. Genin 231 amino asiti kodlamakta olduğunu ve enzimin çarpılarak bulunan moleküler ağırlığının yaklaşık 26743.16 Da olduğunu tahmin etmişlerdir. Enzim, amino asit sırasının belirlenmesi sonucunda *B. subtilis*'in endo- β -1,3-1,4-glukanazı ile sadece %28 oranla en yüksek benzerliği göstermiştir. Ayrıca genin baz sırası diğer bir bilinen *Bacillus* β -glukanaz genleri ile benzerlik göstermemiştir. Araştırmacılar, β -glukan substrat olarak kullanıldığında enzimin pH optimumunun 6-8 ve sıcaklık optimumunun ise 60°C olduğunu bildirmişlerdir.

Chen ve ark. (2005), *E. coli* plazmidi pFG1'den, *B. subtilis* endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz genini kodlayan 2.7 kbç'lik DNA fragmentini *E. coli*/maya mekik vektörüne takarak hibrid plazmid YCSH'ı oluşturmuşlardır. Hibrid plazmidi, *S. cerevisiae*'ye transfer ederek *bglS* genini eksprese etmişlerdir. *S. cerevisiae*'de *bglS* geninin ekspresyon seviyesindeki değişim 2.3 kat olup bu durum 2.7 kbç büyüklüğündeki DNA fragmentinin oryantasyonuna bağlı olmaktadır. Enzimin substrat spesifitesi ve pH optimumunun *B. subtilis* endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimi ile benzer olarak tespit etmişler ve *E. coli*'ye nazaran *S. cerevisiae*'de *bglS* geninin ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Yongging ve ark. (2005), *B. subtilis* β -(1,3-1,4)-glukanaz genini, pUC19 vektörüne takarak *E. coli* JM101'e aktarmışlardır. Rekombinant enzim, arpa glukanını ve likenanını hidrolize etmektedir. Toplam enzim aktivitesinin büyük bir kısmı (>%50) selüler olup ekstraselüler kısımda %25 β -(1,3-1,4)-glukanaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Enzim analizleri sonucunda *E. coli* ve *B. subtilis*'den saflaştırılan enzimlerin benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Kitamura ve Kamei (2006), deniz bakterisi *Pseudomonas* sp. PE2'den β -(1,3(4)-glukanaz A (*GluA*) genini klonlamış ve baz sırasını belirlemişlerdir. *Pseudomonas* sp. PE2'den elde edilen rekombinant enzimi, *Phytium porphyrae* hücre duvarını parçalamada kullanılan diğer iki rekombinant enzimle (kitinaz A ve β -(1,3-glukanaz) ile karşılaştırmışlardır. *GluA*'nın, bu üç enzim içerisinde en iyi hücre duvarını parçaladığını ve *P. porphyrae*'nin hücre duvarını parçalamada önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Teng ve ark. (2006), *B. licheniformis* genomik DNA'sından β -(1,3-1,4)-glukanaz genini PCR tekniği ile çoğaltarak pET28a ekspresyon vektörüne takmışlardır. Rekombinant vektörü *E. coli*'ye transfer etmişler ve sonrasında rekombinant enzimin moleküler ağırlığını yaklaşık 28 kDa olarak belirlemişlerdir. Rekombinant β -(1,3-1,4)-glukanaz enziminin ekspresyon seviyesi toplam proteinin %60.9'u olarak tespit etmişlerdir. Enzimin pH optimumu 5.6 olup sıcaklık optimumu ise 40°C'dir.

Aşan ve Özcan (2007), kanatlılar için rekombinant probiyotik geliştirmek ve likenaz enziminin termostabilitesini artırmak amaçları için β -(1,3-1,4)-glukanaz genini taşıyan TL1R plazmidini *S. salivarius* subsp. *thermophilus* bakterisine elektroporasyonla aktarmış ve likenaz genini bu bakteride eksprese etmişlerdir. Bu bakterice eksprese edilen β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimi sıcaklığa karşı direncinin arttığı ve 70°C’de 15 dakika aktivitesini sürdürebildiği belirlemişlerdir. Bunun aksine *L. lactis* ve *E. coli* hücrelerinin ürettiği likenaz enzimi aynı sıcaklık derecesinde kolaylıkla aktivitesini kaybetmiştir. Bu üç rekombinant bakteri tarafından üretilen enzim denatürasyona karşı dirençli olup 37-100°C’de 15 dakika sonrasında çözünür olarak kalabilmiştir. Böylelikle likenaz enzimi üreten rekombinant *S. salivarius* subsp. *thermophilus* bakterisi kanatlının bağırsağında kolonize olmasa bile arpaya dayalı rasyonlara eklendiğinde canlılığını koruyabilecektir. Bu bakterinin orta derecede termofil olması ve likenaz enziminin termostabilitesi nedenleriyle peletleme sonrası (70-90°C) enzim renatüre olabilecek ve kanatlının sindirim sistemindeki β -glukanları hidrolize edebilecektir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları

Bu çalışmada kullanılan *B. coagulans* DSM1 ve *B. licheniformis* DSM 603 suşları, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Almanya)'den, *B. subtilis* VTT E-68013 suşu, VTT Biotechnology (VTT Technical Research Centre, Finland)'den satın alınmıştır. *E. coli*/pL1Hc suşu, Doç.Dr. M. Sait EKİNCİ'den (Kahramanmaraş Sütçüimam Üniversitesi, Zootekni Bölümü) temin edilmiştir. *E. coli*-*B. subtilis* mekik vektörü pMK3, *Bacillus* Genetic Stock Centre (Department of Biochemistry, The Ohio State University, Columbus, USA)'dan temin edilmiştir. *E. coli* DH5 α suşu ve *E. coli*-*S. cerevisiae* mekik vektörü pRS416 Stratagene'den temin edilmiştir.

B. coagulans DSM1, *B. subtilis* VTT E-68013, *E. coli* DH5 α bakterileri %15 v/v gliserol içeren besi yerinde, -20°C'de muhafaza edilmişlerdir. *B. coagulans* bakterisi, MedyumI besi yerinde (Peptone (meat) 7.8 g/l, Peptone (caseine) 7.8 g/l, Yeast Extract 2.8 g/l, NaCl 5.6 g/l, Glukoz 1.0 g/l, pH:7.5), 40°C'de ve aerobik şartlarda üretilmiştir. *B. subtilis* VTT E-68013, *B. licheniformis* DSM 603 ve *E. coli* DH5 α suşları LB besi yerinde (Tryptone 10 g/l, Yeast Extract 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH:7.5), 37°C'de ve aerobik şartlarda üretilmiştir. Katı besi yeri için üreme ortamlarına %1.5 w/v agar ilave edilmiştir.

Plaklarda bakterilerin enzim aktivitelerini belirlemek amacıyla besi yerlerine, α -amilaz plak testi için %0.5 w/v nişasta, CMCaz plak testi için %0.1 w/v CMC, ksilanaz plak testi için % 0.1 w/v ksilan ve likenaz plak testi için %0.1 w/v likenan ilave edilmiştir. Proteaz aktivitesinin belirlenmesinde ise süt besi yeri (%8 süt tozu, %1.5 w/v agar) kullanılmıştır. Fitaz enzim aktivitesini belirlemek amacı ile Buğday Kepeği Ekstraktı (Wheat Bran Extract) içeren besi yeri hazırlanmıştır (Ek 1.1). Besi yerine antibiyotik ilavesinde ise stok olarak hazırlanmış antibiyotiklerden (Ek 1.2) uygun konsantrasyonlarda alınarak besi yerine ilave edilmiştir.

Bütün rekombinant teknikler aksi iddia edilmediği sürece Sambrook ve ark. (1989)'na göre yapılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ile DNA modifiye edici enzimler (DNA kesme enzimleri, RNaz, DNA ligaz, Alkalın fosfataz), Pfu DNA polimeraz ve antibiyotikler ile diğer kimyasal malzemeler aksi belirtilmedikçe Sigma, Fermentas, Boehringer Mannheim, Promega, Merck, Stratagene, Carlo Erba, Difco, Gibco BRL ve Oxoid'den satın alınmıştır.

3.1.3. Aletler

Çalışmada kullanılan aletlerden santrifüj Hettich'den, PCR cihazı Techne'den, DNA ve protein jel elektroforez cihazları ATTO Corporation'dan, güç kaynakları ATTO Corporation ve E-C Apparatus Corporation'dan, elektroporasyon cihazı Bio-Rad'dan, otoklavlar Nüve ve Hirayama'dan, inkübatörler Nüve'den, su banyosu Memmert'den, spektrofotometreler Pharmacia'dan, hassas terazi Ohaus'dan, UV lamba Vilber Lourmat'dan, vorteks ve manyetik karıştırıcı CAT'den, steril kabin Bilser'den, çalkalayıcı Ika'dan, pH metre Nel'den, otomatik pipetler Biohit ve Socharex'den, derin dondurucu ve no-frost buzdolabı Arçelik'den satın alınmıştır. UVP marka agaroz jel görüntüleme cihazı ise Kutay Laboratuar Cihazları Ticaret A.Ş.'den satın alınmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Bakterilerin Besi Yerlerinde Fenotipik Testlerinin ve Antibiyogramlarının Yapılması

Fitaz aktivitesinin belirlenmesinde Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar veya Buğday Kepeği Ekstraktı/MedyumI/Sodyum Fitat/Agar besi yerine bakteriler inoküle edilmiş ve bir gece inkübasyon sonrasında etrafında açık renkli zon oluşturan koloniler pozitif olarak belirlenmiştir. Bakterilerin likenaz, ksilanaz ve

selüloz aktivitesinin belirlenmesinde ise Kongo-Red ile boyama yöntemi kullanılmıştır (Teather ve Wood, 1982). Belirtilen oranlarda substrat içeren katı besi yerlerine bakteriler inoküle edildikten sonra 1 gece uygun üreme sıcaklıklarında inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası petrilere %0.1 w/v oranında hazırlanmış Kongo-Red boyası dökülerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda boya dökülerek plağın üzerine 1 M NaCl solüsyonu ilave edilmiş ve 15 dakika daha oda sıcaklığında bekletilerek fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Kongo-Red likenanlı ortamı kırmızıya boyayacağından kırmızıya boyanan zeminde etrafında sarı halka oluşan koloniler enzim aktivitesine sahip olarak tespit edilmiştir. α -Amilaz aktivitesinin tayininde ise, nişasta substratı içeren katı besi yerinde üreyen bakteriler iyodin buharına tutulmuş ve etrafında beyaz zon veren koloniler pozitif olarak tespit edilmiştir. Proteaz aktivitesinin tayini için ise bakteriler katı süt besi yerine inoküle edilmiş ve 1 gece inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası süt besi yerinde açık renkte zon oluşturan koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

İzolatların antibiyotiklere hassasiyetleri uygun besi yeride, antibiyotik diskleriyle (tetrasiklin (30 µg), kanamisin (30µg), ampisilin (10 µg), penisilin (10 iu), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg)), disk füzyonu metoduna göre tespit edilmiştir. Bakteriler katı besi yerine yayma şeklinde inoküle edildikten sonra petrilere antibiyotik diskleri yerleştirilerek uygun üreme sıcaklığında 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteriler, etrafında zon oluşturdıkları disklerin antibiyotiklerine karşı hassas, zon oluşturmadıklarına karşı dirençli olarak tespit edilmiştir.

3.2.2. *Bacillus subtilis* VTT-E 68013 Bakterisine ait Fitaz Geninin (*phyC*) *Bacillus coagulans*'a Aktarılması

3.2.2.1. Fitaz Geninin (*phyC*) PCR ile Amplifikasyonu

B. subtilis VTT E-68013 bakterisinin kromozomal DNA'sı üzerinde bulunan fitaz geni (*phyC*) PCR ile amplifiye (çoğaltılarak) edilerek değişik vektörler ile ligasyona tabi tutulmuştur.

3.2.2.1.(1). Fitaz Geninin (*phyC*) Amplifikasyonu için Primer Dizaynı

B. subtilis VTT E-68013'e ait fitaz geninin baz dizileri incelenerek *phyC* geninin amplifikasyonu için uygun primer bölgeleri belirlenmiştir. Dizi üzerindeki primer bölgeleri Çizelge 3.1.'de çerçeve içerisinde gösterilmiştir. Küt uç klonlamanın yapılabilmesinin yanı sıra her ihtimale karşın PCR ürününün vektörlere ligasyonunu kolaylaştırmak amacı ile yapışkan uç açığa çıkacak şekilde Primer F'nin ucuna *BamHI* (5'-GGATCC-3'), Primer R'nin ucuna *XbaI* endonükleazına ait tanıma dizileri (5'-TCTAGA-3') ilave edilmiştir.

Çizelge 3.1. *phyC* fitaz geninin baz dizilimi ve kodladığı proteinin amino asit dizini

LOCUS	AJ584664	1209 bp	DNA	linear	BCT
04-OCT-2003					
DEFINITION	<i>Bacillus subtilis</i> phyC gene for phytase.				
ACCESSION	AJ584664				
VERSION	AJ584664.1 GI:37515390				
KEYWORDS	phyC gene; phytase.				
SOURCE	<i>Bacillus subtilis</i>				
ORGANISM	Bacillus subtilis Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.				
REFERENCE	1				
AUTHORS	Do Thi,H.N., Nguyen Ngoc,H., Trinh Thi,H.T., Nguyen Thi,D.N., Bach Thi,Q.N., Bui Hoang,A., Nguyen Thuy,C. and Dinh Duy,K.				
TITLE	Cloning of the gene coding for phytase from <i>Bacillus subtilis</i>				
JOURNAL	isolate BVNB1 Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1209)				
AUTHORS	Dinh Duy,K.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (01-OCT-2003) Dinh Duy K., Molecular Microbiology Lab, Institute of Biotechnology, NCST, 18, Hoang Quoc Viet, Cauaiay, Hanoi, 10000, VIET NAM				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..1209 /organism="Bacillus subtilis" /mol_type="genomic DNA" /isolate="BVNB1" /db_xref="taxon: 1423 "				
gene	32..1183 /gene="phyC"				
CDS	32..1183 /gene="phyC" /codon_start=1				

```

/transl_table=11
/product="phytase"
/protein_id="CAE48281.1"
/db_xref="GI:37515391"

/translation="MNHSKTLLLTAAGMLTTCGAVSSQAKHKLSDPYHFTVNAAET
EPVDTAGDAADDPALWLDPKNPQNSKLITTNKKSGLAVYSLEGKMLHSYHTGKLNND
IRYDFPLNGKKVDIAAASNRSEGKNTIEIYAIDGKNGTLQSITDPNRPIASAIDEVYG
FSLYRSQKTGKYYAMVTGKEGEFEQYELNADKNGYISGKKVRAFKMNSXTEGMAANDE
YGSLFIAKEDEAIWKFSAPDGGSSNGTVIDRADGRHLTPDIEGLTIYYAADGKGYLLA
SSQGNSSYAIYERQGNKYVADFQITDGPETDGTSDTDGIDVLGFGGLPEYPFGLFVA
QDGENIDHGQKANQNFKMVPWERIADKIGFHPQVNKQVDPRKLTDRSGK"

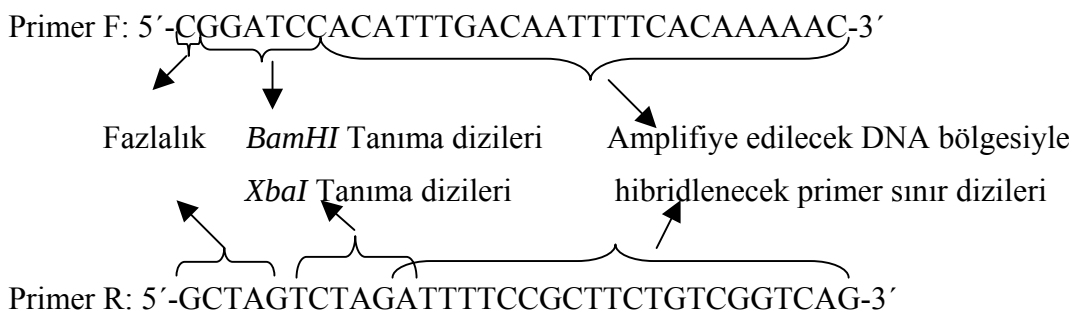
```

```

CACATttgacaATTTTCACAAAAACttaacacTGACAATCATGTATATATGTTACAATTGAAGTGCACGTTCATAAaaggaggaaGTAAATGAATCATT 100
      -35      -10      rbs      M N H S a4
CAAAAACACTTTTGTAAACCGCGGGCGCGGACTGATGCTCACATGCGGTGCGGTGTCTTCCAGGCAAAGCATAAGCTGTCCGATCCTTATCATTTTAC 200
      K T L L L T A A A G L M L T C G A V S S Q A K H K L S D P Y H F T a37
CGTGAATGCAGCGCGGAAACGGAAACCGGTTGATACGGCGGTGACGCGGTGATGATCCTGCGATTTCGGCTGGACCCCAAGACTCCTCAGAACAGCAAA 300
      V N A A A E T E P V D T A G D A A D D P A I W L D P K T P Q N S K a70
TTGATTACGACCAATAAAAAATCAGGTTTACTGTTTACAGCCTTGATGGAAGATGCTTCATTCCTATAATACGGGAAGCTGAACATGTCGATATCC 400
      L I T T N K K S G L V V Y S L D G K M L H S Y N T G K L N N V D I R a104
GTTATGATTTTCCGTTGAACGGCAAAAAGTCGATATCGCGGCAGCATCCAATCGGTCTGAAGGAAAAAATACCATTGAGATTACGCTATTGATGGAAA 500
      Y D F P L N G K K V D I A A A S N R S E G K N T I E I Y A I D G K a137
AAACGGCACATTACAAAGCATGACAGATCCAGACATCCGATTGCAACAGCAATTAATGAGGTATACGGTTTACCTTATACCACAGTCAAAAAACAGGA 600
      N G T L Q S M T D P D H P I A T A I N E V Y G F T L Y H S Q K T G a170
AAATATTACGCGATGTTGACAGGAAAGAGGGTGAATTGAACAATACGAATTAAAGGCGGACAAAAATGGATACATATCCGGCAAAAAGTACGGGCGT 700
      K Y Y A M V T G K E G E F E Q Y E L K A D K N G Y I S G K K V R A F a204
TTAAATGAATTCACAGACGGAAGGGATGGCAGCAGCATGAATACGGCAGGCTTTATATCGCAGAAGAAGATGAGGCCATTGGGAAGTTCAGCGCCGA 800
      K M N S Q T E G M A A D D E Y G R L Y I A E E D E A I W K F S A E a237
GCCGACGGCGGCAGTAACGGAACGGTTATCGACCGTCCGACGGCAGGCATTAACTCGTGATATTGAAGGATTGACGATTACTACGCTGCTGACGGG 900
      P D G G S N G T V I D R A D G R H L T R D I E G L T I Y Y A A D G a270
AAAGGCTATCTGATGGCATCAAGCCAGGGAACAGCAGCTACGCCATTATGACAGACAAGGAAAGAACAAATATGTTCCGGATTTTCGCATAACAGACG 1000
      K G Y L M A S S Q G N S S Y A I Y D R Q G K N K Y V A D F R I T D G a304
GTCCTGAACAGACGGGACAAGCGATACAGACGGAATTGACGTTCTGGGTTTCGGACTGGGGCTGAATATCCGTTCCGGTATTTTGTGCGACAGGACGG 1100
      P E T D G T S D T D G I D V L G F G L G P E Y P F G I F V A Q D G a337
TGAAATATAGATCACGGCCAAAAGGCCAATCAAAATTTTAAATCGTGCCATGGGAAAGAATTGCTGATCAATCGGTTTCGCCCGCTGGCAAAATGAA 1200
      E N I D H G Q K A N Q N F K I V P W E R I A D Q I G F R P L A N E a370
CAGGTTGACCCGAGAAAATGACCGACAGAAGCGGAAAAT]AAACATGCAAAAAGCAGCTTATACAAGCTGCTTTTTCATGCTGAAGAAGC 1290
Q V D P R K L T D R S G K * -----> <----- a383

```

Primerlerin uçlarına ilave edilen endonükleazlar, gen bölgesi içerisinde tanıma bölgesine sahip olmaması ve vektör DNA’lar üzerindeki çoklu klonlama bölgesinde (MCS) kesim yapan enzimlerden olmaları gibi önemli unsurlar göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Bu kriterler göz önünde bulundurularak dizayn edilen ve fitaz geninin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri Şekil 3.1.’de verilmiştir.



Şekil.3.1. *PhyC* Fitaz geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri

3.2.2.1(2). *Bacillus subtilis*'den Kromozomal DNA İzolasyonu ve RNA'dan Arındırılması

B. subtilis VTT E-68013 bakterisi LB besi yerinde aerobik şartlarda 37 °C’de üretilmiştir. Üretilen bakteriden Cutting ve Van der Horn (1990)’a göre kromozomal DNA izole edilmiştir. İlgili protokol Ek 2.1.’de verilmiştir. İzole edilen kromozomal DNA Ek 2.2’de verilen protokole göre RNaz enzimi ile muamele edilerek RNA’dan arındırılmıştır. Son olarak, spektrofotometrede DNA’nın miktarı ve saflık derecesi ölçülerek PCR reaksiyonu için hazır hale getirilmiştir.

3.2.2.1(3). PCR Programlama

Primerlerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık (T_m =Annealing Temperature), primer uzunlukları dikkate alınarak her iki primer için de ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Primerlerin T_m değerleri $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü kullanarak hesap edilmiştir.

Bu hesaplama göre T_m değerleri (kalıp ipliğe özgü olan altı çizili diziler);

Primer F için (5'- CGGATCCACATTTGACAATTTTCACAAAAAC -3') $T_m = 64^\circ\text{C}$
ve Primer R için (5'- GCTAGTCTAGATTTTCCGCTTCTGTCTCGGTCAG -3') $T_m = 64^\circ\text{C}$ 'dir.

Bu durumda annealing (yapışma) sıcaklığı her iki primer için de 50°C alınmıştır (Annealing sıcaklığı hesaplanan T_m değerinin aşağısında alınmaktadır). T_m hesaplanırken her iki primerde de kalıp DNA ile homoloji gösteren ve altı çizili olarak verilen diziler hesaba katılmıştır. Çünkü diğer dizilerin kalıp DNA üzerinde komplementeri olmadığından birinci döngüde sarkık olarak kalacaklardır. Dolayısıyla tüm baz dizileri dikkate alınarak T_m değerleri hesaplınsaydı primerlerin kalıp DNA'ya yapışması mümkün olmazdı. İşte bundan dolayı T_m değerleri hesaplanırken bu diziler hesaba katılmamıştır.

Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda hazırlanan Thermal Cycler programı Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *PhyC* Fitaz geninin *B. subtilis* DNA'sından amplifikasyonu için Thermal Cycler'a uygulanan program

Program Grupları	Sıcaklıklar	Süre	Döngü Sayısı
1	94 °C	4 dakika	1
2	92 °C	1 dakika	30
	50 °C	1 dakika	
	72 °C	2 dakika	
3	72 °C	10 dakika	1
4	4 °C	< 24 saat	1

3.2.2.1(4). PCR Reaksiyonun Hazırlanması

Reaksiyon hazırlanmadan önce reaksiyon bileşenleri tek tek incelenerek, stok kontaminasyonun önlenmesi amacıyla günlük kullanımlar için steril mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılmıştır. Günlük stoklar hazırlandıktan sonra mümkün olduğu kadar steril şartlarda ve buz üzerinde, en son enzim ilave edilecek şekilde PCR

reaksiyonu hazırlanmıştır. Reaksiyonda, üründe küt uç oluşturacak şekilde sentez yapan ve proofreading aktivitesine sahip Pfu DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. Bu sayede, açığa çıkan PCR ürünü gen küt uçlu olacağı için, yine *SmaI* enzimi ile küt uç oluşturacak şekilde kesilecek olan pMK3 ve diğer vektörlere (pRS416) ligasyonu yapılabilecektir. Fitaz geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *PhyC* Fitaz geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
<i>B. subtilis</i> kromozomal DNA'sı	2200 ng/μl	0.5 μl	1100 ng
Primer R	15 pmol/μl	1 μl	15 pmol
Primer F	15 pmol/μl	1 μl	15 pmol
dNTP karışımı	200 μM	1 μl	200 μM
Reaksiyon tamponu	10 X	5 μl	1 X
Pfu DNA Polimeraz	2.5 U/μl	0.5 μl	1.25 U
Deionize su	-	41 μl	-
TOPLAM	-	50 μl	-

0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde bu şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı daha önce programlanmış olan Thermal Cycler cihazının örnek bloğuna yerleştirilerek cihaz çalıştırılmıştır.

3.2.2.1(5). PCR Ürününün Elektroforezi ve Agaroz Jelden Arıtılması

PCR programı tamamlandıktan sonra reaksiyon ürününe 5:1 oranında yükleme tamponu (Ek 1.9.) ilave edilmiş ve hafifçe pipetlenerek homojenize hale getirilmiştir. Elde edilen karışım, markır DNA ile birlikte %0.8 w/v'lik agaroz jelin (Ek 1.10.) kuyularına dikkatli bir şekilde yüklenmiş ve 80 V, 25 mA'de yaklaşık 60 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur.

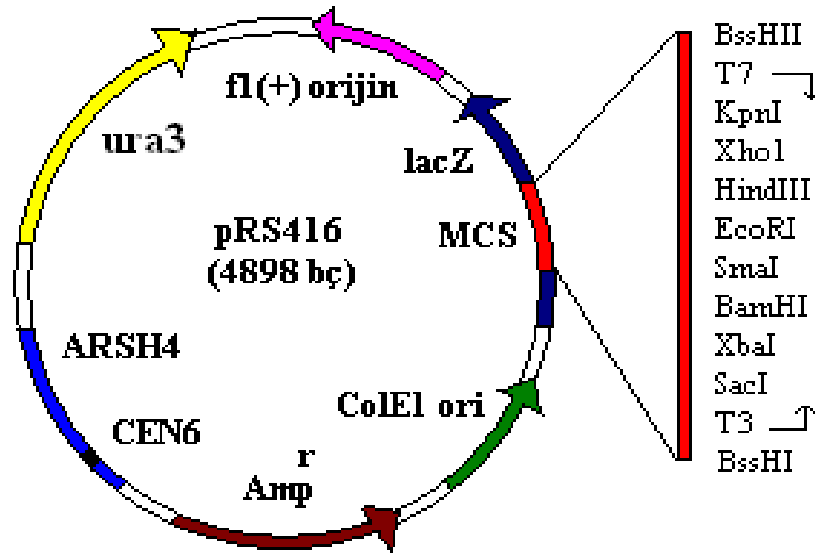
Beklenen moleküler ağırlıkta oluşan tek bir DNA bandı temiz bir bistüri yardımı ile dikkatli bir şekilde kesilerek alınmış ve darası alınan temiz bir mikrosantrifüj tüpüne konarak miktarı tespit edilmiştir.

DNA, Ek 2.3.'de verilen protokole göre agaroz jelden arındırılmıştır. Saflaştırılan DNA'dan 5 µl'si alınarak spektrofotometrede (OD₂₆₀ nm'de) okunarak miktarı ve saflık derecesi belirlenmiştir. Daha sonra DNA ligasyonda kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.2.2. Fitaz Geninin (*phyC*) *Escherichia coli*'ye Aktarılması

3.2.2.2(1). pRS416 Klonlama Vektörünün İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması

E. coli'den, *E. coli*-*Saccharomyces* mekik vektörü pRS416 plazmid DNA'sı Birnboim ve Doly (1979)'e göre izole edilmiştir. İlgili protokol Ek 2.4.'de verilmiştir. İzolasyonu yapılan pRS416 plazmid DNA'sı Ek 2.2.'de verilen protokole göre RNaz enzimi ile muamele edilerek RNA'dan arındırılmıştır. pRS416 plazmidinin yapısı Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. pRS416 plazmidinin yapısı (4898 bç)

3.2.2.2(2). pRS416 Klonlama Vektörünün *SmaI* Endonüklazı ile Kesimi

İzolasyonu yapılan ve RNaz enzimi muamele edilerek RNA'dan arındırılan pRS416 plazmid DNA'sı *SmaI* endonükleaz enzimi ile kesilerek düz zincir (doğrusal) haline getirilmiştir. *SmaI* endonükleazı genom üzerinde 5'-CCCGGG-3' dizilerini tanıyan ve 3. pozisyonundaki C ile 4. pozisyonundaki G bazları arasından DNA'yı keserek küt uç oluşturan bir enzimdir. pRS416 plazmid DNA'sının *SmaI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. pRS416 vektörünün *SmaI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
pRS416	3500 ng/μl	2.5 μl	8750 ng
Reaksiyon tamponu	10 X	4 μl	1 X
<i>SmaI</i> enzimi	10 U/μl	1 μl	10 U
Deionize su	-	32.5 μl	-
TOPLAM	-	40 μl	-

Kesim reaksiyonu 30 °C'de yaklaşık 90 dakika inkübe edildikten sonra 5 μl'si alınarak DNA markırı ile %0.8 w/v'lik agaroz jelde incelenmiştir. Geriye kalan kesim reaksiyonundan vektör DNA fenol-kloroform uygulaması ile saflaştırılıp Na-asetat/etanol uygulaması ile çöktürülmüş ve elde edilen DNA peleti 15 μl TE solüsyonu (Ek 1.7.) ile çözülmüştür. DNA tamamen çözüldükten sonra spektrofotometrede miktarı ve saflığı ölçülerek +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2(3). Fitaz Geni (*phyC*) ile pRS416 Plazmid DNA'sının Ligasyonu

Yukarıdaki uygulamalar ile ligasyona hazır hale getirilen fitaz geni (*phyC*) ile pRS416 plazmid DNA'sı için hazırlanan ligasyon reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Fitaz geni (*phyC*) ile pRS416 vektörü için hazırlanan ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
Fitaz geni (<i>phyC</i>)	1500 ng/μl	0.3 μl	450 ng
pRS416/ <i>SmaI</i>	2000 ng/μl	0.2 μl	400 ng
Ligaz Tamponu	10 X	2 μl	1 X
T4 DNA Ligaz	5 U/μl	1 μl	5 U
PEG	%50 w/v	2 μl	%5 w/v
Deionize Su	-	14.5 μl	-
TOPLAM	-	20 μl	-

Elde edilen ligasyon reaksiyonu 22 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra ligasyon sıvısı 65 °C’de 10 dakika tutularak enzim denatüre edilmiştir. Son olarak ligasyon karışımı *E. coli* DH5α bakterisine transferde kullanılmıştır.

3.2.2.2(4). Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon

Kompetent bakteri oluşturmada kullanılan *E. coli* DH5α suşu, Ek 2.5.’de verilen protokol uygulanarak kompetent hale getirilmiş ve ligasyon reaksiyonu sıvısından belli bir miktar alınarak Ek 2.6.’da verilen protokole göre transfer yapılmıştır.

3.2.2.2(5). pRS416F (pRS416+Fitaz (*phyC*)) Plazmidini Taşıyan *Escherichia coli* Kolonilerinin Belirlenmesi

Transformasyon tüpündeki sıvıların tamamı önce ayrı ayrı 1 ml antibiyotik içermeyen LB sıvı besi yerlerine boşaltılarak 37 °C’de aerobik olarak 1 saat süreyle üretilmişlerdir. Bu uygulama ile, kompetent hale getirme işlemleriyle hassaslaşmış olan bakterilerin normal hale dönmeleri ve plazmid DNA ile taşınan antibiyotiğe direnç geninin az da olsa eksprese olarak, bakterinin bir saat sonra inoküle edileceği antibiyotikli besi yerine adaptasyonu sağlanmış olacaktır. Bir saat sonra bakteriler alınarak 100-200 μl hacimler halinde LB/X-gal/Amp/Agar plaklarına (50 μg/ml amfisilin, 40 μg/ml X-gal (Ek 1.18)) steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekilmiş ve

plaklar 5-10 dakika kurutulduktan sonra ters çevrilerek 37°C'ye ayarlanmış inkübatöre ertesi güne kadar üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün transformasyon plaklarında rekombinant (geni almış olan) ve non-rekombinant (geni almadan kapanmış olan) plazmid DNA'lar ile transforme olmuş olan bakteriler üreyecektir. Hem rekombinant hem de non-rekombinant bakterilerde amfisilin direnç geni (β -laktamazı kodlar) sağlam olacağı için koloni oluşturabileceklerdir. Rekombinant bakterilerde fitaz geni pRS416 plazmidini üzerindeki *LacZ* geni içerisinde bulunan çoklu klonlama bölgesine (MCS) takıldığı için *LacZ* geni inaktive olacaktır. Dolayısıyla rekombinant bakteriler ortamdaki X-gal'i parçalayamayacağından koloniler beyaz renkli olarak gelişecektir. Diğer taraftan rekombinant olmayan plazmidleri alan rekombinant bakterilerin *LacZ* geni sağlam olacağından besi yerindeki X-gal'i kullanacak ve koloniler mavi olarak gelişecektir.

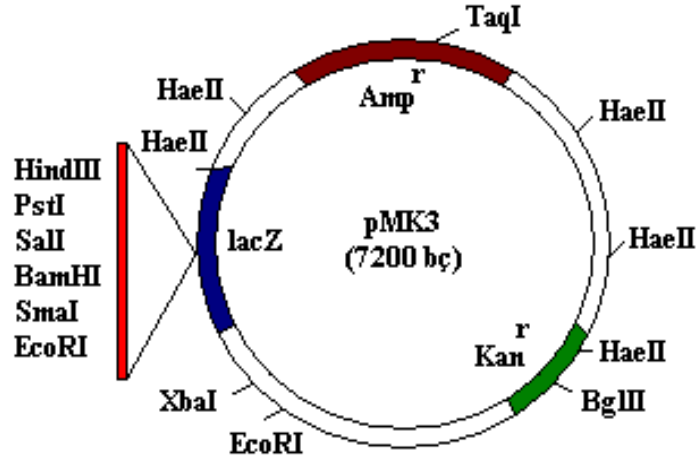
3.2.2.2(6). *Escherichia coli*/pRS416F Kolonilerinden İzole Edilen Rekombinant Vektörlerin İnsört ve PCR Analizleri

Elde edilen beyaz kolonilerden Ek 2.4.'de verilen protokole göre plazmid DNA izole edilerek Ek 2.2.'de verilen protokole göre de RNA'dan arındırılmıştır. Fitaz geninin tespiti için PCR tekniği ile Çizelge 3.3'e göre amplifikasyon yapılmıştır. Daha sonra orijinal (pRS416) ve rekombinant (pRS416F) plazmidler, insörtü (fitaz genini) gözlemek amacı ile *HindIII* ve *BamHI* enzimleriyle kesilmiştir. Kesim ve PCR reaksiyonlarının her birinden 10'ar µl alınarak %0.8 w/v'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Elde edilen jel görüntüsü 'UVitec' jel görüntüleme cihazı ile fotoğraflanmıştır.

3.2.2.3. Fitaz Geninin (*phyC*) *Escherichia coli*-*Bacillus* sp. Mekik Vektörü pMK3 ile *Bacillus coagulans*'a Aktarılması

3.2.2.3(1). Fitaz Geninin (*phyC*) pMK3'e Ligasyonu

Fitaz geninin *B. coagulans*'da klonlanmasında kullanılan *E. coli*-*Bacillus* mekik vektörü pMK3'ün yapısı Şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.3. pMK3 plazmidinin yapısı (7200 bç) (Sullivan ve ark., 1984)

pRS416F vektöründen *HindIII*+*BamHI* enzimleri ile kesilerek çıkarılan fitaz geni ile yine aynı enzimlerle kesilmiş olan pMK3 vektörünün ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Fitaz geni ile pMK3 vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
Fitaz / <i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	300 ng/µl	1 µl	300 ng
pMK3 / <i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	350 ng/µl	1 µl	350 ng
Reaksiyon tamponu	10 X	2 µl	1 X
T4 DNA ligaz	5 U/µl	0.5 µl	2.5 U
Deionize su	-	15,5 µl	-
TOPLAM	-	20 µl	-

Hazırlanan ligasyon reaksiyonu 22 °C’de 60 dakika inkübe edildikten sonra ligasyon karışımından bir miktar alınarak *E. coli* DH5α bakterisine transferde kullanılmıştır (Ek 2.6.). pMK3F (pMK3+Fitaz) plazmidini taşıyan rekombinant *E. coli* kolonilerinin belirlenmesi ise 3.2.2.2.(5)’e göre yapılmıştır. Transformasyon sonrası LB/X-gal/Amp/Agar (100 µg/ml amfisilin, 40 µg/ml X-gal) besi yeri kullanılmıştır. pMKF/*E. coli* plazmidinin insört ve PCR analizleri 3.2.2.2 (6)’ya göre yapılmıştır.

3.2.2.3(2). pMK3F Rekombinant Vektörünün *Bacillus coagulans* Bakterisine Elektrotransfomasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Seçimi

Rekombinant *E. coli* kolonilerinden izole edilen pMKF plazmidi, Ek 2.4'e göre saflaştırıldıktan ve Ek 2.2.'ye göre RNA'dan arındırıldıktan sonra *B. coagulans*'a aktarılmasında *B. subtilis*'e elektrotransfomasyon yöntemi (Vehmaanperä, 1989) modifiye edilerek uygulanmıştır (Ek 2.7.). Transfomasyon sonrasında MedyumI/Kanamisin/Agar (10 µg/ml kanamisin) besi yerinde üreyen koloniler rekombinant olarak tespit edilmiştir.

3.2.2.3(3). *Bacillus coagulans*/pMK3F'ye İlişkin Plak Testleri

Plaklarda rekombinantların tespiti için; orijinal *B. coagulans* ve fitaz genini taşıyan rekombinant *B. coagulans* bakterilerinin antibiyotikli ortamda üreme durumlarını tespit etmek için MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerine inoküle edilerek karşılaştırılmıştır. Ayrıca aynı bakteriler Buğday Kepeği Ekstraktı/MedyumI/Sodyum Fitat/Agar besi yerine inoküle edilerek orijinal ve rekombinant bakteriler karşılaştırılmıştır. Bu besi yerine inoküle edilen bakteriler 40°C'de 1 gece üretildikten sonra fitaz enziminin sıcaklık optimumu olan 55°C'de 5-6 saat daha inkübe edilmiştir.

3.2.2.3(4). Rekombinant pMK3F'ye İlişkin Kesim ve PCR Analizleri

Gerek *E. coli*/pMK3F ve *B. coagulans*/pMK3F bakterilerinden Ek.2.4.'de verilen protokollere göre rekombinant pMK3F vektörleri izole edilerek Ek 2.2.'de verilen protokole göre de RNA'dan arındırılmışlardır.

E. coli ve *B. coagulans* bakterilerinden elde edilen pMK3F plazmidinden fitaz genini çıkarmak için *HindII*+*BamHI* enzimleri ile kesilmiştir. Ayrıca her iki bakterilerinden izole edilen pMK3F rekombinant vektörleri kalıp DNA olarak kullanılmış ve fitaz geni PCR'da sentezlenmiştir. Elde edilen kesim ve PCR ürünleri

%0.8 w/v'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Elde edilen jel görüntüsü 'UVitec' jel görüntüleme cihazı ile fotoğraflanmıştır.

3.2.2.3(5). Değişik pH'lardaki Besi Yerinde Fitaz Aktivitesinin Tespiti

Değişik pH'larda fitaz aktivitesinin tespiti için pH 5, 6, 7, 8, 9, 10'da hazırlanan Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar besi yerinde orijinal ve rekombinant bakteriler inoküle edilerek karşılaştırılmıştır. Bu besi yerine inoküle edilen bakteriler 37°C'de 1 gece üretildikten sonra fitaz enziminin sıcaklık optimumu olan 55°C'de 5-6 saat daha inkübe edilmiştir.

3.2.3. *Bacillus licheniformis*'e ait Fitaz Geninin (*phyL*) pMK3 Klonlama Vektörü ile *Bacillus coagulans*'a Aktarılması

3.2.3.1. Fitaz Geninin (*phyL*) PCR ile Amplifikasyonu

B. licheniformis DSM 603 bakterisi kromozomunda bulunan fitaz geni (*phyL*) PCR ile amplifiye (çoğaltmak) edildikten sonra pMK3 vektörü ile ligasyona tabi tutulmuştur.

3.2.3.1.(1). Fitaz Geninin (*phyL*) Amplifikasyonu için Primer Dizaynı

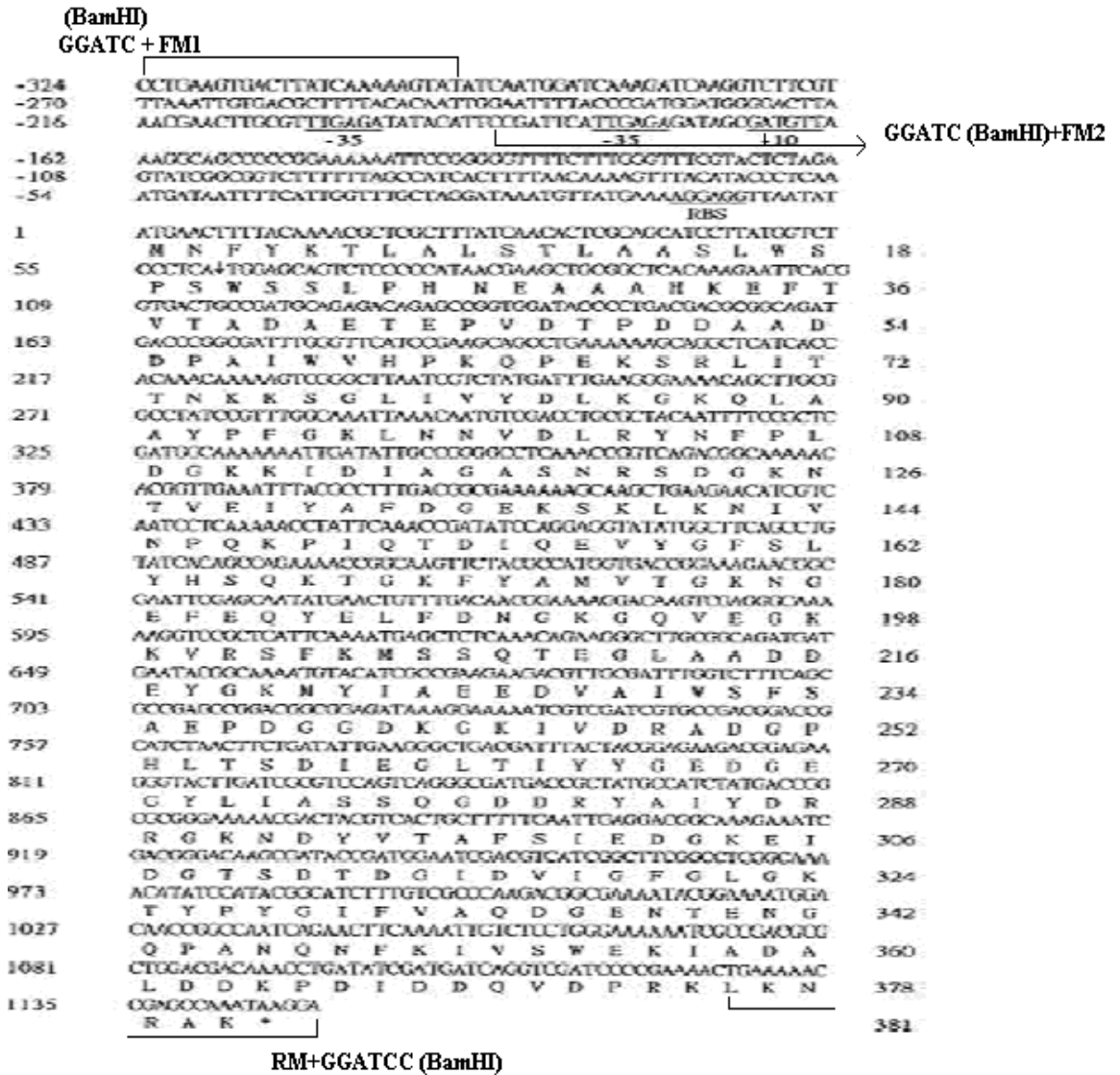
B. licheniformis DSM 603'e ait fitaz geninin baz dizileri incelenerek *phyL* geninin amplifikasyonu için uygun primer bölgeleri belirlenmiştir. *phyL* fitaz geninin amplifikasyonunda (çoğaltılması) PCR reaksiyonu için iki farklı ileri (forward) primer (FM1 ve FM2) ve bir adet ortak olarak kullanılmak üzere geri (reverse) primer (RM) hazırlanmıştır. FM1 primeri, *phyL* fitaz geninin yayınlanan baz sırasının en başından, FM2 primeri ise yaklaşık geni biraz daha küçültmek amacıyla 135 bç ileriden -35 ve -10 promotor dizilerini de içine alacak şekilde hazırlanmıştır.

Dizi üzerindeki primer bölgeleri Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir. Küt uç klonlamanın yapılabilmesinin yanı sıra her ihtimale karşın PCR ürününün vektörlere ligasyonunu kolaylaştırmak amacı ile yapışkan uç açığa çıkacak şekilde Primer FM1,

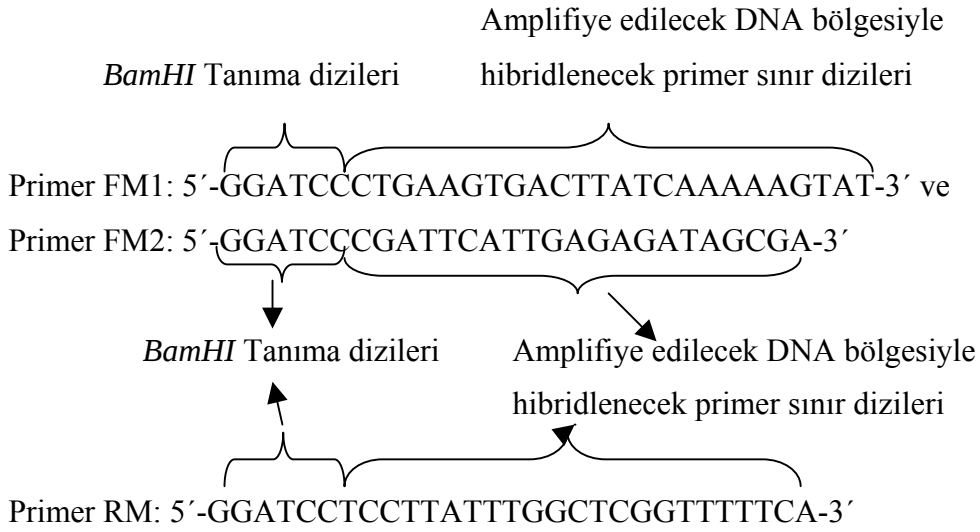
FM2 ve RM'nin ucuna *Bam*HI (5'-GGATCC-3') endonükleazına ait tanıma dizileri ilave edilmiştir.

Çizelge 3.7. *phyL* fitaz geninin baz dizilimi ve kodladığı proteinin amino asit dizini

LOCUS	AY651979	1146 bp	DNA	linear	BCT
19-JUL-2004					
DEFINITION	Bacillus licheniformis Phyl gene, complete cds.				
ACCESSION	AY651979				
VERSION	AY651979.1 GI:50299537				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Bacillus licheniformis				
ORGANISM	Bacillus licheniformis				
	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 1146)				
AUTHORS	Jiang,Z. and Ling,C.				
TITLE	Cloning of phytase gene from Bacillus licheniformis and its				
	expression in Escherichia coli				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1146)				
AUTHORS	Jiang,Z. and Ling,C.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (13-JUN-2004) Biology, Wuhan, Hubei 430062, China				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..1146				
	/organism="Bacillus licheniformis"				
	/mol_type="genomic DNA"				
	/strain="CCTCC AB91062"				
	/db_xref="taxon: 1402 "				
	/country="China: Hubei"				
CDS	1..1146				
	/EC_number=" 3.1.3.8 "				
	/function="catalyses the hydrolysis of phytate"				
	/codon_start=1				
	/transl_table= 11				
	/product="PhyL"				
	/protein_id=" AAT73627.1 "				
	/db_xref="GI:50299538"				
/translation="MNFYKTLALSTLAASLLSPSWSILPRAEASAYKDFSVTADAETE					
PVDTPDDAADDPAIWVHPKQPEKSRLITTNKKSGLIVYDLNGKQLAAYPFGKLNNDL					
RYNFPLDGKKIDIAGASNRSDGKNTVEIYAFDGEKNKLNIVNPQKPIQTDIEEVYGF					
SLYHSQKTGKFYAMVTGKNVEFEQYELFDNGKGQVEGKKVRSFKMSSQTEGLAADDEY					
GKMYIAEEDAAIWSFSAEPNGDGKGIKIVDRAGGTHLTADIEGLTIYYGEDGEGYLIAS					
SQGDNRYAIYDRRGKNDYVTDFSIDDGKEIDGTSDDGIDVIGFGLGKKYPYGIFVAQ					
DGENTENGQPANQNFKIVSWEKIADALDDKPDIDDQVNPRKLKNRAK"					



Primerlerin uçlarına ilave edilen endonükleazlar; gen bölgesi içerisinde tanıma bölgesine sahip olmaması ve vektör DNA'lar üzerindeki çoklu klonlama bölgesinde (MCS) kesim yapan enzimlerden olmaları gibi önemli unsurlar göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Bu kriterler göz önünde bulundurularak dizayn edilen ve fitaz geninin çoğaltılmasında kullanılacak olan primer dizileri Şekil 3.4.'de verilmiştir.



Şekil 3.4. *phyL* Fitaz geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri

3.2.3.1(2). *Bacillus licheniformis*'den Kromozomal DNA İzolasyonu ve RNA'dan Arındırılması

B. licheniformis bakterisi LB besi yerinde aerobik şartlarda 37 °C'de üretilmiştir. Üretilen bakteriden Cutting ve Van der Horn (1990)'a göre kromozomal DNA izole edilmiştir. İlgili protokol Ek 2.1.'de verilmiştir. İzole edilen kromozomal DNA Ek 2.2.'de verilen protokole göre RNaz enzimi ile muamele edilerek RNA'dan arındırılmıştır. Son olarak DNA'nın spektrofotometrede miktarı ve saflık derecesi ölçülerek PCR reaksiyonu için hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.1(3). PCR Programlama

Primerlerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık (T_m =annealing sıcaklığı), primer uzunlukları dikkate alınarak üç primer için de ayrı ayrı hesaplanmıştır. Primerlerin T_m değerleri $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü kullanarak hesap edilmiştir. Bu hesaplama göre T_m değerleri (kalıp ipliğe özgü olan altı çizili diziler);

Primer FM1 için (5'-GGATCCCTGAAGTGACTTATCAAAAAGTAT-3') $T_m = 66$ °C

Primer FM2 için (5'-GGATCCCGATTTCATTGAGAGATAGCGA-3') $T_m = 64^\circ\text{C}$ ve Primer RM için (5'-GGATCCTCCTTATTTGGCTCGGTTTTTCA-3') $T_m = 60^\circ\text{C}$ 'dir.

Primerlerin annealing (yapışma) sıcaklığı 55°C alınmıştır. T_m hesaplanırken her iki primerde de kalıp DNA ile homoloji gösteren ve altı çizili olarak verilen diziler hesaba katılmıştır.

Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda hazırlanan Thermal Cycler programı Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Fitaz geninin (*phyL*) *B. licheniformis* DNA'sından amplifikasyonu için Thermal Cycler cihazına uygulanan program

Program Grupları	Sıcaklıklar	Süre	Döngü Sayısı
1	94°C	4 dakika	1
2	92°C	1 dakika	30
	55°C	1 dakika	
	72°C	2 dakika	
3	72°C	10 dakika	1
4	4°C	< 24 saat	1

3.2.3.1(4). PCR Reaksiyonun Hazırlanması

Reaksiyon hazırlanması 3.2.2.1(4).’e göre yapılmıştır. *phyL* fitaz geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu Çizelge 3.9.’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Fitaz geninin (*phyL*) amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
<i>B. licheniformis</i> kromozomal DNA'sı	1500 ng/μl	0.5 μl	750 ng
Primer RM	15 pmol/μl	1 μl	15 pmol
Primer FM	15 pmol/μl	1 μl	15 pmol
dNTP karışımı	200 μM (her biri)	1 μl	200 μM (her biri)
Reaksiyon tamponu	10 X	5 μl	1 X
Pfu DNA Polimeraz	2.5 U/μl	0.5 μl	1.25 U
Deionize su	-	41 μl	-
TOPLAM	-	50 μl	-

0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde bu şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı daha önce programlanmış olan PCR cihazının örnek bloğuna yerleştirilerek cihaz çalıştırılmıştır.

3.2.3.1(5). PCR Ürününün Elektroforezi ve Agaroz Jelden Arıtılması

B. licheniformis bakterisine ait fitaz geni (*phyL*)'nin elektroforezi ve agaroz jelden arıtılması 3.2.2.1(5)'e göre yapılmıştır.

3.2.3.2. Fitaz Geninin (*phyL*) *Escherichia coli*-*Bacillus* sp. Mekik Vektörü pMK3 ile *Bacillus coagulans*'a Aktarılması

3.2.3.2(1). pMK3 Klonlama Vektörünün İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması

Fitaz geninin (*phyL*) *B. coagulans*'da klonlanmasında kullanılan *E. coli*-*Bacillus* mekik vektörünün yapısı Şekil 3.2.'de verilmişti. pMK3 klonlama vektörünün izolasyonu ve ligasyona hazırlanması 3.2.2.2(1)'e göre yapılmıştır.

3.2.3.2(2). pMK3 Klonlama Vektörünün *SmaI* Endonüklazı ile Kesimi

İzolasyonu yapılan ve RNaz enzimi muamele edilerek RNA'dan arındırılan pMK3 plazmid DNA'sı *SmaI* endonükleaz enzimi ile kesilerek düz zincir (doğrusal) haline getirilmiştir. pMK3 plazmid DNA'sının *SmaI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.10.'de verilmiştir.

Çizelge 3.10. pMK3 vektörünün *SmaI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
pMK3	4500 ng/μl	2 μl	9000 ng
Reaksiyon tamponu	10 X	4 μl	1 X
<i>SmaI</i> enzimi	10 U/μl	1 μl	10 U
Deionize su	-	33 μl	-
TOPLAM	-	40 μl	-

Kesim reaksiyonu 30 °C'de yaklaşık 90 dakika inkübe edildikten sonra 5 μl'si alınarak DNA markırı ile %0.8 w/v'lik agaroz jelde incelenmiştir. Geriye kalan vektör DNA fenol-kloroform uygulaması ile saflaştırılıp Na-asetat/etanol uygulaması ile çöktürülmüş ve elde edilen DNA peleti 15 μl TE solüsyonu (Ek 1.7.) ile çözülmüştür. DNA tamamen çözüldükten sonra spektrofotometrede miktarı ve saflığı ölçülerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.3(3). Fitaz Geninin (*phyL*) pMK3'e Ligasyonu

PCR amplifikasyonu ile elde edilen küt uçlu fitaz geni ile yine küt uç oluşturacak olan *SmaI* enzimiyle kesilmiş olan pMK3 vektörünün ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır (Çizelge 3.11.).

Çizelge 3.11. Fitaz geni ile pMK3 vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
Fitaz	1000 ng/μl	0.5 μl	500 ng
pMK3/ <i>SmaI</i>	800 ng/μl	0.5 μl	400 ng
Reaksiyon tamponu	10 X	2 μl	1 X
T4 DNA ligaz	5 U/μl	1 μl	5 U
PEG	%50 w/v	2 μl	%5 w/v
Deionize su	-	14.5 μl	-
TOPLAM	-	20 μl	-

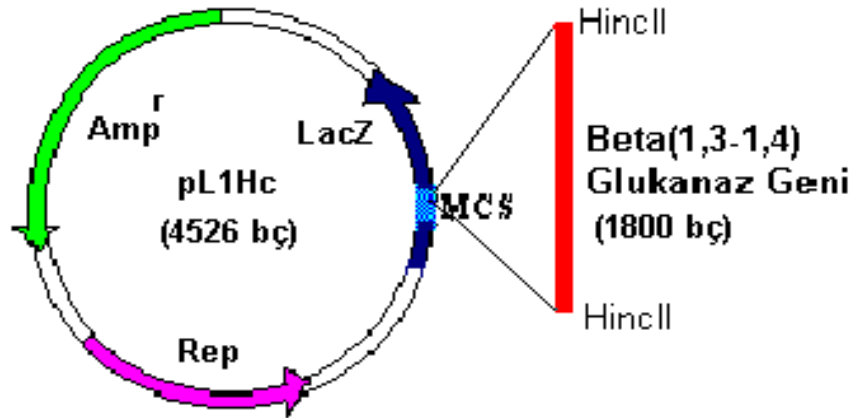
Hazırlanan ligasyon reaksiyonu 22 °C’de 60 dakika inkübe edildikten sonra ligasyon karışımından bir miktar alınarak *E. coli* DH5α bakterisine transferde kullanılmıştır (Ek 2.6.). pMK3FM1 (pMK3+Fitaz (FM1 primeri ile elde edilen PCR ürünü)) ve pMK3FM2 (pMK3+Fitaz (FM2 primeri ile elde edilen PCR ürünü)) plazmidlerini taşıyan rekombinant *E. coli* kolonilerinin belirlenmesi ise 3.2.2.2.(5)’e göre yapılmıştır. *E. coli*/pMK3FM1 ve pMK3FM2 plazmidinin insört ve PCR analizleri 3.2.2.2 (6)’ya göre yapılmıştır.

3.2.4. β(1,3-1,4)-glukanaz (Likenaz) Geninin *Escherichia coli*-*Bacillus* sp. Mekik Vektörü pMK3 ile *Bacillus coagulans*’a Aktarılması

3.2.4.1. Likenaz Geninin pMK3 Vektörü ile *Escherichia coli*’ye Aktarılması

3.2.4.1(1). pMK3 Klonlama Vektörünün ve pL1Hc Plazmidlerinin İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması

β(1,3-1,4)-glukanaz (Likenaz) geninin *B. coagulans* bakterisinde klonlanmasında likenaz gen kaynağı olarak pL1Hc plazmidi (Ekinci, 1997) kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. pL1Hc plazmidinin yapısı (pUC18 plazmidi (2686 bç)+Likenz (β(1,3-1,4)-glukanaz) geni (1800 bç)) (Ekinci, 1997)

E. coli'den pMK3 klonlama vektörü ve pL1Hc plazmid DNA'sı Birnboim ve Doly (1979)'a göre izole edilmiştir. İlgili protokol Ek 2.4.'de verilmiştir. İzolasyonu yapılan plazmidler DNA'sı Ek 2.2.'de verilen protokole göre RNaz enzimi ile muamele edilerek RNA'dan arındırılmıştır.

3.2.4.1(2). pMK3 Klonlama Vektörünün *SmaI* Endonüklazı ile Kesimi

İzolasyonu yapılan ve RNaz enzimi muamele edilerek RNA'dan arındırılan pMK3 plazmid DNA'sı *SmaI* endonükleaz enzimi ile kesilerek düz zincir (doğrusal) haline getirilmiştir. pMK3 plazmid DNA'sının *SmaI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.12.'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. pMK3 vektörünün *SmaI* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
pMK3	2500 ng/μl	4 μl	10000 ng
Reaksiyon tamponu	10 X	4 μl	1 X
<i>SmaI</i> enzimi	10 U/μl	1 μl	10 U
Deionize su	-	31 μl	-
TOPLAM	-	40 μl	-

Kesim reaksiyonu 30 °C’de yaklaşık 90 dakika inkübe edildikten sonra 5 µl’si alınarak DNA markırı ile %0.8 w/v’lik agaroz jelde incelenmiştir. Geriye kalan vektör DNA fenol-kloroform uygulaması ile saflaştırılıp Na-asetat/etanol uygulaması ile çöktürülmüş ve elde edilen DNA peleti 15 µl TE solüsyonu (Ek 1.7.) ile çözülmüştür. DNA tamamen çözüldükten sonra spektrofotometrede miktarı ve saflığı ölçülerek +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.1(3). Likenaz İnsörtünün Hazırlanması

pL1Hc plazmidi, *HincII* enzimi ile kesilerek küt uçlu insört oluşturacak şekilde likenaz geni elde edilmiştir. *HincII* endonükleazı genom üzerinde 5'-GTPyPuAC-3' dizilerini tanıyan ve 3. pozisyonundaki Pirimidin ile 4. pozisyonundaki Püridin bazları arasından DNA’yı keserek küt uç oluşturan bir enzimdir. pL1Hc plazmid DNA’sının *HincII* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.13.’de verilmiştir.

Çizelge 3.13. pL1Hc vektörünün *HincII* endonükleazı ile kesim reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
pL1Hc	2000 ng/µl	5 µl	10000 ng
Reaksiyon tamponu	10 X	4 µl	1 X
<i>HincII</i> enzimi	10 U/µl	1 µl	10 U
Deionize su	-	30µl	-
TOPLAM	-	40 µl	-

3.2.4.1(4). Likenaz İnsörtünün Elektroforezi ve Agaroz Jelden Arıtılması

Likenaz insörtünün elektroforezi ve agaroz jelden arıtılması 3.2.2.1(5)’e göre yapılmıştır.

3.2.4.1(5). Likenaz Geninin pMK3'e Ligasyonu

Agaroz jelden saflaştırılan likenaz genine ait fragment ile küt uç oluşturan *SmaI* enzimiyle kesilmiş *E. coli*-*B. subtilis* mekik vektörü pMK3'ün (Şekil 8.2) ligasyonu Çizelge 3.14'e göre yapılmıştır.

Çizelge 3.14. Likenaz geni ile pMK3 vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
Likenaz/ <i>HincII</i>	600g/µl	1 µl	600 ng
pMK3/ <i>SmaI</i>	1000 ng/µl	0.3 µl	330 ng
Reaksiyon tamponu	10 X	2 µl	1 X
T4 DNA ligaz	5 U/µl	1 µl	5 U
PEG	%50 w/v	2 µl	%5 w/v
Deionize su	-	13.7 µl	-
TOPLAM	-	20 µl	-

Ligasyon sıvısı *E.coli* DH5α suşuna CaCl₂ metoduna göre transfer edilmiştir (Hanahan, 1983).

3.2.4.1(6). Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon

Kompetent bakteri oluşturmada kullanılan *E. coli* DH5α suşu, Ek 2.5.'de verilen protokol uygulanarak kompetent hale getirilmiş ve ligasyon reaksiyonu sıvısından belli bir miktar alınarak Ek 2.6.'da verilen protokole göre transfer yapılmıştır.

3.2.4.1(7). pMK3Lik (pMK3+Likenaz) Plazmidini Taşıyan *Escherichia coli* Kolonilerinin Belirlenmesi

pMK3Lik (pMK3+Likenaz) plazmidini taşıyan *E. coli* kolonilerinin belirlenmesi 3.2.2.2(5)'e göre yapılmıştır.

3.2.4.1(8). *Escherichia coli*/pMK3Lik'e İlişkin Plak Testleri

Plaklarda rekombinantların tespiti için; transformasyon plağında gelişen beyaz renkli rekombinant kolonilerin her biri ayrı bir steril kürdanla alınarak LB/Amp/Agar ve LB/Lik/Amp/Agar plaklarına iki kopya olacak şekilde aktarılmış ve tekrar 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün likenan substratı içeren plak alınarak Kongo-Red boyaması yapılmış ve etrafında sarı zon olan likenaz pozitif koloniler tespit edilmiştir (Teather ve Wood, 1982).

3.2.4.2. Likenaz Geninin *Escherichia coli*-*Bacillus* sp. Mekik Vektörü pMK3 ile *Bacillus coagulans*'a Aktarılması**3.2.4.2(1). pMK3Lik Rekombinant Vektörünün *Bacillus coagulans* Bakterisine Elektrotransformasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Seçimi**

Rekombinant *E. coli* kolonilerinden izole edilen pMKLik plazmidi, Ek 2.4'e göre saflaştırıldıktan ve Ek 2.2.'ye göre RNA'dan arındırıldıktan sonra *B. coagulans*'a aktarılmasında *B. subtilis*'e elektrotransformasyon yöntemi (Vehmaanperä, 1989) modifiye edilerek uygulanmıştır (Ek 2.7.). Transformasyon sonrasında MedyumI/Kan/Agar (10 µg/ml kanamisin) üreyen koloniler rekombinant olarak tespit edilmiştir.

3.2.4.2(2). *Bacillus coagulans*/pMK3Lik'e İlişkin Plak Testleri

Plaklarda rekombinantların tespiti için; transformasyon plağında gelişen beyaz renkli rekombinant kolonilerin her biri ayrı bir steril kürdanla alınarak MedyumI/Kan/Agar ve MedyumI/Likenan/Kan/Agar plaklarına iki kopya olacak şekilde aktarılmış ve tekrar 40 °C'ye ayarlanmış inkübatörde üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün likenan substratı içeren plak alınarak Kongo-Red boyaması yapılmıştır (Teather ve Wood, 1982).

3.2.4.2(3). Değişik pH'lardaki Besi Yerinde Likenaz Aktivitesinin Tespiti

Değişik pH'larda likenaz aktivitesinin tespiti için pH 5, 6, 7, 8, 9, 10'da hazırlanan LB/Likenan/Agar besiyeri yerine orijinal ve rekombinant bakteriler inoküle edilerek karşılaştırılmıştır. Bu besiyeri yerine inoküle edilen bakteriler 37°C'de 1 gece üretildikten sonra Kongo-Red boyaması yapılarak likenaz aktivitesi belirlenmiştir (Teather ve Wood, 1982).

3.2.5. Fitaz ve Likenaz Genlerini Taşıyan Rekombinant Bakterilere İlişkin SDS-PAGE ve Zymogram Analizleri**3.2.5(1). Bakterilerden Proteinlerin İzolasyonu**

Orijinal ve rekombinant plazmidleri taşıyan (pMK3F ve pMK3Lik) *E. coli* ve *B. coagulans* bakterisilerinden hem hücre içi (intraselüler) hem de hücre dışı (ekstraselüler) protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İntraselüler protein izolasyonu için, 48 saat süreyle üretilmiş bakteriler 4500 dev/dk da 10 dakika süreyle santrifüjle çöktürülmüş ve elde edilen bakteri peleti başlangıç hacmine eşit saf su ile çözülmüştür. Elde edilen bakteri çözeltisi buz içerisinde 1 dakika süreyle sonikasyon işlemine tabi tutularak (50-60 kHz) hücreler patlatılmış, açığa çıkan hücresel atıklar ise 4500 dev/dk da santrifüjle uzaklaştırılmıştır. Son olarak hücre içi proteinleri içeren süpernatant kısım Ek 2.9'da verilen protokole göre TCA ile muamele edilerek proteinler elde edilmiştir. Hücre dışı proteinler ise yine Ek 2.9.'da verilen protokole göre TCA ile muamele edilerek elde edilmiştir. Son olarak protein örnekleri üzerine hacmin yarısı kadar kaynatma solüsyonu (Ek. 1.22.) ilave edilerek SDS-PAGE'de elektroforez için hazır hale getirilmiştir.

3.2.5(2). Bakterilere Ait Toplam Proteinlerin SDS-PAGE’de Karşılaştırılması

Protein örnekleri %12’lik SDS-PAGE jele yüklenerek uygun volt ve mA değerlerinde proteinlerin jel içerisinde birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi tamamlandıktan sonra, jel dikkatli bir şekilde iki cam levha arasından çıkarılarak içerisinde boya solüsyonu (Coomassie blue) (Ek 1.24.) bulunan bir kabın içerisine konmuş ve 45-60 dk süreyle jelin boyanması için beklenmiştir. Boyama tamamlandıktan sonra jel boyadan alınmış ve içerisinde destain solüsyonu (yıkama solüsyonu) (Ek 1.25.) bulunan bir kaba konarak fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Son olarak bakterilere ait toplam hücre içi ve hücre dışı proteinler karşılaştırılmıştır.

3.2.5(3). Bakteriyel Proteinlerin SDS-Buğday Kepeği Ekstraktı/Sodyum Fitat-PAGE ve SDS-Likenan-PAGE’de Karşılaştırılması

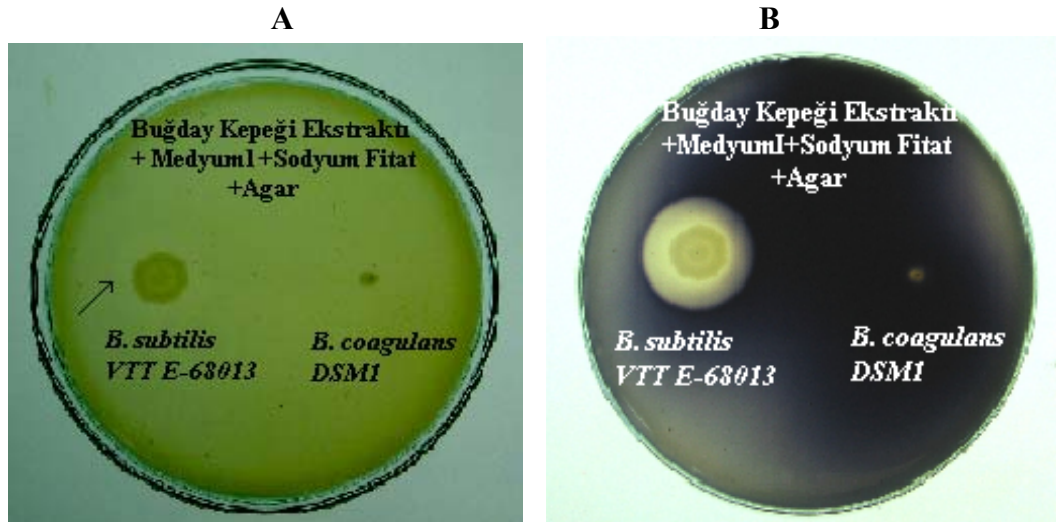
Protein örnekleri %12’lik SDS-Buğday Kepeği Ekstraktı/Sodyum Fitat-PAGE ve SDS-Likenan-PAGE (%0.2 w/v likenan) jele yüklenerek proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi sağlanmıştır. Proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi tamamlandıktan sonra jel Ek 2.11.’de verilen protokole göre muamele edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

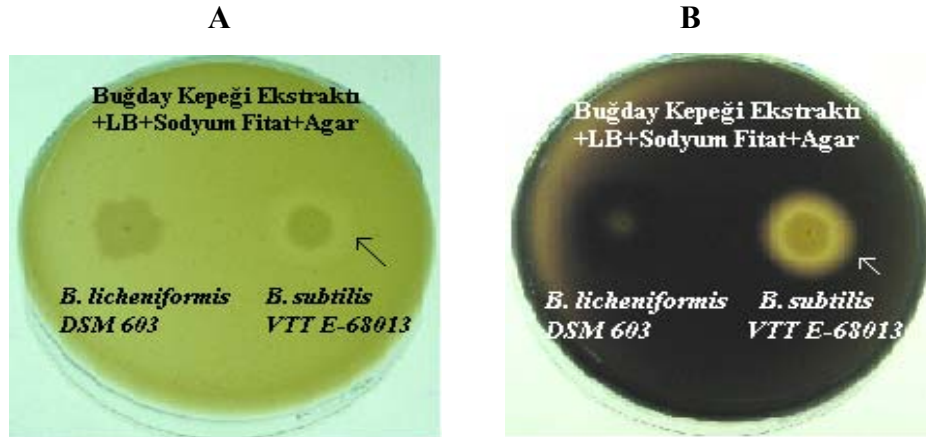
4.1.1 Bakterilerin Enzim Aktiviteleri ve Değişik Antibiyotiklere Dirençleri

Fitaz aktivitesine sahip olduğu bilinen *B. subtilis* VTT E-68013 ve fitaz geninin klonlanacağı *B. coagulans* DSM1 suşları sıvı besi yerinde üretildikten sonra Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerine inoküle edilmiş ve 37°C’de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası *B. subtilis* VTT E-68013 suşu bu besi yerinde zon oluştururken *B. coagulans* DSM1 suşu zon oluşturmamıştır (Şekil 4.1-A). Oluşan zonları daha iyi tespit edebilmek için aynı besi yeri iyodin buharı ile boyanmıştır (Şekil 4.1-B).



Şekil 4.1. A: *B. subtilis* VTT E-68013 ve *B. coagulans* DSM1 suşlarının Buğday Kepeği Ekstraktı/Medyum I/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerinde fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi, **B:** *B. subtilis* VTT E-68013 ve *B. coagulans* DSM1 suşlarının ürettiği Buğday Kepeği Ekstraktı/Medyum I/Sodyum Fitat/Agar katı besinin iyodin buharı ile boyanması

Fitaz geni içeren diğer klon *B. licheniformis* DSM 603 ile *B. subtilis* VTT E-68013 suşları Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerine inoküle edildiğinde bu besi yerinde *B. licheniformis*’in *B. subtilis* VTT E-68013 suşu gibi bir zon oluşturmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. **A:** *B. licheniformis* DSM 603 ve *B. subtilis* VTT E-68013 suşlarının Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerinde fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi, **B:** *B. licheniformis* DSM 603 ve *B. subtilis* VTT E-68013 suşlarının ürettiği Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerinin iyodin buharı ile boyanması

B. coagulans DSM1, *B. subtilis* VTT E-68013 ve *B. licheniformis* DSM 603 suşlarının fitaz ve diğer enzimler bakımından besi yerlerinde yapılan enzim aktivitesi test sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Ayrıca bu bakterilerin değişik antibiyotiklere olan direncini belirlemek amacıyla yapılan antibiyogram sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Bu testler sonucunda *B. coagulans* bakterisinin, belirtilen enzim aktivitelerine ve test edilen antibiyotiklere dirençli olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle *B. coagulans* DSM1 bakterisinin test edilen enzim aktivitelerine sahip olmaması ve kullanılacak vektörlerdeki direnç genlerini içermemesi nedenleriyle fitaz ve likenaz genlerinin klonlanmasında uygun bir suş olabileceği düşünülmüştür.

Çizelge 4.1. Bakterilerin besi yerlerinde enzim aktiviteleri

Enzim Aktivitesi	Bakteriler		
	<i>B. coagulans</i> DSM1	<i>B. subtilis</i> VTT E-68013	<i>B. licheniformis</i> DSM 603
Likenaz	-	+	+
α -Amilaz	-	+	+
Selülaz	-	-	+
Ksilanaz	-	+	+
Proteaz	-	+	+
Fitaz	-	+	+

Çizelge 4.2. Bakterilerin değişik antibiyotiklere dirençleri

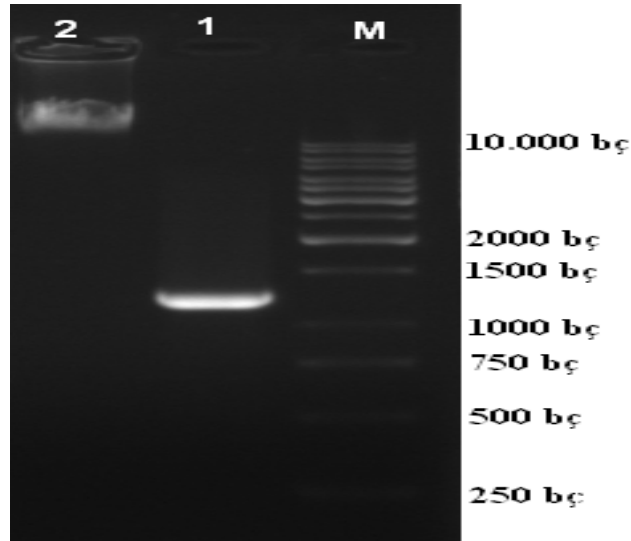
Antibiyotikler	Bakteriler		
	<i>B. coagulans</i> DSM1	<i>B. subtilis</i> VTT E-68013	<i>B. licheniformis</i> DSM 603
Kanamisin (30 µg)	-	-	-
Ampisilin (10 µg)	-	+	+
Kloramfenikol (30 µg)	-	-	-
Tetrasiklin (30 µg)	-	+	+
Penisilin (10 µg)	-	-	-
Gentamisin(10 µg)	-	-	-

4.1.2. Fitaz Geninin Klonlanmasına Yönelik Bulgular

4.1.2.1. *Bacillus subtilis* VTT E-68013'e Ait Fitaz Geninin (*phyC*) *Escherichia coli*'ye Aktarılması

4.1.2.1(1). Fitaz Geninin (*phyC*) PCR ile Amplifikasyonu

B. subtilis VTT E-68013 bakterisi kromozomunda bulunan fitaz (*phyC*) geni PCR ile amplifiye edilerek fitaz genini içeren yaklaşık 1300 bp büyüklüğündeki DNA fragmenti %0.8 w/v'lik agaroz jelde gözlenmiştir (Şekil 4.3.).

**Şekil 4.3.** Fitaz genine ait PCR ürününün agaroz jelde görüntüsü

M: 1 kb DNA Markır, **1:** *B. subtilis* VTT E-68013'ün Fitaz geni (*phyC*) PCR ürünü, **2:** *B. subtilis* VTT E-68013 suşunun kromozomal DNA'sı

4.1.2.1(2). Fitaz Geninin (*phyC*) pRS416 Vektörüne Ligasyonu

Fitaz geninin *B. coagulans* bakterisinde klonlanmasında *E. coli*-*B. subtilis* mekik vektörü pMK3'ün kullanılması düşünülmüştür. Ancak vektörün küt uç oluşturan *SmaI* enzimiyle kesimi sonucu sağlıklı bir sonuç alınamaması nedeni ile ilk önce başka bir *E. coli* vektörüne genin takılması daha sonra da bu genin değişik enzimlerle kesilerek kullanacağımız *E. coli*-*B. subtilis* mekik vektörü pMK3'e takılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla bir *E. coli*-Maya (*S. cerevisiae*) replikatif mekik vektörü olan pRS416 plazmidi, ampicilin antibiyotik direnç geni ve *LacZ* genlerini taşıması ve *LacZ* gen bölgesi içerisinde çoklu klonlama bölgesi (MCS: Multiple Cloning Site) içermesi nedenleri ile PCR yöntemi ile amplifiye edilen fitaz geninin *E. coli*'de klonlanmasında kullanılmıştır.

PCR ile amplifikasyonu yapılan fitaz geni taşıyan DNA parçası (*phyC*) agaroz jelden saflaştırılarak *SmaI* enzimi ile düz zincir haline getirilmiş olan pRS416 plazmid DNA'sına ligasyonu yapılmıştır. Elde edilen ligasyon karışımı *E. coli* DH5 α bakterisine transfer edilmiştir.

4.1.2.1(3). pRS416F (pRS416+Fitaz) Vektörünü Taşıyan Rekombinant *Escherichia coli* Kolonilerinin Tespiti

Fitaz genini içeren pRS416F vektörünün *E. coli*'ye transferi sonucunda LB/Xgal/Amp/Agar plaklarında rekombinant (beyaz) ve rekombinant olmayan (mavi) kolonilerin geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.4.).

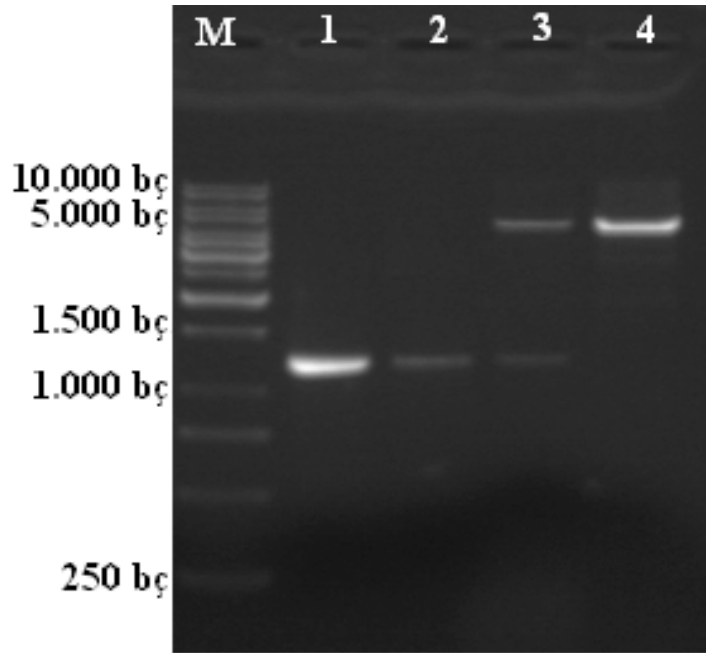


Şekil 4.4. LB/X-gal/Amp/Agar'lı besi yerinde pRS416F (pRS416+Fitaz geni) plazmidini taşıyan rekombinant *E. coli* kolonilerin seçimi

Burada rekombinant olmayan bakteriler, pRS416 plazmid DNA'sının üzerinde bulunan *LacZ* geninden dolayı ortamdaki X-gal'i parçalayarak mavi renkte koloni oluşturmuşlardır. Rekombinant bakteriler ise, içerisine fitaz geninin girmesinden dolayı *LacZ* geni inaktif hale geçmiş ve ortamdaki X-gal'i parçalayamayıp beyaz renkli koloni oluşturmuşlardır.

4.1.2.1(4). *Escherichia coli* Kolonilerinden pRS416F Plazmidinin İzolasyonu ve İnsört ve PCR Analizi

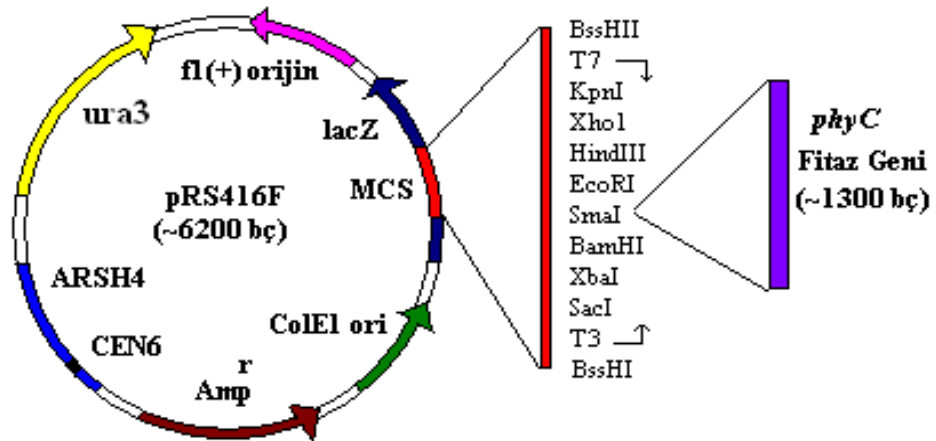
Transformasyon plağında gelişen beyaz renkli rekombinant kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen pRS416F plazmidinin *HindIII*+*BamHI* enzimleriyle kesilmesi sonucunda agaroz jelde; beklenildiği gibi 4898 bp büyüklüğündeki pRS416 vektör DNA'sı (geride kalan bant) ve diğeri yaklaşık 1300 bp büyüklüğündeki Fitaz geni fragmenti (öndeki bant) olmak üzere iki bant oluşmuştur (Şekil 4.5-Sütun 3).



Şekil 4.5. pRS416F plazmidinin agaroz jelde insört analizi

M: 1kb DNA Markır, 1: *B. subtilis* VTT E-68013'ün Fitaz geni PCR ürünü, 2: pRS416F plazmidi PCR ürünü, 3: pRS416F/*HindIII*+*BamHI* kesimi, 4: pRS416/*HindIII*+*BamHI* kesimi

Rekombinant pRS416F (pRS416+Fitaz geni (*phyC*)) plazmidinin yapısı Şekil 4.6'de verilmiştir.



Şekil 4.6. pRS416F plazmidinin yapısı (6200 bç (pRS416 (4898 bç)+Fitaz Geni (*phyC*) (~1300 bç))

4.1.2.2. Fitaz Geninin (*phyC*) *Bacillus coagulans*'a Aktarılması

4.1.2.2(1). Fitaz Geni (*phyC*) ile pMK3 Vektörünün Ligasyonu

E. coli-Maya mekik vektörü olan pRS416'ya fitaz geni takılarak oluşturulmuş pRS416F vektöründen *HindIII*+*BamHI* enzimleri ile kesilerek çıkarılan yaklaşık 1300 bp büyüklüğündeki fitaz geni ile yine aynı enzimler ile kesilen pMK3 vektörünün ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon karışımından bir miktar alınarak *E. coli* DH5α bakterisine transfer edilmiştir.

4.1.2.2(2). pMK3F (pMK3+Fitaz) Vektörü Taşıyan Rekombinant *Escherichia coli* Kolonilerinin Tespiti

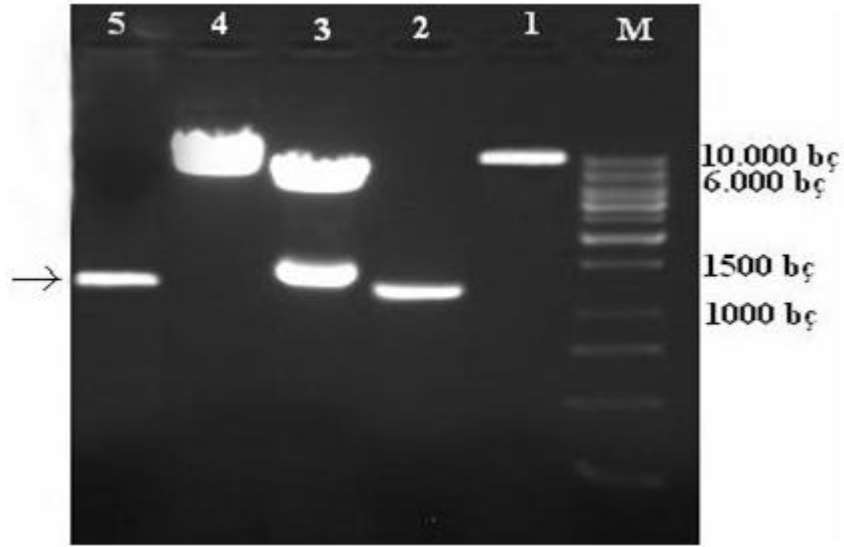
Bir *E.coli*-*B. subtilis* replikatif mekik vektörü olan ve yapısında Ampisilin (Amp) ve Kanamisin (Kan) direnç genlerini ile *Lac Z* genini taşıyan pMK3 plazmidini, fitaz geninin (*phyC*) *B. coagulans* bakterisine aktarılmasında kullanılmıştır. Fitaz genini içeren pMK3F vektörünün transferi sonucunda LB/X-gal/Amp/Agar plaklarında rekombinant (beyaz) ve non-rekombinant (mavi) kolonilerin geliştiği gözlenmiştir. Bu besi yerinde yine non-rekombinant bakteriler mavi renkte koloni oluştururken, pMK3F plazmidini taşıyan rekombinant bakteriler ise, içerisine fitaz geninin girmesinden dolayı beyaz renkli koloni oluşturmuşlardır (ok ile gösterilmiştir) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. LB/X-gal/Amp/Agar'lı besi yerinde pMK3F (pMK3+Fitaz geni) plazmidini taşıyan rekombinant *E. coli* kolonilerin seçimi

4.1.2.2(3). *Escherichia coli* Kolonilerinden pMKF Plazmidinin İzolasyonu ve İnsört ve PCR Analizi

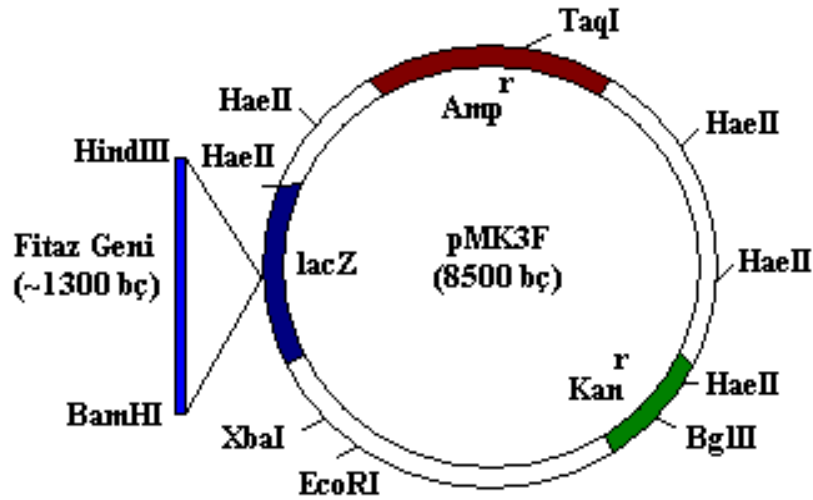
Beyaz renkli kolonilerden izole edilen pMK3F plazmidi *HindIII*+*BamHI* enzimleriyle kesilerek insört analizi yapılmıştır. Kesim reaksiyonu sonucunda agaroz jelde beklenildiği gibi 7.2 kb'lık büyüklüğündeki pMK3 vektörü (geride kalan bant) ve yaklaşık 1.3 kb'lık büyüklüğündeki fitaz geni olmak üzere iki bant gözlenmiştir (Şekil 4.8-Sütun 3). Ayrıca agaroz jelde, pMK3F plazmidi kullanılarak hazırlanan PCR ürünü olan fitaz genine ait fragment ile *B. subtilis* VTT E-68013 suşuna ait kromozomal DNA kullanılarak hazırlanmış PCR ürünü fitaz geni fragmenti aynı hızda bulunmuştur (Şekil 4.8-Sütun 5).



Şekil 4.8. pMK3F plazmidinin agaroz jelde insört analizi

M: 1kb DNA Markır, 1: pMK3/*HindIII*+*BamHI* kesimi, 2: *B. subtilis* VTT E-68013'e ait Fitaz geni PCR ürünü, 3: *E. coli*/pMK3F/*HindIII*+*BamHI* kesimi, 4: *E. coli*/pMK3F/*HindIII* kesimi, 5: *E. coli*/pMK3F plazmidi PCR ürünü

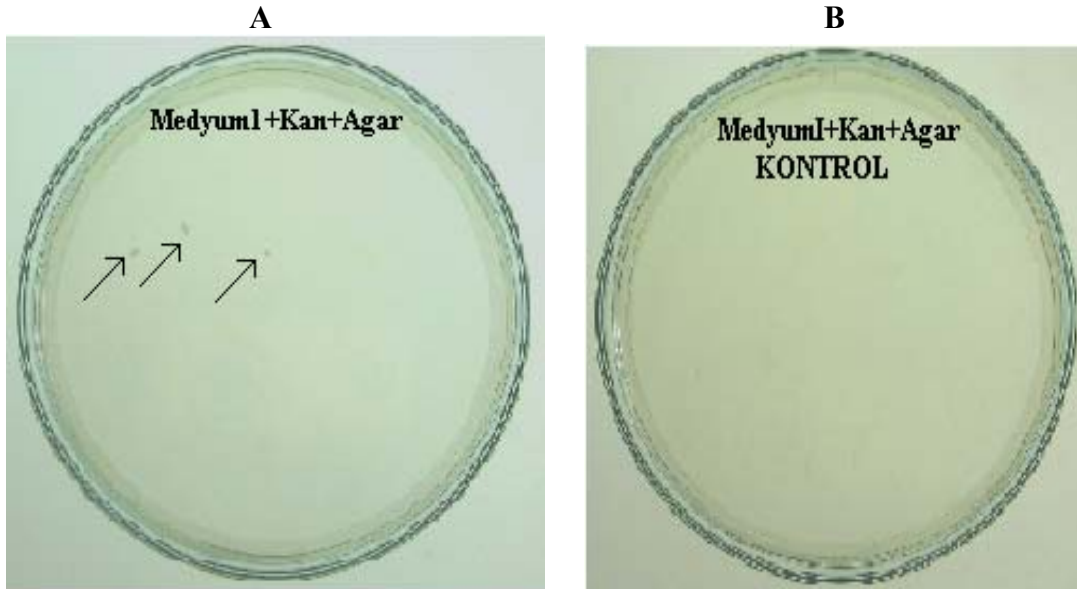
Rekombinant pMK3F (pMK3+Fitaz geni) plazmidinin yapısı 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. pMK3F plazmidinin yapısı (8500 bç (pMK3 (7200 bç)+Fitaz Geni (~1300 bç))

4.1.2.2(4). Rekombinant pMK3F Plazmidinin *Bacillus coagulans*'a Aktarılması

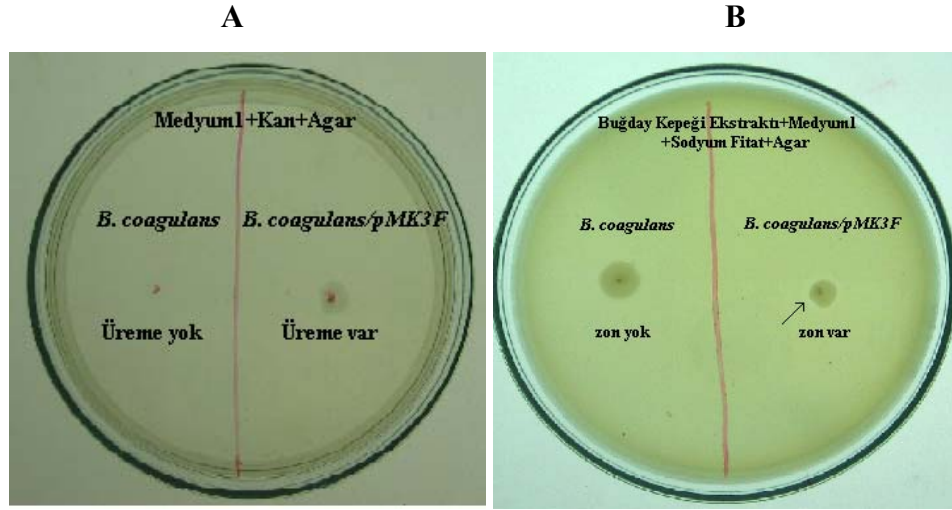
Rekombinant pMK3F (pMK3+Fitaz) plazmidinin *B. coagulans*'a aktarılmasında *B. subtilis*'e elektrotransformasyon yöntemi (Vehmaanperä, 1989) modifiye edilerek uygulanmıştır. Elektrotransformasyon sonrasında 10 µg/µl Kanamisin antibiyotiği içeren MedyumI/Agar besi yerinde rekombinat *B. coagulans* kolonilerin ürediği gözlenmiştir (Şekil 4.10-A). Kanamisin antibiyotiğine direnci olmayan ve plazmid aktarılmayan *B. coagulans* bakterisi ise Kontrol plağında üreme göstermemiştir (Şekil 4.10-B).



Şekil 4.10. **A:** MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde üreyen pMK3F plazmidini taşıyan rekombinant *B. coagulans* kolonileri, **B:** Kontrol plağı (MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde plazmid aktarılmayan *B. coagulans*)

Orijinal *B. coagulans* ve fitaz genini taşıyan rekombinant *B. coagulans* bakterileri MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerine inoküle edildiğinde; Kanamisin antibiyotiğine direnci olmayan *B. coagulans* bakterisinin üremediği, rekombinant *B. coagulans*/pMK3F bakterisinin ise aynı besi yerinde ürediği gözlenmiştir (Şekil 4.11/A). Aynı bakteriler Buğday Kepeği Ekstraktı/MedyumI/Sodyum Fitat/Agar besi yerine inoküle edildiğinde ise; orijinal *B. coagulans* bakterisi bu besi yerinde bir zon

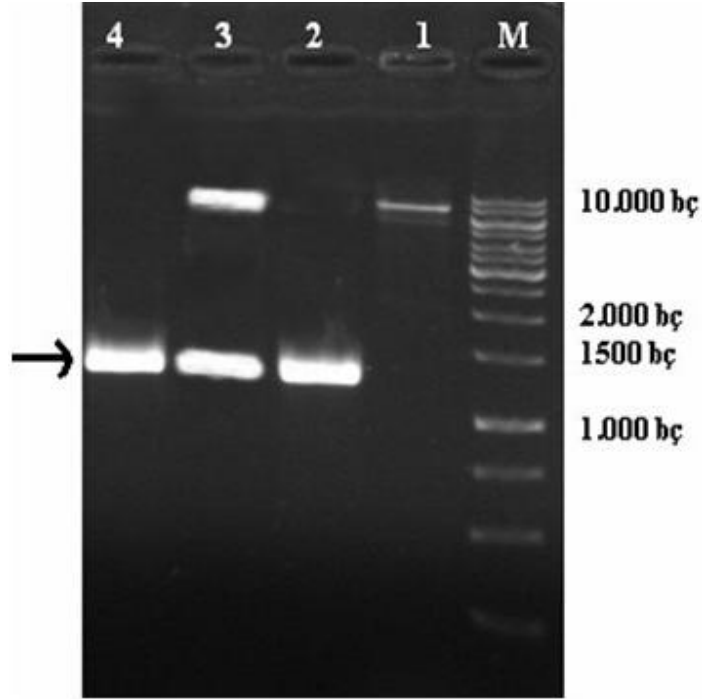
oluşturmaz iken fitaz genini taşıyan rekombinant *B. coagulans* bakterisi aynı besi yerinde küçük bir zon oluşturmuştur (Şekil 4.11/B).



Şekil 4.11. A: Orijinal *B. coagulans* ve fitaz genini taşıyan rekombinant *B. coagulans* bakterilerinin MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde üremesi, **B:** Orijinal *B. coagulans* ve fitaz genini taşıyan rekombinant *B. coagulans* bakterilerinin Buğday Kepeği Ekstraktı/MedyumI/Sodyum Fitat/Agar besi yerinde üremesi

4.1.2.2(5). Rekombinant *Bacillus coagulans* Kolonilerinden pMK3F Plazmidinin İzolasyonu ve İnsört ve PCR Analizi

MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde üreyen pMK3F plazmidini taşıyan rekombinant *B. coagulans* kolonileri sıvı besi yerinde üretildikten sonra plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen rekombinant plazmid (pMK3F) kullanılarak insört analizi ve PCR ile fitaz geninin amplifikasyonu (çoğaltılması) yapılmıştır (Şekil 4.12). Agaroz jelde, *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisinin Fitaz geni PCR ürünü ile *B. coagulans*/pMK3F plazmidinin PCR ürünü aynı hizada bulunmuştur (Şekil 4.12-Sütun 2 ve 4).



Şekil 4.12. *B.coagulans*/pMK3F plazmidinin agaroz jelde insört analizi

M: 1kb DNA Markır, **1:** pMK3/*HindIII*+*BamHI* kesimi, **2:** *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisinin Fitaz geni PCR ürünü, **3:** *B. coagulans*/pMK3F/*HindIII*+*BamHI* kesimi, **4:** *B. coagulans*/pMK3F plazmidinin PCR ürünü

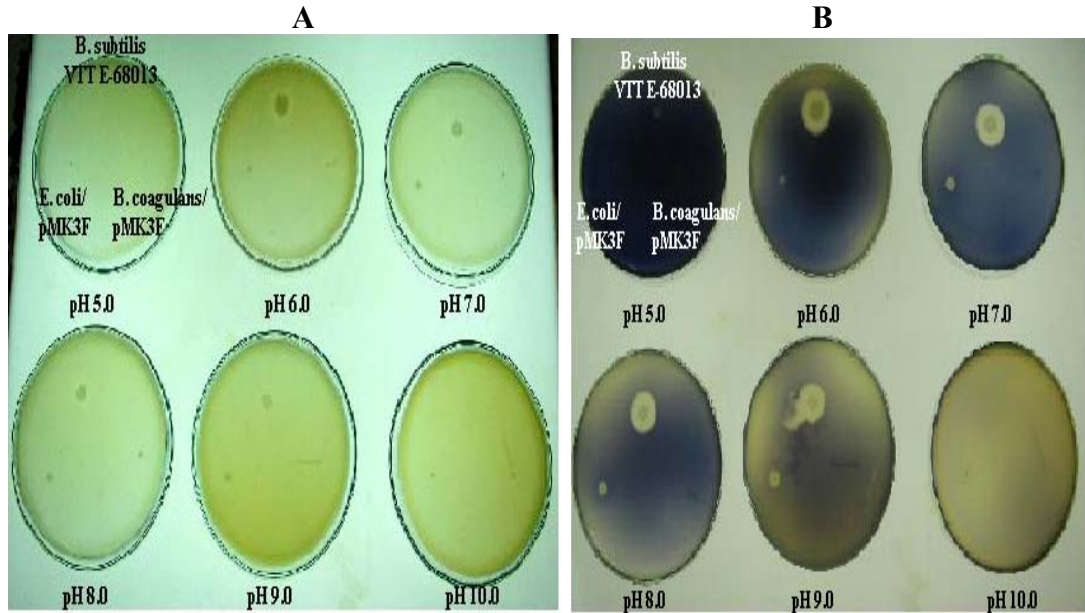
4.1.2.2.(6). Değişik pH'lardaki Besi Yerinde Rekombinant Bakterilerin Fitaz Aktivitesinin Tespiti

Rekombinant bakterilerin değişik pH'lardaki Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar besi yerinde fitaz enzim aktivitesi tespiti için bakteriler (*B. subtilis* VTT E-68013, *E. coli*/pMK3F, *B. coagulans*/pMK3F) bu besi yerlerine inoküle edilmiştir. Bakterilerin bu besi yerinde üreme durumları Çizelge 4.3'de verilmiştir. *B. subtilis* VTT E-68013 suşu pH 5 ve 10'da üremezken, *E. coli*/pMK3F test edilen tüm pH'larda üremiş, *B. coagulans*/pMK3F ise sadece pH 5'de ürememiştir.

Çizelge 4.3. Rekombinant bakterilerin değişik pH'larda üreme durumları

pH	Bakteriler		
	<i>B. subtilis</i> VTT E-68013	<i>E. coli</i> /pMK3F	<i>B. coagulans</i> /pMK3F
5	-	+	-
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	-	+	+

Değişik pH'lardaki besi yerine inoküle edilen bakterilerin fitaz aktivitesinin tespiti için bu besi yerinde oluşturdukları zonlara bakılmıştır (Şekil 4.13-A). Oluşan zonları daha iyi tespit edebilmek için aynı besi yeri iyodin buharı ile boyanmıştır (Şekil 4.13-B). *B. subtilis* VTT E-68013 suşu pH 5 ve 10 hariç diğer test edilen pH'larda fitaz aktivitesi gösterirken diğer bakteriler (*E. coli*/pMK3F, *B. coagulans*/pMK3F) tüm pH'larda aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.4).



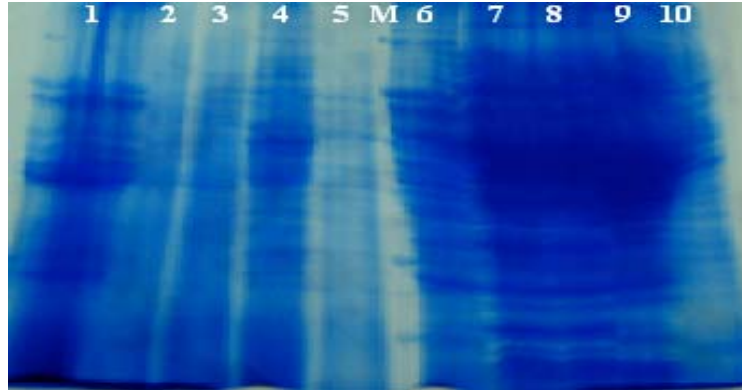
Şekil 4.13. **A:** Bakterilerin (*B. subtilis* VTT E-68013, *E. coli*/pMK3F, *B. coagulans*/pMK3F) değişik pH'larda (5, 6, 7, 8, 9, 10) Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar besi yerinde fitaz aktivitesi, **B:** Bakterilerin inoküle edildikleri değişik pH'lardaki Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar besi yerinin iyodin buharı ile boyanması

Çizelge 4.4. Rekombinant bakterilerin değişik pH'larda fitaz aktivitesi

pH	Bakteriler		
	<i>B. subtilis</i> VTT E-68013	<i>E. coli</i> /pMK3F	<i>B. coagulans</i> /pMK3F
5	-	-	-
6	+	-	-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	-	-	-

4.1.2.2(7). Fitaz Genini (*phyC*) Taşıyan Rekombinant Bakterilerin SDS-PAGE'de Toplam Proteinleri Profillerinin İncelenmesi ve Zymogram Analizleri

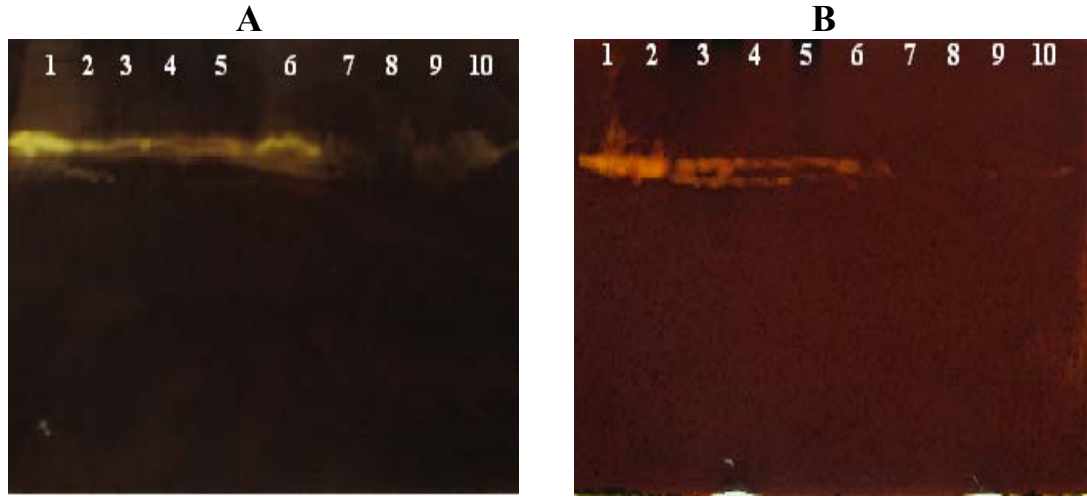
B. subtilis VTT E-68013, *E. coli* DH5 α , *E. coli*/pMK3F, *B. coagulans* ve *B. coagulans*/pMK3F bakterilerine ait hücre dışındaki ve hücre içindeki toplam proteinleri SDS-PAGE'de karşılaştırılmıştır. (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Değişik bakterilere ait protein profillerinin SDS-PAGE'de karşılaştırılması

1: *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **2:** *E. coli* DH5 α bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **3:** *E. coli*/pMK3F bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **4:** *B. coagulans* bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **5:** *B. coagulans*/pMK3F bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **M:** Markır, **6:** *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisine ait hücre içi proteinleri, **7:** *E. coli* DH5 α bakterisine ait hücre içi proteinleri, **8:** *E. coli*/pMK3F bakterisine ait hücre içi proteinleri, **9:** *B. coagulans* bakterisine ait hücre içi proteinleri, **10:** *B. coagulans*/pMK3F bakterisine ait hücre içi proteinleri

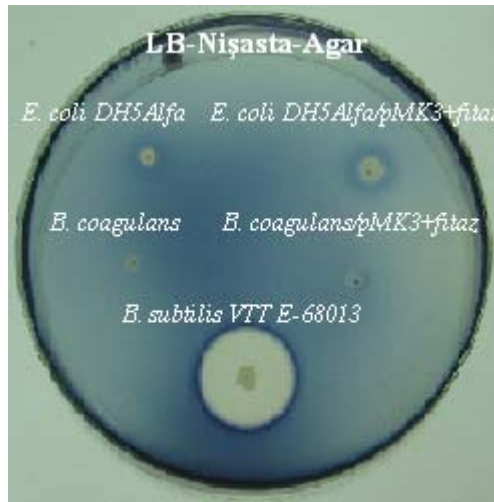
Zymogram analizinde fitaz aktivitesini tespit etmek için, SDS-PAGE'ye substrat olarak %10 buğday kepeği suyu ve %0.2 w/v Na-fitat ilave edilerek hazırlanmış jelde protein örnekleri yürütülmüştür. Jelin boyanması ise iyodin boyası ile yapılmıştır (Şekil 4.15-A). Buğday kepeği içerisinde bir miktar da nişasta bulunduğu için boyama sonrasında oluşan zonların fitaz enziminden mi yoksa başka bir aktiviteden mi (α -amilaz gibi) kaynaklandığını belirlemek için SDS-Nişasta-PAGE hazırlanmış ve aynı örnekler bu jelde de yürütülmüştür. Jelin boyanması yine iyodin boyası ile yapılmıştır (Şekil 4.15-B). Boyama sonrasında oluşan zonların buğday kepeği substratı içeren jeldeki zonlarla aynı hizada olması ve literatürde bildirilen fitaz enzimine ait büyüklükten daha fazla (43 kDa) olması nedeniyle bunların fitaz enzimine değil de α -amilaz enzimine ait olabileceği veya ikincil (background) bir aktivite olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.15. Bakterilerin değişik substratlar içeren SDS-PAGE'de renatürasyon sonrası enzim aktivitesi bakımından karşılaştırılması (A: Buğday kepeği suyu ve Na-Fitaz içeren SDS-PAGE, B: Nişasta içeren SDS-PAGE)

1: *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **2:** *E. coli* DH5 α bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **3:** *E. coli*/pMK3F bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **4:** *B. coagulans* bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **5:** *B. coagulans*/pMK3F bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **6:** *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisine ait hücre içi proteinleri, **7:** *E. coli* DH5 α bakterisine ait hücre içi proteinleri, **8:** *E. coli*/pMK3F bakterisine ait hücre içi proteinleri, **9:** *B. coagulans* bakterisine ait hücre içi proteinleri, **10:** *B. coagulans*/pMK3F bakterisine ait hücre içi proteinleri

E. coli DH5 α , *E. coli*/pMK3F, *B. coagulans*, *B. coagulans*/pMK3F, *B. subtilis* VTT E-68013 bakterilerinin, LB-nişasta-agar besiyerinde α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi için besiyerinde üreyen bakteriler iyodin buharıyla boyanmıştır. Boyama sonucunda *E. coli* DH5 α , *E. coli*/pMK3F, *B. coagulans*, *B. coagulans*/pMK3F bakterilerinin α -amilaz aktivitesine sahip olmadığı sadece *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisinin α -amilaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Değişik bakterilerin (*E. coli* DH5 α , *E. coli*/pMK3F, *B. coagulans*, *B. coagulans*/pMK3F ve *B. subtilis* VTT E-68013) nişastalı besiyerinde α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi

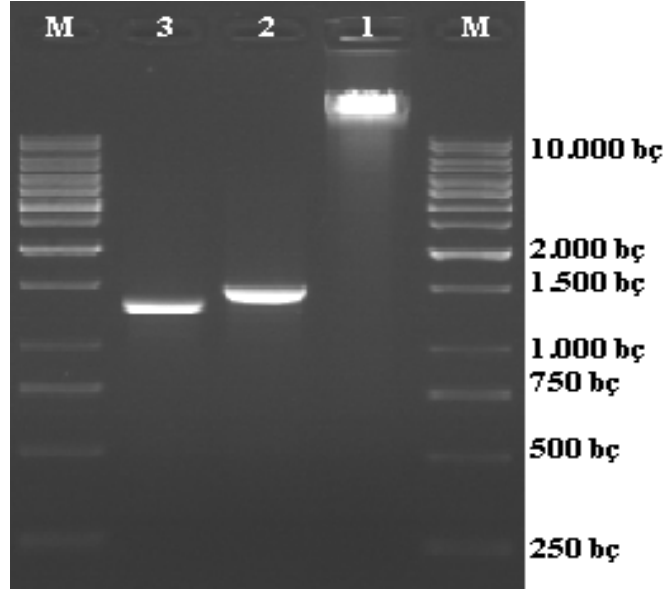
4.1.2.3. *Bacillus licheniformis* DSM 603'e Ait Fitaz Geninin (*phyL*) *Escherichia coli*'ye Aktarılması

4.1.2.3(1). Fitaz Geninin (*phyL*) PCR ile Amplifikasyonu

B. licheniformis DSM 603'e ait kromozomal DNA kullanılarak fitaz geninin amplifikasyonunda (çoğaltılması) PCR reaksiyonu için iki farklı ileri (forward) primer (FM1 ve FM2) ve bir adet ortak olarak kullanılmak üzere geri (reverse) primer (RM) hazırlanmıştır.

İki farklı ileri primer (FM1 ve FM2) kullanılarak elde edilen *B. licheniformis* DSM 603'e ait PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.17.'de verilmiştir.

FM1 primeri kullanılarak 1470 bç, FM2 primeri kullanılarak de 1335 bç büyüklüğünde fitaz genini taşıyan DNA fragmenti elde edilmiştir.



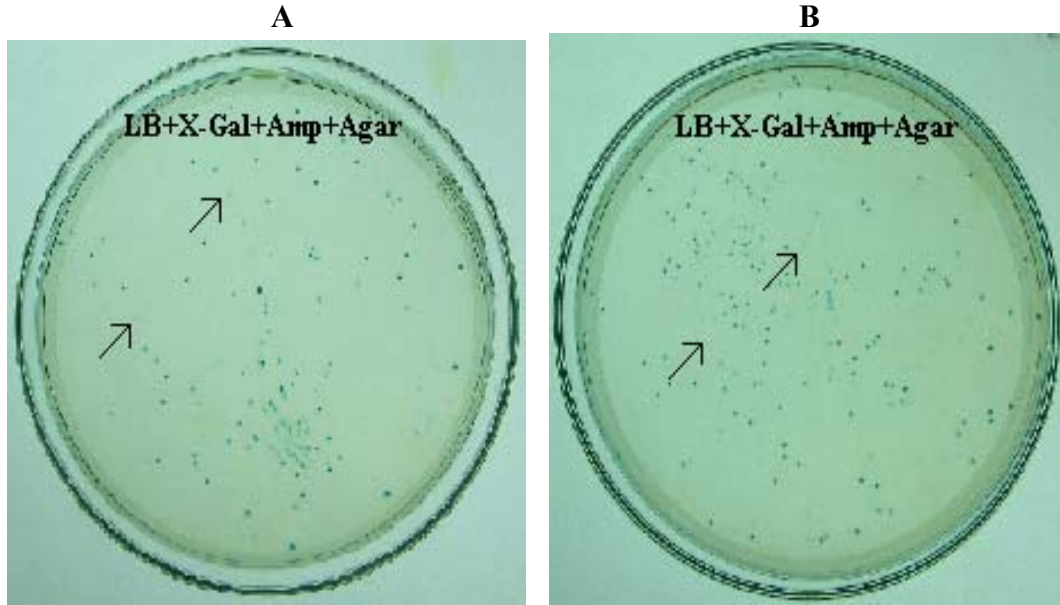
Şekil 4.17. *B. licheniformis* DSM 603 Fitaz genine ait PCR ürününün agaroz jelde görüntüsü
M: 1 kb DNA Markır, **1:** *B. licheniformis* DSM603 suşunun kromozomal DNA'sı, **2:** *B. licheniformis* DSM 603'ün Fitaz geni PCR ürünü (FM1), **3:** *B. licheniformis* DSM 603'ün Fitaz geni PCR ürünü (FM2)

4.1.2.3(2). Fitaz (*phyL*) Geninin pMK3 Vektörünün Oluşturulması ve Rekombinant *Escherichia coli* Kolonilerinin Tespiti

Fitaz geninin (*phyL*) *B. coagulans* bakterisinde klonlanmasında *E. coli*-*B. subtilis* mekik vektörü pMK3 kullanılmıştır. Vektör *LacZ* bölgesi içerisinde bulunan çoklu klonlama bölgesindeki (MCS:Multiple Cloning Site) *SmaI* kesim bölgesinden küt uç oluşturacak şekilde kesilmiştir.

Agaroz jelden saflaştırılan fitaz genleri (FM1 ve FM2) ile *SmaI* enzimiyle kesilerek küt uçlu pMK3 plazmidinin ligasyonu yapılarak pMK3FM1 ve pMK3FM2 rekombinant plazmidleri oluşturulmuştur. Ligasyon sıvısı *E.coli* DH5α suşuna CaCl_2 metoduna göre transforme edilmiştir (Hanahan, 1983). pMK3FM1 ve pMK3FM2 plazmidlerini taşıyan kolonilerin seçimi için transformantlar 100 µg/ml Ampisilin ve

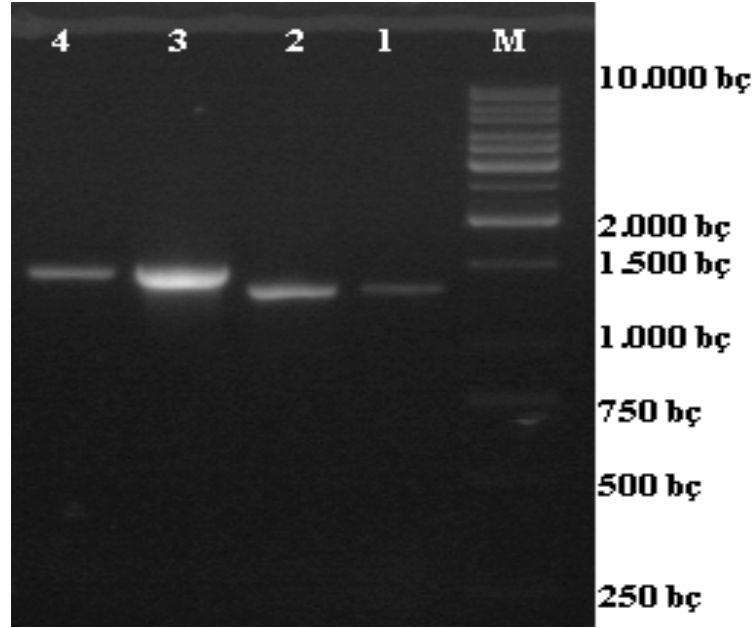
50 µg/ml X-Gal içeren LB-Agar besiyeri üzerinde üretilmişlerdir. Fitaz (*phyL*) genini içeren pMK3FM1 ve pMK3FM2 vektörlerinin transferi sonucunda LB/X-gal/Amp/Agar plaklarında rekombinant (beyaz) ve rekombinant olmayan (mavi) kolonilerin geliştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Transformasyon sonrası X-Gal ve Ampisilin içeren katı besiyeri üzerinde oluşan mavi-beyaz koloniler; **A:** *E.coli*/pMK3FM1, **B:** *E.coli*/pMK3FM2

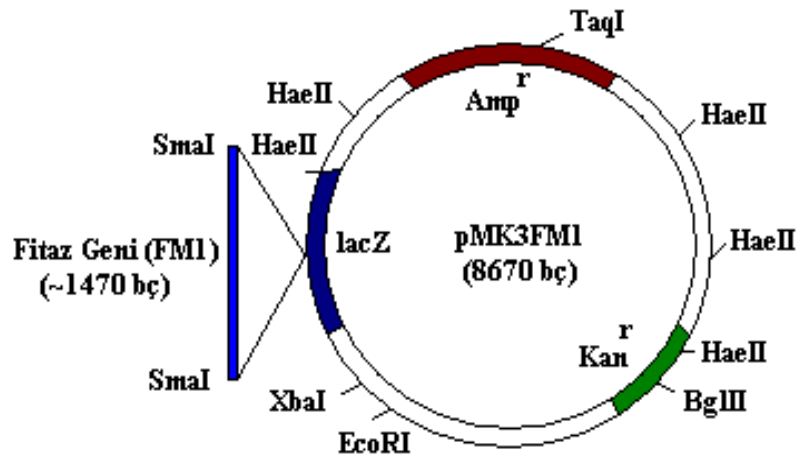
4.1.2.3(3). *Escherichia coli* Kolonilerinden pRS416F Plazmidinin İzolasyonu, İnsört ve PCR Analizi

Transformasyon plağında gelişen beyaz renkli rekombinant kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Agaroz jelde, beyaz renkli kolonilerden izole edilen pMK3FM1 ve pMK3FM2 plazmidleri kullanılarak hazırlanan PCR sonucunda fitaz genlerine ait fragment ile *B. licheniformis* DSM603 suşuna ait kromozomal DNA kullanılarak hazırlanmış PCR ürünü fitaz geni fragmenti aynı moleküler ağırlıkta bulunmuştur (Şekil 4.19).

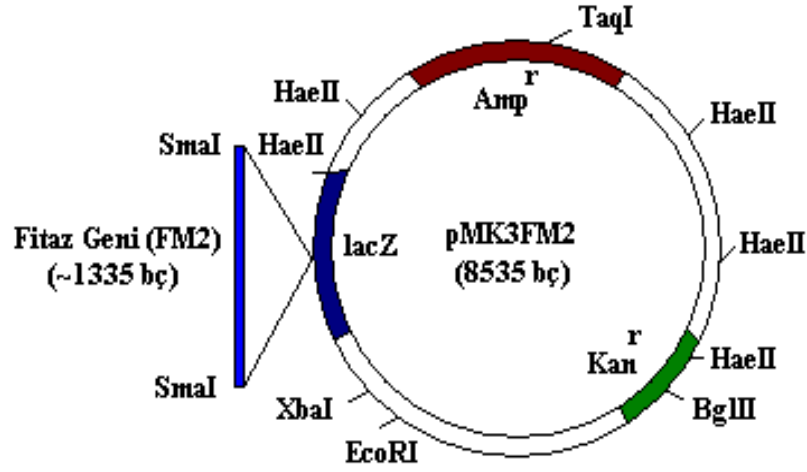


Şekil 4.19. pMK3FM1 ve pMK3FM2 plazmidlerinin agaroz jelde insört analizi
M: 1kb DNA Markır, **1:** *B. licheniformis* DSM603'ün Fitaz geni PCR ürünü (FM1), **2:** *E. coli*/pMK3FM1 plazmidi PCR ürünü, **3:** *B. licheniformis* DSM603'ün Fitaz geni PCR ürünü (FM2), **4:** *E. coli*/pMK3FM2 plazmidi PCR ürünü

Rekombinant pMK3FM1 ve pMK3FM2 (pMK3+Fitaz geni (*phyL*)) plazmidlerinin yapısı Şekil 4.20 ve 4.21'de verilmiştir.



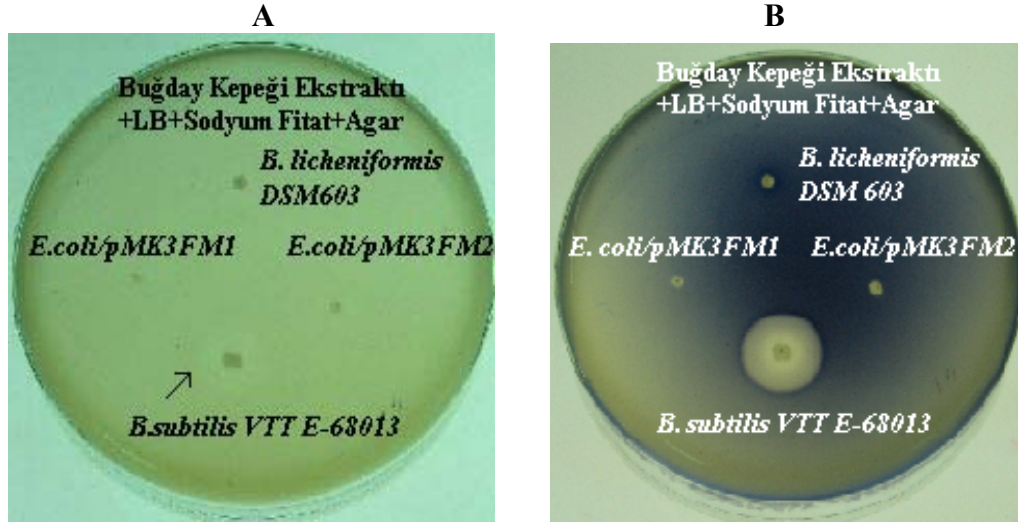
Şekil 4.20. pMK3FM1 plazmidinin yapısı (pMK3 (7200 bp)+Fitaz Geni (FM1 (~1470 bp)))



Şekil 4.21. pMK3FM2 plazmidinin yapısı (8535 bç (pMK3 (7200 bç)+Fitaz Geni (FM2(~1335 bç)))

4.1.2.3(4). *Escherichia coli*/pMKFM1 ve pMK3FM2 Rekombinant Kolonilerinin Besi Yerinde Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

E.coli/pMK3FM1 ve *E.coli*/pMK3FM2 bakterilerinin fitaz enzim aktivitesini belirlemek için *B. licheniformis* DSM 603 ve *B. subtilis* VTT E-68013 bakterileriyle birlikte Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar katı besiyeri üretilmiştir. Bu besiyerinde üreyen *B. subtilis* VTT E-68013 suşu etrafında zon oluştururken aynı besiyerinde *B. licheniformis* DSM 603, *E.coli*/pMK3FM1 ve *E.coli*/pMK3FM2 bakterilerinin etrafında bir zon oluşmamıştır (Şekil 4.22-A). *E.coli*/pMK3FM1 ve *E.coli*/pMK3FM2 rekombinant bakterilerde fitaz aktivitesi tespit edilememiştir. Oluşan zonları daha iyi tespit edebilmek için aynı besiyeri iyodin buharı ile boyanmıştır (Şekil 4.22-B).



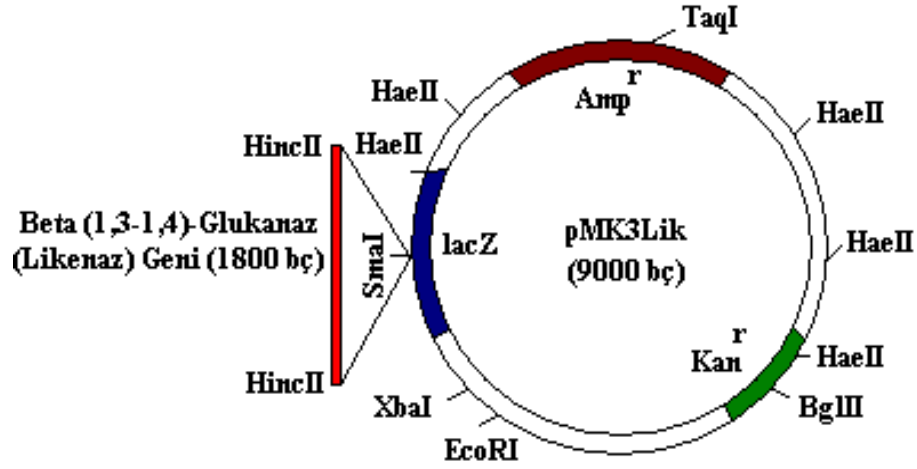
Şekil 4.22. A: *E. coli*/pMK3FM1 ve *E. coli*/pMK3FM2 bakterilerinin Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerinde fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi, **B:** *E. coli*/pMK3FM1 ve *E. coli*/pMK3FM2 bakterilerinin ürettiği Buğday Kepeği Ekstraktı/Medyum I/Sodyum Fitat/Agar katı besi yerinin iyodin buharı ile boyanması

4.1.3. β -(1,3-1,4)-Glukanaz (Likenaz) Geninin *Bacillus coagulans*'a Aktarılması

4.1.3.1. Likenaz Geninin *Escherichia coli*'e Aktarılması

4.1.3.1.(1). Likenaz Geni ile pMK3 Vektörünün Ligasyonu

β -(1,3-1,4)-glukanaz (Likenaz) geninin *B. coagulans* bakterisine aktarılmasında likenaz gen kaynağı olarak pL1Hc plazmidi küt uç oluşturacak *HincII* enzimiyle kesildikten sonra 1800 bp büyüklüğündeki likenaz genine ait DNA fragmenti agaroz jelden saflaştırılmıştır. *E. coli*-*B. subtilis* mekik vektörü pMK3'de küt uç oluşturan *SmaI* enzimiyle kesildikten sonra agaroz jelden saflaştırılan likenaz geni ile *SmaI* enzimiyle kesilmiş pMK3 plazmidinin ligasyonu yapılarak pMK3Lik rekombinant plazmidi oluşturulmuştur (Şekil 4.23). Ligasyon sıvısı *E. coli* DH5 α suşuna transforme edilmiştir.



Şekil 4.23. pMK3Lik plazmidinin yapısı (9000 bç (pMK3 (7200 bç)+Likenez Geni (1800 bç))

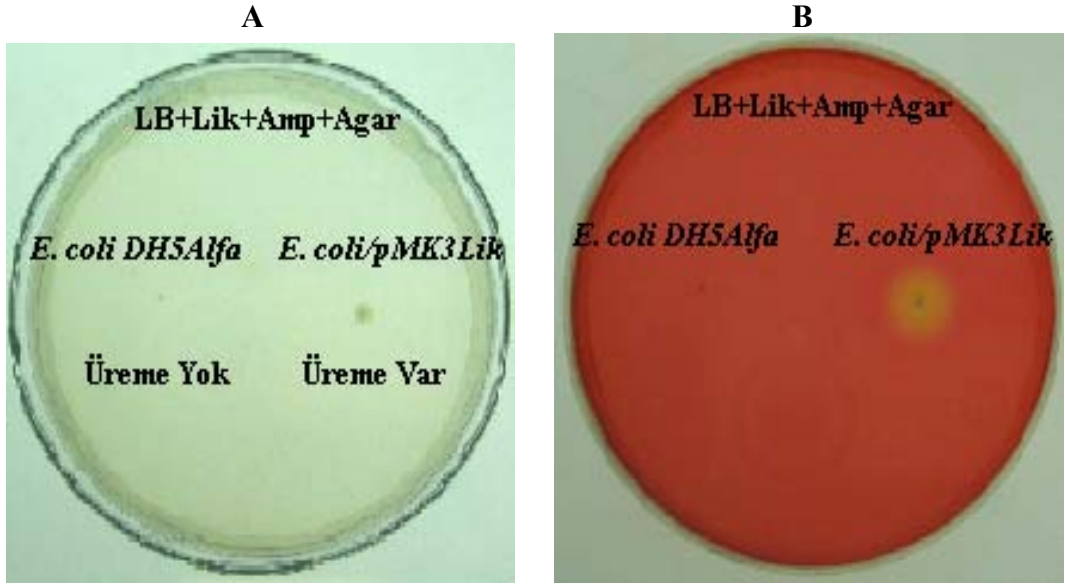
4.1.3.1(2). pMK3Lik (pMK3+Likenez) Vektörü Taşıyan Rekombinant *Escherichia coli* Kolonilerinin Tespiti

pMK3Lik plazmidini taşıyan kolonilerin seçimi için transformantlar 100 µg/ml Ampisilin ve 50 µg/ml X-Gal içeren LB-Agar besiyeri üzerinde üretilmişlerdir. Likenez genini içeren pMK3Lik vektörünün *E. coli*'ye transferi sonucunda LB/X-gal/Amp/Agar plaklarında rekombinant (beyaz) ve rekombinant olmayan (mavi) kolonilerin geliştiği gözlemlenmiştir.

4.1.3.1(3). *Escherichia coli*/pMK3Lik Rekombinant Kolonilerinin Besiyeri Üzerinde Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

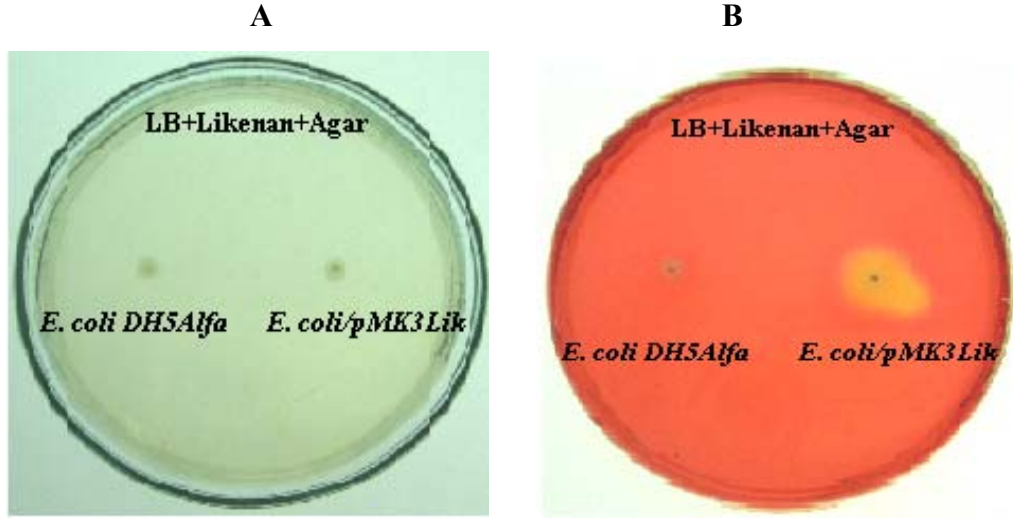
LB/X-gal/Ampisilin/Agar besiyeri üzerinde üreyen beyaz kolonilerin (*E.coli*/pMK3Lik) likenez aktivitesini belirlemek amacıyla katı LB/Likenez/Ampisilin içeren besiyeri yerine orijinal alıcı bakteri olan *E.coli* DH5α ile birlikte inoküle edilmiştir. Bu besiyeri üzerinde antibiyotik direnci olmayan alıcı bakteri *E.coli* DH5α üremezken pMK3Lik plazmidini taşıyan rekombinant *E. coli* hücreleri üremiştir (Şekil 4.24-A). Likenez aktivitesi testi için; aynı besiyeri Kongo-Red

boyası ile boyanmış ve *E.coli*/pMK3Lik bakterisi etrafında sarı zon oluşturduğundan likenaz pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 4.24-B).



Şekil 4.24. **A:** *E.coli*/DH5 α ve *E.coli*/pMK3Lik bakterilerinin LB/Likenan/Ampisilin/Agar besi yerinde üreme durumu, **B:** *E.coli*/pMK3Lik bakterisinin LB/Likenan/Ampisilin/Agar besi yerinde Likenaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi

LB/X-Gal/Ampisilin besi yerinde üreyen beyaz koloniler (*E.coli*/pMK3Lik) ve orijinal alıcı bakteri *E.coli* DH5 α suşu LB/Likenan/Agar besiyerine inoküle edilmiştir. Bu besi yerinde her iki bakteri üreme gösterirken aynı besi yerinin Kongo-Red boyaması sonucunda *E.coli* DH5 α suşu zon oluşturmazken likenaz aktivitesine sahip *E.coli*/pMK3Lik suşu etrafında sarı zon oluşturmuştur (Şekil 4.25-A ve B).

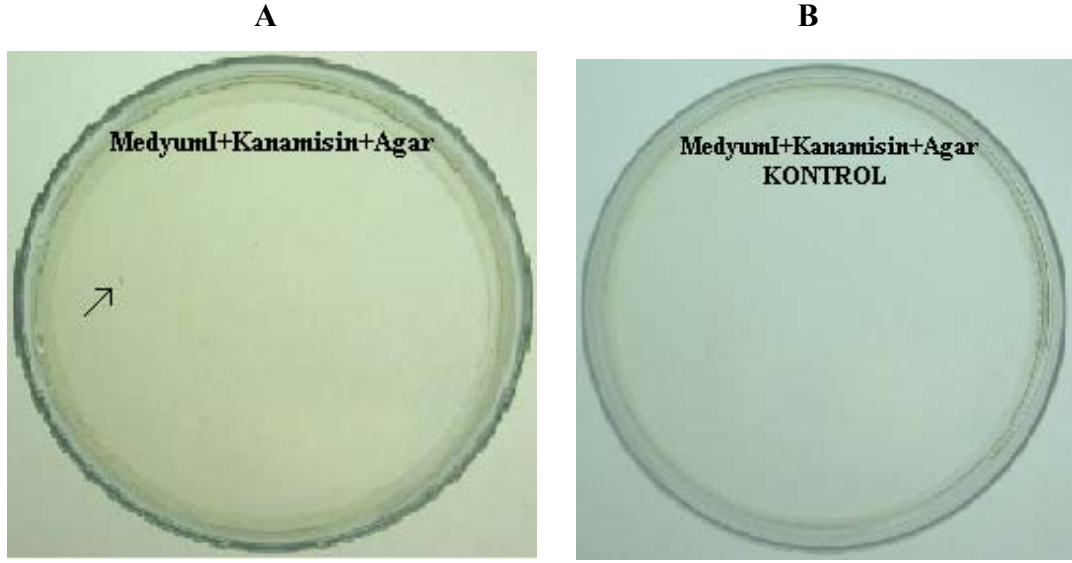


Şekil 4.25. A: *E.coli*/DH5 α ve *E.coli*/pMK3L bakterilerinin LB/Likenan/Agar besi yerinde üreme durumu, **B:** *E.coli*/DH5 α ve *E. coli*/pMK3L bakterilerinin LB/Likenan/Agar besi yerinde Likenaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Likenaz pozitif *E.coli*/pMK3L bakterisinden plazmid DNA izolasyonu yapılarak *B. coagulans*'a aktarılmıştır .

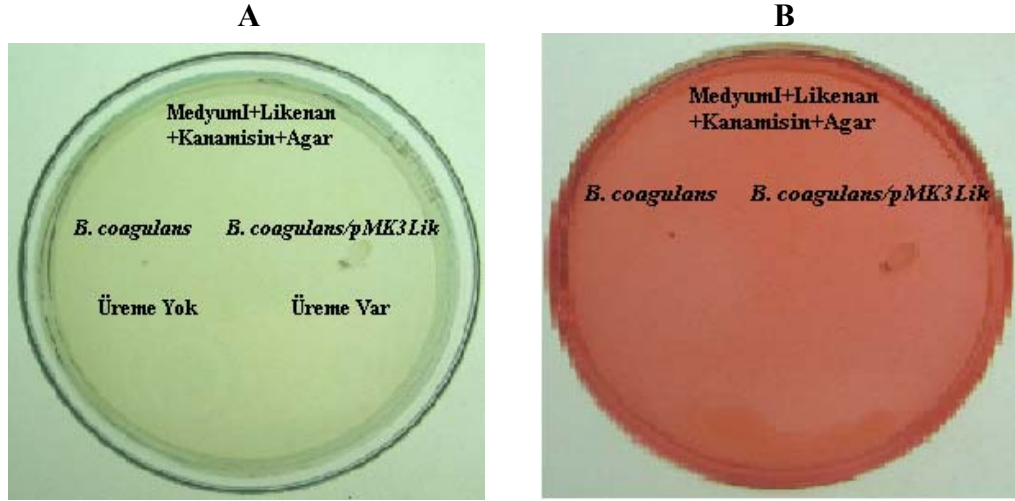
4.1.3.1(4). Rekombinant pMK3L Plazmidinin *Bacillus coagulans*'a Aktarılması

Rekombinant pMK3L (pMK3+Likenaz) plazmidinin *B. coagulans*'a aktarılmasında *B. subtilis*'e elektrotransformasyon yöntemi (Vehmaanperä, 1989) modifiye edilerek uygulanmıştır. Elektrotransformasyon sonrasında 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Kanamisin antibiyotiği içeren MedyumI/Agar besi yerinde rekombinat *B. coagulans* kolonilerin ürediği gözlenmiştir (Şekil 4.26-A). Kanamisin antibiyotiğine direnci olmayan ve plazmid aktarılmayan *B. coagulans* bakterisi ise Kontrol plağında üreme göstermemiştir (Şekil 4.26-B).



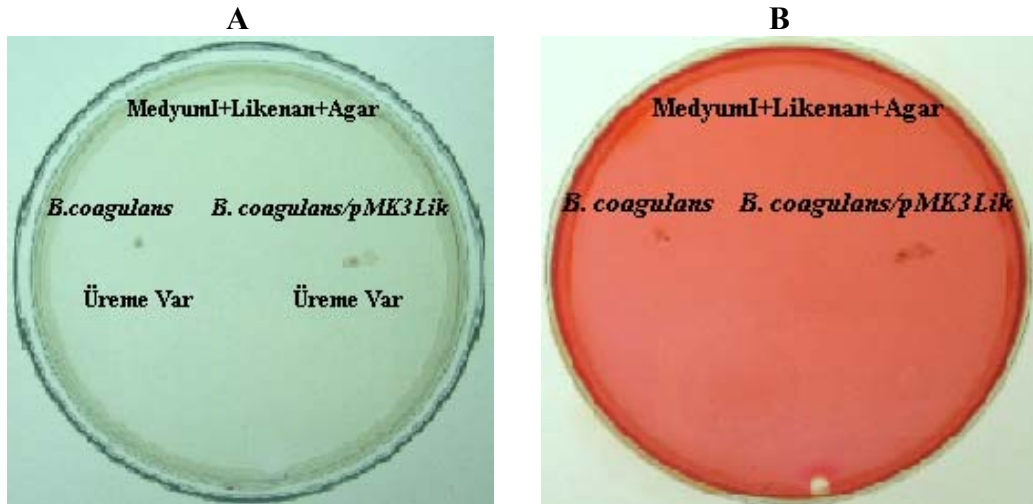
Şekil 4.26. A:MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde üreyen pMK3Lik plazmidini taşıyan rekombinant *B. coagulans* kolonileri, **B:** Kontrol plağı (MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde plazmid aktarılmayan *B. coagulans*)

MedyumI/Kanamisin/Agar besi yerinde üreyen pMK3Lik plazmidini taşıyan rekombinant *B. coagulans* kolonilerinin likenaz aktivitesini tespit etmek için orijinal *B. coagulans* ve *B. coagulans*/pMK3Lik bakterileri MedyumI / Likenan / Kanamisin / Agar besi yerine inoküle edilmiştir. Bu besi yerinde kanamisin antibiyotiğine direnci olmayan *B. coagulans* bakterisi üremezken rekombinant *B. coagulans*/pMK3Lik bakterisi üremiştir (Şekil 4.27-A). Likenaz aktivite testi için aynı besi yeri Kondo-Red ile boyanmış, ancak *B. coagulans*/pMK3Lik bakterisi herhangi bir zon oluşturmadığından Likenaz negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.27-B).



Şekil 4.27. A: *B. coagulans* ve *B. coagulans/pMK3Lik* bakterilerinin MedyumI/Likenan/Kanamisin/Agar besiyerinde üreme durumu, **B:** *B. coagulans/pMK3Lik* bakterisinin MedyumI/Likenan/Kanamisin/Agar besiyerinde Likenaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi

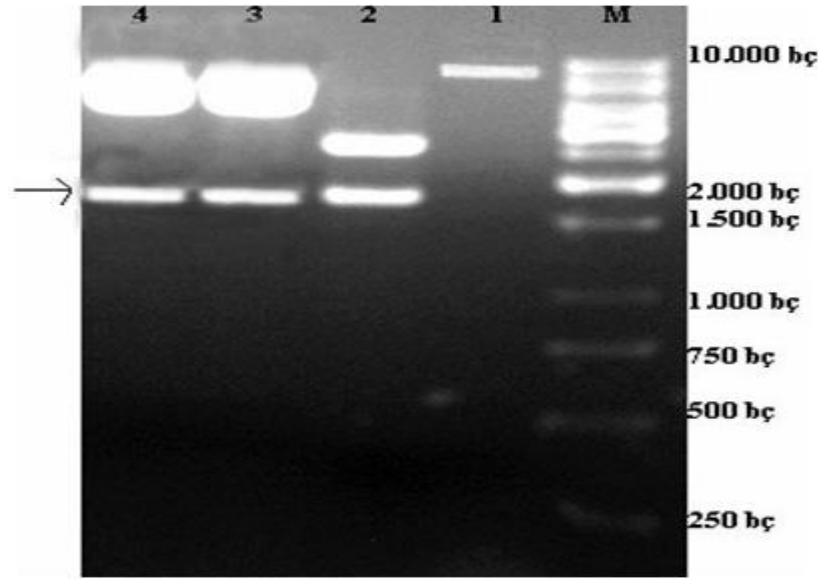
Antibiyotik içermeyen MedyumI/Likenan/Agar besiyerine orijinal *B. coagulans* ve *B. coagulans/pMK3Lik* bakterileri inoküle edilmiştir. Bu besiyerinde her iki bakteri de üreme gösterirken aynı besiyerinin Kongo-Red ile boyanması sonucunda *B. coagulans* ve *B. coagulans/pMK3Lik* bakterileri Likenaz aktivitesi göstermemiştir (Şekil 4.28-A ve B).



Şekil 4.28.A: *B. coagulans* ve *B. coagulans/pMK3Lik* bakterilerinin MedyumI/Likenan/Agar besiyerinde üreme durumu, **B:** *B. coagulans* ve *B. coagulans/pMK3Lik* bakterisinin MedyumI/Likenan/Agar besiyerinde Likenaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi

4.1.3.1(5). pMK3Lik Plazmidinin İzolasyonu ve İnsört Analizi

Rekombinant *E. coli* ve *B. coagulans* bakterilerinden pMK3Lik plazmidi izole edilmiştir. Rekombinant pMK3Lik plazmidinin insört analizinde; her iki bakteriden elde edilen pMK3Lik plazmidi *SmaI* enzimiyle kesilmiştir. Agaroz jelde; biri geride kalan bant olan vektör DNA (pMK3 (7200 bp) ve diğeri 1800 bp büyüklüğündeki likenaz genine ait DNA fragmenti (jel üzerinde okla işaretli) olmak üzere iki bant oluşmuştur (Şekil 4.29-Sütun 3 ve 4). Bu plazmidlerin Likenaz genine ait DNA fragmenti ile pL1Hc plazmidinin *HincII* enzimi kesimi sonucu oluşan Likenaz genine ait fragment agaroz jelde aynı moleküler büyüklükte bulunmuştur (Şekil 4.29-Sütun 2 ve 3-4).



Şekil 4.29. pMK3Lik plazmidinin agaroz jelde insört analizi

M: 1kb DNA Markır, 1: pMK3/*SmaI* kesimi, 2: *E. coli*/pL1Hc/*HincII* kesimi, 3: *E. coli*/pMK3Lik/*SmaI* kesimi, 4: *B. coagulans*/pMK3Lik/*SmaI* kesimi

4.1.3.1(6). Değişik pH'lardaki Besi Yerinde Rekombinant Bakterilerin Likenaz Aktivitesinin Tespiti

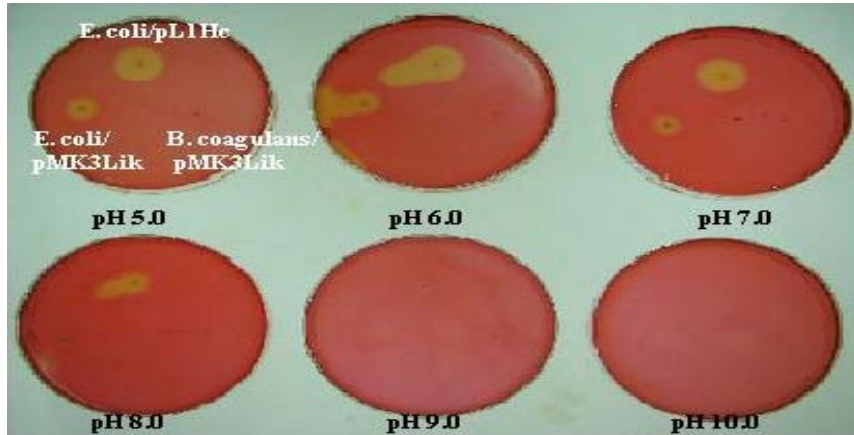
Rekombinant bakterilerin değişik pH'lardaki (5, 6, 7, 8, 9, 10) LB/Likenan/Agar besi yerinde likenaz enzim aktivitesi tespiti için bakteriler (*E.*

coli/pL1Hc, *E. coli/pMK3Lik*, *B. coagulans/pMK3Lik*) bu besi yerlerine inoküle edilmiştir. Bakterilerin bu besi yerinde üreme durumları Çizelge 4.5’de verilmiştir. *E. coli/pL1Hc* ve *E. coli/pMK3Lik* bakterileri sadece pH 10’da ve *B. coagulans/pMK3Lik* bakterisi pH 5 ve 10’da üremezken test edilen diğer pH’larda üremişlerdir.

Çizelge 4.5. Likenaz geni taşıyan rekombinant bakterilerin değişik pH’larda üreme durumları

pH	Bakteriler		
	<i>E. coli/pL1Hc</i>	<i>E. coli/pMK3Lik</i>	<i>B. coagulans/pMK3Lik</i>
5	+	+	-
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	-	-	-

Değişik pH’lardaki besi yerine inoküle edilen bakterilerin likenaz aktivitesinin tespiti amacıyla Kongo-Red boyaması yapılmış ve likenaz aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 4.30) (Çizelge 4.6). pH 5-8 arasında *B. coagulans/pMK3Lik* hariç diğer bakterilerin likenaz aktivitesi gösterdiği, pH 9 ve 10’da ise tüm bakterilerin aktivitesinin olmadığı gözlenmiştir. Zaten pH 10’da besi yerinde bakterilerin üremediği tespit edilmişti (Çizelge 4.5).



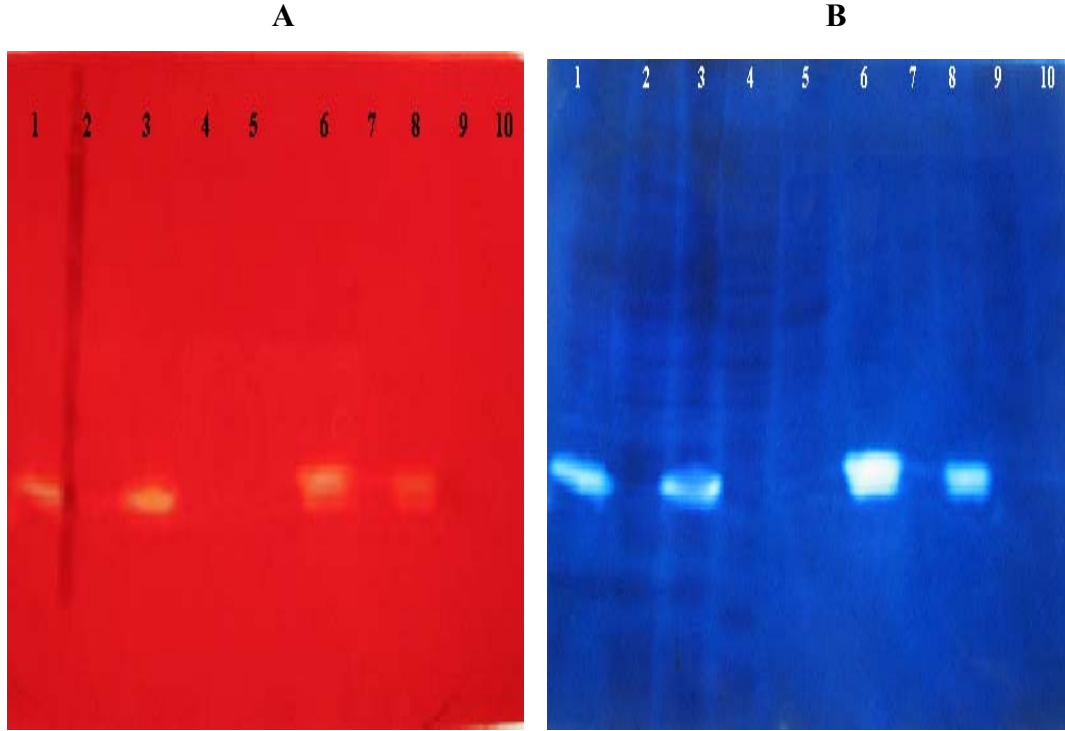
Şekil 4.30. Rekombinant bakterilerin (*E. coli/pL1Hc*, *E. coli/pMK3Lik*, *B. coagulans/pMK3Lik*) değişik pH’larda (5, 6, 7, 8, 9, 10) LB/Likenan/Agar besi yerinde likenaz aktivitesi

Çizelge 4.4. Likenaz geni taşıyan rekombinant bakterilerin değişik pH'larda likenaz aktivitesi

pH	Bakteriler		
	<i>E. coli</i> /pL1Hc	<i>E. coli</i> /pMK3Lik	<i>B. coagulans</i> /pMK3Lik
5	+	+	-
6	+	+	-
7	+	+	-
8	+	+	-
9	-	-	-
10	-	-	-

4.1.3.1.(7). Rekombinant Bakterilerin SDS-Likenan-PAGE'de Likenaz Aktivitesi Tayini ve SDS-PAGE'de Toplam Proteinleri Bakımından İncelenmesi

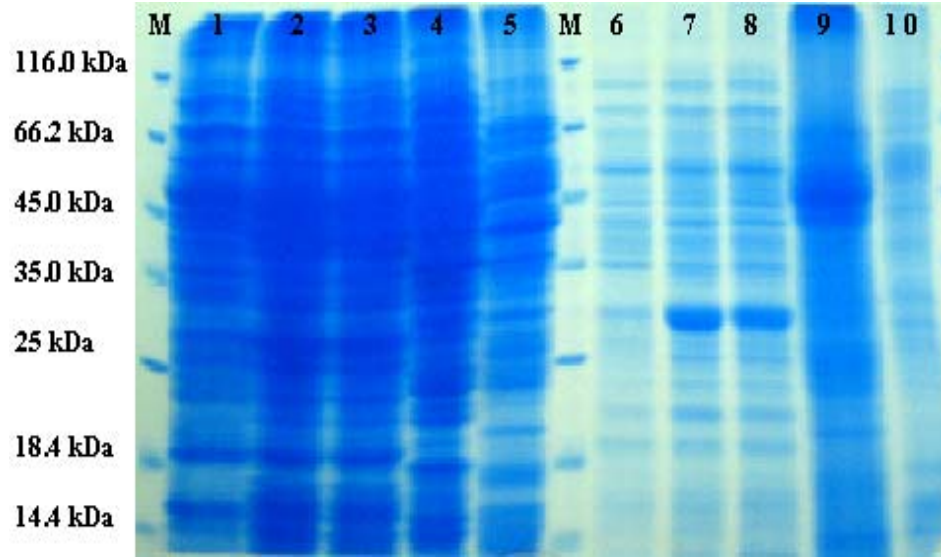
E. coli/pL1Hc, *E. coli* DH5 α , *E. coli*/pMK3Lik, *B. coagulans* ve *B. coagulans*/pMK3Lik bakterilerine ait hücre içi ve hücre dışı proteinleri likenaz enzim aktiviteleri için SDS-Likenan-PAGE'de ve toplam proteinleri bakımından da SDS-PAGE'de karşılaştırılmışlardır (Laemmli, 1970). SDS-Likenan-PAGE'de; *E. coli*/pL1Hc bakterisinin hücre içi ve hücre dışındaki likenaz enzimine ait bant (26 kDa) ile *E. coli*/pMK3Lik bakterisinin hücre içi ve hücre dışındaki likenaz enzimine ait aktivite bantı aynı moleküler büyüklükte bulunmuştur. Ancak *B. coagulans*/pMK3Lik bakterisinin hücre içi ve dışı proteinlerinde likenaz enzimine ait aktivite bantı gözlenmemiştir (Şekil 4.31-A). Aynı jel coomassie blue boyası ile boyandığında ise toplam proteinler arasındaki likenaz enzimine ait bandın yeri daha iyi tespit edilebilmiştir (Şekil 4.31-B).



Şekil 4.31. Değişik bakterilerin SDS-Likenan-PAGE’de renatürasyon sonrası likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması A: SDS-Likenan-PAGE’in Kongo-red ile boyanması, B: SDS-Likenan-PAGE’in Kongo-red ile boyanması sonrasında Coomassie Blue boyası ile boyanması

1: *E. coli*/pL1Hc bakterisine ait hücre içi proteinleri, **2:** *E. coli* DH5 α bakterisine ait hücre içi proteinleri, **3:** *E. coli*/pMK3Lik bakterisine ait hücre içi proteinleri, **4:** *B. coagulans* bakterisine ait hücre içi proteinleri, **5:** *B. coagulans*/pMK3Lik bakterisine ait hücre içi proteinleri, **6:** *E. coli*/pL1Hc bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **7:** *E. coli* DH5 α bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **8:** *E. coli*/pMK3Lik bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **9:** *B. coagulans* bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **10:** *B. coagulans*/pMK3Lik bakterisine ait hücre dışı proteinleri

Ayrıca aynı örnekler (*E. coli*/pL1Hc, *E. coli* DH5 α , *E. coli*/pMK3Lik, *B. coagulans* ve *B. coagulans*/pMK3Lik bakterilerine ait hücre içi ve hücre dışı proteinleri) SDS-PAGE’de toplam protein profilleri bakımından da incelenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Değişik bakterilere ait protein profillerinin SDS-PAGE’de karşılaştırılması

M: Markır, **1:** *E. coli*/pL1Hc bakterisine ait hücre içi proteinleri, **2:** *E. coli* DH5 α bakterisine ait hücre içi proteinleri, **3:** *E. coli*/pMK3Lik bakterisine ait hücre içi proteinleri, **4:** *B. coagulans* bakterisine ait hücre içi proteinleri, **5:** *B. coagulans*/pMK3Lik bakterisine ait hücre içi proteinleri, **M:** Markır, **6:** *E. coli*/pL1Hc bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **7:** *E. coli* DH5 α bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **8:** *E. coli*/pMK3Lik bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **9:** *B. coagulans* bakterisine ait hücre dışı proteinleri, **10:** *B. coagulans*/pMK3Lik bakterisine ait hücre dışı proteinleri

4.2. Tartışma

PhyC fitazı birçok özelliğinden dolayı yem katkıları olarak önemli bir yer tutmaktadır. Bu enzim GRAS olarak sınıflandırılan bir organizma (*B. subtilis*) kaynaklı olup bu özelliğinden dolayı yem katkıları olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Enzim nötral pH optimumuna sahip olduğundan dolayı fosfat absorpsiyonunun olduğu ince bağırsakta (pH nötral pH'ya yakın) aktivitesini sürdürebilmektedir. Ayrıca PhyC termostabil bir enzimdir. Yemlerin peletlenmesi sırasında yüksek sıcaklık uygulandığından dolayı bu özellik yem katkıları olarak kullanılan enzimler için aranan bir özelliktir. Enzimin, ince bağırsakta enzim aktivitesinin düşmesine neden olan inorganik fosfatın neden olduğu ürün inhibisyonuna eğilimi yoktur. Enzim proteazlara karşı hassas da değildir (Kerovuo, 2000).

Ancak PhyC'nin bazı özelliklerinden dolayı yem uygulamalarında bu enzim uygun olmayabilmektedir. İlk olarak enzimin spesifik aktivitesi düşüktür. Bu nedenle daha yüksek spesifik aktiviteye sahip fitazlar ile aynı etkiyi gösterebilmesi için daha yüksek miktarda PhyC fitazına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca enzim, fitik asitteki 6 fosfattan sadece 3'ünü hidrolize edebilmektedir. Bu nedenle fungal fitazlara nazaran fosfatların açığa çıkartılmasında daha az etkindir (Kerovuo, 2000).

B. subtilis VTT E-68013 suşuna ait bu fitaz geni (*phyC*) daha önce klonlanmış ve DNA baz dizileri belirlenmiştir (Kerovuo ve ark., 1998). Bu çalışmada, *phyC* fitaz geni uygun primerler hazırlanarak PCR ile çoğaltılmıştır. *B. coagulans* bakterisine gen aktarmada kullanmak üzere seçilen *E. coli-Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3 ile *phyC*'nin ligasyonu yapılarak ilk önce ara konakçı *E. coli*'ye daha sonra da hedef bakteri *B. coagulans*'a aktarılmıştır. Her iki rekombinant bakteride (*E. coli*/pMK3F ve *B. coagulans*/pMK3F) bu genin varlığı hem insört analizleriyle hem de PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Fitaz enziminin ekspresyonunu tespit etmek için bu rekombinant bakteriler ile orijinal bakteri, buğday kepeği ekstraktı ve Na-fitat içeren besi yerine (pH 7) inoküle edilmiş ancak bu besi yerinde sadece orijinal bakteri fitaz aktivitesi göstererek etrafında zon oluşturmuştur. *phyC* geninin aktarıldıktan sonra genin bu bakterilerde eksprese olması durumunda pH

optimumun değişebileceği ihtimaline karşın rekombinant ve orijinal bakteriler değişik pH'larda (pH 5-10) hazırlanan buğday kepeği ekstraktı ve sodyum-fıtat içeren besi yerine inoküle edilmiş ancak yine enzim aktivitesi tespit edilememiştir.

Fitaz geninin eksprese olmamasının nedeninin kullanılan genin orijininin kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek için başka bir bakteriyel kaynaklı fitaz olan *B. licheniformis* DSM 603 suşuna ait *phyL* geni PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Burada; biri genin başından diğeri de promotorların hemen önünden olmak üzere iki ayrı ileri (forward) primer kullanılarak elde edilen fitaz genini taşıyan iki fragmentin yine aynı mekik vektör olan pMK3'e ligasyonu yapılmıştır. Oluşturulan iki rekombinant vektör *E. coli*'ye aktarılmıştır. Rekombinant iki klonla (*E. coli*/pMK3FM1 ve *E. coli*/pMK3FM2) fitaz geninin varlığı yine aynı yöntemlerle tespit edilmiştir. Ancak bu klonlarda buğday kepeği ekstraktı ve sodyum-fıtat içeren besi yerinde fitaz aktivitesi tespit edilememiştir. Ekspresyonun tespit edilememesinden dolayı daha sonrasında *phyL* fitaz genini taşıyan rekombinant plazmidler *B. coagulans*'a aktarılmamıştır.

Hayvan besleme açısından diğer bir önemli enzim de $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz)'dır. Likenaz enzimi tahılların endosperm hücre duvarında bulunan β -glukanları hidrolize ederek sindirimi artırmaktadır. Böylece yem hammaddelerinin içinde bulunan β -glukanların fazlalığı nedeniyle oluşacak yapışkan dışkı fizyolojik rahatsızlığını önlemektedir. Bu nedenle hayvan beslemede likenaz enzimi yem katkısı olarak büyük öneme sahiptir.

Streptococcus bovis JB1'e ait $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni *E. coli*, *L. lactis* ve *E. faecalis*'de klonlanıp eksprese edilmiştir (Ekinci ve ark.,1997). Bu genin *B. coagulans* bakterisinde klonlanması düşünülmüştür. Likenaz geninin subklonlama ile *E. coli*-*Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3'e ligasyonu yapılmış ve geliştirilen rekombinant plazmid pMK3Lik, önce ara konakçı *E. coli*, daha sonra da *B. coagulans*'a aktarılmıştır. Her iki rekombinant bakteride bu genin varlığı insört analiziyle belirlenmiştir. Likenaz enziminin ekspresyonunu tespit etmek için bu rekombinant bakteriler likenan substratı içeren katı LB besi yerine (pH 7.5) inoküle edilmiş ve Kongo-Red boyaması sonucunda rekombinant *E. coli*/pMK3Lik bakterisi enzim aktivitesi gösterirken *B. coagulans*/pMK3Lik enzim aktivitesi göstermemiştir.

Rekombinant *B. coagulans* tarafından üretilebilecek Likenaz enziminin yine pH optimumunun değişebileceği ihtimaline karşın rekombinant ve orijinal bakteriler değişik pH'larda (pH 5-10) hazırlanan LB/Likenan/Agar besi yerine inoküle edilmiş ancak yine bu bakteride enzim aktivitesi tespit edilememiştir.

Bu durumda, rekombinant *B. coagulans*'da fitaz ve likenaz enzim aktivitelerinin tespit edilememe sebebinin, genin eksprese olarak enzim üretimini gerçekleştirdiği fakat bu bakterilerde bulunan proteolitik aktivite sonucu parçalanmış olabileceği ihtimali düşünülmüştür. Basillusların yüksek sentez kapasitelerinin olmasına rağmen, bu bakterilerde diğer organizmalara ait proteinlerin üretilmesinde genellikle düşük ekspresyon seviyesi gözlenmiştir (Bron ve ark., 1998). Zira bir bakteri içerisine giren yabancı genlerin ekspresyonu ile üretilen rekombinant enzimler, hücre içerisinde katlanmaları esnasında, konukçu bakteri tarafından üretilen proteaz enzimlerince proteolitik aktiviteye maruz kalarak parçalanmasının doğal bir sonuç olduğu daha önce bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Schallmey ve ark., 2004; Rozkov, 2001; Braun ve ark., 1999). Rekombinant bakterilerde enzim aktivitesine rastlanılamamasının bir diğer sebebi olarak, enzim aktivitesinde önemli bir rol oynayan uygun protein katlanmasının gerçekleşmemiş olabileceği de düşünülebilir. Çünkü enzimler sentezlendikten sonra uygun katlanmayı yaparak üç boyutlu yapısını kazanır ve fonksiyonel hale geçerler (Roder ve ark., 2003; Cooper, 1997).

Bu durumu ve rekombinant bakterilerce üretilen fitaz enziminin hücre içinde kalıp süpernatanta sentezlenmeme ihtimalini de araştırmak amacıyla; fitaz genini taşıyan *E. coli* ve *B. coagulans* bakterilerinin kontrolleri ile birlikte hücre içi ve hücre dışı proteinleri buğday kepeği ekstraktı ve sodyum-fitat içeren SDS-PAGE'de izlenmiş, jelin iyodin boyaması sonucunda oluşan zonlar ile aynı örnekleri kullanarak elde edilen SDS-Nişasta-PAGE'deki oluşan zonların aynı hizada olması ve bu oluşan zonların literatürde bildirilen fitaz enzime ait büyüklükten (43 kDa) daha fazla olması nedeniyle bunların fitaz enzime değil de α -amilaz enzime ait olabileceği veya ikincil (back-ground) bir aktivite olabileceğini düşündürmüştür.

B. coagulans bakterisinin laktik asit üretmesi nedeni ile yüksek asiditeden dolayı rekombinant *B. coagulans*'ın ürettiği likenaz enziminin denatüre olup aktivite

göstermemesi durumunu test etmek için SDS-PAGE’de zymogram analizi yapılmıştır. Likenaz enzim aktivitesi genellikle yüksek sıcaklık ve düşük pH yada diğer denatüre edici ajanlar ile baskı altına alınmakta fakat enzimin inhibisyonu genellikle geri dönüşümlü olmaktadır. *S. bovis*’e ait likenaz enzimi çeşitli nedenlerle renatüre olsa bile 37°C’de ve pH 6.5’de inkübe edildiğinde enzim aktivitesini yeniden kazanmaktadır. Böylece enzimin sıcaklık yada yüksek laktik asit ile inaktivasyonu olmamaktadır (Ekinci, 1997). Bu nedenle rekombinant *B. coagulans* bakterisinin ürettiği laktik asitten kaynaklanan bir denatürasyon olsa bile SDS-PAGE’de denatüre edici ajanlar uzaklaştırıldığında enzimin renatüre olması beklenirken yapılan zymogram analizleri sonucunda rekombinant *B. coagulans*’da likenaz enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Bunun sonucu olarak da, rekombinant *B. coagulans*’ın ürettiği likenaz enziminin laktik asit veya diğer denatüre edici ajanlar tarafından denatüre olmasıyla ilgili bir durumun olmadığı kanısına varılmıştır.

Aynı zamanda, rekombinant bakterilerin ürettikleri likenaz enziminin hücre içinde tutulup hücre dışına salınmama durumunu test etmek amacıyla da, *E. coli*/pMK3Lik ve *B. coagulans*/pMK3Lik bakterilerinin, kontrolleri ile birlikte, hücre içi ve hücre dışı proteinleri likenaz aktivitesini belirlemek için likenan substratları içeren SDS-PAGE’de izlenmiş ve yapılan zymogram analizleri sonucunda *E. coli*/pMK3Lik bakterisinde likenaz aktivitesi gözlenirken *B.coagulans*/pMK3Lik rekombinant bakterilerinde enzim aktivitesi gözlenmemiştir.

Ayrıca *B. coagulans*’da her iki genin de eksprese olmaması, gen aktarımında kullanılan pMK3 mekik vektörü üzerinde bulunan *lacZ* genine ait promotorun veya genin kendi promotorlarının bu genlerin yeterli düzeyde ekspresyonunu sağlayacak şekilde kuvvetli bir promotor olmamasından kaynaklanabilir. Zira modern biyoteknolojide ekspresyon sisteminin değeri promotorların kuvvetli olmasına da dayanmaktadır. Kerovuo ve ark. (2000), *phyC* fitaz geninin *B. subtilis*’de ekspresyonu için yeni bir ekspresyon sistemi (başka bir *B. subtilis* suşunun kromozomal DNA’sındaki *pst* promotorunu kullanarak) geliştirmişlerdir. Bu promotoru *phyC* geninin önüne yerleştirdiklerinde rekombinant *Bacillus* fitaz geninin aktivitesinin arttığını bildirmektedirler. Ayrıca Kerovuo ve Tynkkyen (2000), *B. subtilis* VTT E-68013 bakterisinden fitaz genini (*phyC*), *L. amylovorus* α -amilaz

sekresyon sinyalini kullanarak *L. plantarum* 755 suşunda eksprese etmişlerdir. Ancak araştırmacılar, *L. plantarum* 755 bakterisinin kendine ait proteinleriyle kıyaslandığında daha düşük oranda rekombinant fitazı ürettiğini bildirmişlerdir.

Genlerin ekspresyonunda RNA polimerazın bağlandığı promotorların baz sıralarının önemi büyüktür. Bağlanma bölgelerinin sırası genlerin promotor sıralarına ne kadar benzer ise RNA polimerazın promotora bağlanması o kadar sıkı olur. Çünkü kuvvetli promotorla çalışan genler zayıf bir promotorla çalışan genlerden daha sık transkripte olurlar (Topaktaş, 1991). *B. subtilis* fitaz geninin (*phyC*) promotor baz dizileri 5' TAACAC 3' (-10 bölgesi) ve 5' TTGACA 3' (-35 bölgesi)'dir. *B. licheniformis* fitaz geninin (*phyL*) promotor baz dizileri ise 5' GATGTT 3' (-10 bölgesi) ve 5' TTGAGA 3' (-35 bölgesi)'dir. Ancak bu promotor bölgelerinin baz sıraları ile *B. coagulans* bakterisinden klonlanan genlerin promotor baz sıraları karşılaştırıldığında örneğin *B. coagulans*'dan klonlanan termostabil kitozanaz *TCH-2* geninin (Yoon ve ark., 2002) promotor bölgelerinin baz sırası (5' TATATT 3' (-10 bölgesi) ve 5' TTGAAT 3' (-35 bölgesi)) ve *B. coagulans*'dan klonlanan diğer bir gen olan prolin immunopeptidaz'ın (Kitazono ve ark., 1992) promotor dizileri (5' TATTTT 3' (-10 bölgesi) ve 5' TTGCCA 3' (-35 bölgesi)) arasında yüksek oranda bir benzerlik bulunmamaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Yapılan bu çalışma ile *B. subtilis* VTT E-68013 suşuna ait fitaz geni (*phyC*) bu bakterinin kromozomal DNA'sından PCR ile sentezlenmiştir. Fitaz genini içeren 1300 bp uzunluğundaki DNA parçasının *E. coli-Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3'e ligasyonu ile pMK3F rekombinant vektörü oluşturulmuştur. Fitaz genini taşıyan bu vektör ilk önce ara konakçı olan *E. coli* DH5α suşuna transfer edilmiştir. Bu bakteriden izole edilen pMK3F plazmidinin PCR ve çeşitli kesme enzimleriyle kesilerek insört analizi yapılmış ve fitaz geninin (*phyC*) varlığı kanıtlanmıştır. Daha sonra *E. coli*'den izole edilen pMK3F plazmidi kanatlılarda probiyotik olarak kullanılan *B. coagulans* DSM1 suşuna kendi geliştirdiğimiz elektroporasyon protokolünü kullanarak aktarılmıştır. Rekombinant *B. coagulans*'dan pMK3F plazmidi izole edilmiş ve yine insört analizi yapılarak plazmidin doğruluğu belirlenmiştir. Fitaz geninin hem *E. coli* hem de *B. coagulans* bakterilerinde ekspresyonunu tespit etmek için Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar ve Buğday Kepeği Ekstraktı/MedyumI/Sodyum Fitat/Agar besi yerlerine inoküle edilmiş ancak bu besi yerinde fitaz genini taşıyan orijinal bakteri *B. subtilis* VTT E-68013 zon verirken rekombinant bakteriler herhangi bir zon oluşturmamıştır. Ayrıca fitaz genini taşıyan rekombinant bakterilerin hücre içi ve hücre dışı proteinleri kullanılarak buğday kepeği ekstraktı ve Na-fitat içeren SDS-PAGE'de zymogram analizi yapılmış ancak yine enzim aktivitesi gözlenmemiştir.

2. Diğer bir fitaz gen kaynağı olan *B. licheniformis* DSM 603'den fitaz geni (*phyL*) iki farklı ileri primer kullanılarak PCR ile sentezlenmiştir. Fitaz genini içeren 1470 ve 1335 bp büyüklüğündeki DNA fragmenti *E. coli-Bacillus* sp. mekik vektörü olan pMK3'e ligasyonu ile pMK3FM1 ve pMK3FM2 rekombinant vektörleri oluşturulmuştur. Bu rekombinant vektörler ilk önce ara konakçı olan *E. coli* DH5α suşuna transfer edilmiş ve bu bakterilerden izole edilen pMK3FM1 ve pMK3FM2 plazmidlerinin insört analizleri yapılarak fitaz (*phyL*) geninin varlığı kanıtlanmıştır. Daha sonra *E. coli*'den izole edilen bu rekombinant plazmidler *B. coagulans* DSM1 suşuna elektroporasyon tekniği ile aktarılmaya çalışılmış ancak transformasyon sağlanamamıştır. Fitaz geninin *E. coli*/pMK3FM1 ve *E. coli*/pMK3FM2

bakterilerinde ekspresyonunu tespit etmek için Buğday Kepeği Ekstraktı/LB/Sodyum Fitat/Agar besi yerine inoküle edilmiş ancak bu besi yerinde sadece *B. subtilis* VTT E-68013 zon verirken fitaz genini taşıyan orijinal bakteri *B. licheniformis* DSM 603, *E. coli*/pMK3FM1 ve *E. coli*/pMK3FM2 herhangi bir zon oluşturmamıştır.

3. *S. bovis*'e ait $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) geni pL1Hc plazmidinden *HincII* enzimiyle kesilerek yine *E. coli*-*Bacillus* sp. mekik vektörü olan pMK3'e ligasyonu yapılarak pMK3Lik rekombinant vektörü geliştirilmiştir. Likenaz genini taşıyan bu vektör kanatlılarda probiyotik olarak kullanılan *B. coagulans* bakterisine elektroporasyon tekniği ile aktarılmıştır. Bu rekombinant vektör ilk önce ara konakçı olan *E. coli* DH5 α suşuna transfer edilmiş ve bu bakterilerden izole edilen pMK3Lik plazmidinin insört analizi yapılarak likenaz geninin varlığı kanıtlanmıştır. Daha sonra *E. coli*'den izole edilen pMK3F plazmidi *B. coagulans* DSM1 suşuna yine aynı elektroporasyon protokolü kullanılarak aktarılmıştır. Rekombinant *B. coagulans*'dan pMK3Lik plazmidi izole edilmiş ve yine insört analizi yapılarak plazmidin doğruluğu belirlenmiştir. Likenaz geninin hem *E. coli* hem de *B. coagulans* bakterilerinde ekspresyonunu tespit etmek için LB/Likenan/Agar besi yerine inoküle edilmiş ve Kongo-Red boyaması yapılmıştır. Boyama sonrasında *E. coli*/pMK3Lik bakterisi enzim aktivitesi gösterirken *B. coagulans*/pMK3Lik aktivite göstermemiştir. Likenaz genini taşıyan rekombinant bakterilerin hücre içi ve hücre dışı proteinleri kullanılarak SDS-Likenan-PAGE'de zymogram analizi yapılmış ancak yine aktivite gözlenmemiştir.

4. Bir *E. coli*-*Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3 aracılığı ile *B. coagulans* bakterisine gen transferi ilk olarak bizim geliştirdiğimiz elektrotransformasyon protokolü ile yapılmıştır.

Gram-pozitif bakterilerin bir kısmının hücre içine DNA alımı için doğal bir kompetenslik geliştirmeleri ve bu bakterilere hem plazmid hem de lineer DNA'nın kolaylıkla aktarılabilmesinin yanı sıra *B. coagulans* bakterisinin genetik manüplasyonu oldukça zorlu olmaktadır (De Rossi ve ark., 1991; Dubnau, 1991). *B. coagulans* bakterisine plazmid veya gen aktarımı çalışmaları içerisinde sadece Rhee ve ark. (2007) *B. coagulans* için bir elektroporasyon protokolü geliştirmiştir. *B. coagulans* plazmidine ait replikasyon sistemini taşıyan *Bacillus*/*E. coli* mekik

vektörü pMSR10'u ve *Geobacillus stearothermophilus*/*E. coli* mekik vektörü pNW33N'i bu bakteriye aktarmışlardır.

Sonuç olarak;

- *E. coli*-*Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3, *B. coagulans* bakterisine aktarılmış ve kanamisin direnç geninin bu bakteride eksprese olduğu tespit edilmiştir. Bundan sonra yapılacak olan *B. coagulans*'ın genetik modifikasyonu çalışmalarında bu vektör (pMK3) kullanılabilecektir.
- *B. coagulans*'a gen aktarımında Vehmaanpera (1989)'nın *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisi için geliştirdiği elektroporasyon protokolü modifiye edilerek yeni bir protokol kullanılmıştır.
- İlk defa *B. subtilis* VTT E-68013 suşuna ait fitaz (*phyC*) ve *S. bovis*'e ait $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) genleri *E. coli*-*Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3'e takılarak *B. coagulans* bakterisine elektroporasyon tekniği ile başarılı bir şekilde aktarılmış ancak bu bakteride her iki genin de ekspresyonu gözlenmemiştir.

Bu veriler sonucunda aşağıdaki çalışmaların yapılması önerilebilir:

1. Fitaz ve likenaz genlerinin ekspresyonunu sağlamak için daha güçlü promotorlar ile bu genlerin promotorlarının değiştirilmesi sonrasında hedef organizmaya aktararak bunun sonucunda ekspresyonun olup olmadığı araştırılabilir.
2. *B. coagulans* bakterisinde eksprese olmasından dolayı *E. coli*/*Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3 üzerinde bulunan kanamisin direnç geninin veya *B. coagulans*'a ait bir genin promotor dizileri klonlanarak aktarılmak istenen genlerin ön kısmına yerleştirildikten sonra *B. coagulans*'a aktarılabilir ve ekspresyonun olup olmadığı araştırılabilir.
3. Fitaz geninin (*phyC*) ekspresyonunun genin orijininin kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmak için seçilen diğer fitaz kaynağına ait (*B. licheniformis*) fitaz geninin (*phyL*) *B. coagulans*'a aktararak bu bakteride ekspresyonu araştırılabilir.

4. Ayrıca likenaz geninin hedef bakteride eksprese olmamasının nedeninin bu genin orijinininden kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek için başka bir mikroorganizma (bakteriyel) kaynaklı likenaz genini *B. coagulans*'a aktararak bu bakteride ekspresyonu araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- ADAMI, A., and CAVAZZONI, V., 1993. Biomass Production, Preservation and Characteristics of a Strain of *Bacillus coagulans* as Probiotic. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 11:93-100.
- ADAMI, A., and CAVAZZONI, V., 1998. Occurrence of Selected Bacterial Groups in the Faeces of Piglets Fed with *Bacillus coagulans* as Probiotic. *J. Basic Microbiol.*, 39(1): 3-9.
- AKITA, M., KAYATAMA, K., HATADA, Y., ITO, S., and HORIKOSHI, K., 2005. A Novel β -glucanase Gene from *Bacillus halodurans* C-125. *FEMS Microbiol. Lett.*, 248: 9-15.
- ALP, M. ve KAHRAMAN, R., 1996. Probiyotiklerin Hayvan Beslemede Kullanılması. *İstanbul Üni. Vet. Fak. Dergisi*, 22(1): 1-8.
- ANDERSON, R.E., 1984. Growth and Corresponding Elevation of Tomato Juice pH by *Bacillus coagulans*. *J. Food Sci.*, 49: 647-649.
- ANONYMOUS, 1997. Yea-Sacc¹⁰²⁶, Technical Dossier. Alltech, Kentucky, USA. <http://www.yea-sacc1026.com> (13.09.1997).
- ANONYMOUS, 2003a. *Bacillus coagulans* (*Lactobacillus sporogenes*)—A New Generation Probiotics <http://lactospore.com/lsporo.htm> (25.12.2003).
- ANONYMOUS, 2003b. Lactospore <http://www.vetcareindia.com/Ptobiotic> (22.12.2003).
- ANONYMOUS, 2006a. <http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html> (20.07.2006).
- ANONYMOUS, 2006b. http://www.ansc.purdue.edu/courses/ansc443/Class_notes/Nutrition.html (02.08.2006).
- ANONYMOUS, 2006c. www.forschungsfeld.ch/proj/13a0101a.html (02.08.2006)
- AŞAN, M., 2002. Genetik Mühendisliği Teknikleri ile Yem Katkısı Kanatlı Probiyotiklerinin Oluşturulması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 77s.
- AYTUĞ, C.N., 1989. Probiyotikler ve Yoğurt. *Animalia*, 22: 13-15.

- BATRA, N., SINGH, J., BANERJEE, U.C., PATNAIK, P.R., and SOBTI, R.C., 2002. Production and Characterization of a Thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Bitechnol. Appl. Biochem.*, 36: 1-6.
- BEDFORD, M., 1991. Digestive Constraints in Feed Ingredients and Theoretical Opportunities for Supplementary Enzymes European Feed Enzyme Seminar, Finnfeeds International Ltd.Redhill, U.K..
- BIRNBOIM, and H.C., DOLY, J., 1979. A rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- BORRISS, R., and ZEMEK, J., 1981. Beta-1,3-1,4-glucanase in Spore-forming Microorganisms. IV. Properties of some *Bacillus*-beta-glucan-hydrolases *Zentralbl. Bacteriol. Naturwiss.*, 136(1): 63-69.
- BORRISS, R., MANTEUFFEL, R., and HOFEMEISTER, J., 1988. Molecular Cloning of a Gene for Thermostable Beta-Glucanase from *Bacillus macerans*. *J. Basic Microbiol.*, 28: 3-10.
- BORRISS, R., BUETTNER, K., and MAENTSACLAC, P., 1990. Structure of the Beta-1,3-1,4-Glucanase Gene of *Bacillus macerans*: Homologies to other Beta-glucanases. *Mol. Gen. Genet.*, 222: 178-283.
- BRAUN, P., GERRISTE, G., VAN DIJL, J.K., and QUAX, W.J., 1999. Improving Protein Secretion by Engineering Components of the Bacterial Translocation Machinery. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(4): 376-381.
- BRON, S., BOLHUIS, A., TJALSMA, H., HOLSAPPLE, S., VENEMA, G., and VAN DIJL, J.M., 1998. Protein Secretion and Possible Roles of Multiple Signal Peptidases for Precursor Processing in *Bacilli*. *J. Biotechnol.*, 64: 3-13.
- BUENO, A., VAZQUEZ DE ALDANA, C.R., CORREA, J., and Del REY, F., 1990a. Nucleotide Sequence of a 1,3-1,4- β -glucanase-Encoding Gene in *Bacillus circulans* WL-12. *Nucl. Acids Res.*, 18: 4248.
- BUENO, A., VAZQUEZ DE ALDANA, C.R., CORREA, J., VILLA, T.G., and DEL REY, F., 1990b. Synthesis and Secretion of a *Bacillus circulans* WL-12 1, 3-1,4- β -D-Glucanase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 172: 2160-2167.

- CANTWELL, B.A., and MCCONNELL, D.J., 1983. Molecular Cloning and Expression of a *Bacillus subtilis* β -glucanase Gene in *Escherichia coli*. *Gene*, 23: 211-219.
- CAVAZZONI, V., ADAMI, A., and CASTROVILLI, C., 1998. Performance of Broiler Chickens Supplemented with *Bacillus coagulans* as Probiotic. *British Poultry Sci.*, 39: 526-529.
- CHEN, H., LI, X.L., and LJUNGDAHL, L.G., 1997. Sequencing of a 1,3-1,4-Beta-D-glucanase (Lichenase) from the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* Strain PC-2 Properties of the Enzyme Expressed in *Escherichia coli* and Evidence that the Gene has a Bacterial Origin. *J. Bacteriol.*, 179(19): 6028-6034.
- CHEN, Y., HUANG, X., SONG, D., YANG, F., and ZHENG, W., 2005. Molecular Cloning and Expression of *Bacillus subtilis* *bglS* Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.*, 25(5): 279-282.
- CHO, J., LEE, C., KANG, S., LEE, J., LEE, H., BOK, J., WOO, J., MOON, Y., and CHOI, Y., 2005. Molecular Cloning of a Phytase Gene (*phy M*) from *Pseudomonas syringae* MOK1. *Curr. Microbiol.*, 51(1):11-15.
- CHOI, Y.M., SUH, H.J., and KIM, J.M., 2001. Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J. Prot. Chem.*, 20: 287-292.
- CLASSEN, H.L., and BEDFORD, M.R., 1991. The Use of Enzymes to Improve the Nutritive Value of Poultry Feeds. In *Recent Advances in Animal Nutrition*, Haresign, D.J.A., Cole, Butterworth-Heinemann.
- COOPER, G.M., 1997. *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press, Washington, D.C., U.S.A., 676s.
- CORNELIS, P., DIGNEFFE, C., and WILLEMOT, K., 1982. Cloning and Expression of a *Bacillus coagulans* Amylase Gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 186(4): 507-511.
- COSENTINO, S., MULARGIA, A.E., PISANO, B., TUVERI, P., and PALMAS, E., 1997. Incidence and Biochemical Characteristics of *Bacillus* Flora in Sardinian Dairy Products. *Int. J. Food Microbiol.*, 97: 147-156.

- CUTTING, S.M., and VAN DER HORN, P.B., 1990. Genetic analysis (C.R. HARWOOD and S.M. CUTTING Eds.). Molecular Biology Methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons Ltd., UK, s.27-74.
- DAWSON, K.A., NEWMAN, K.E., and BOILING, J.A., 1990. Effects of Microbial Supplemets Containing Yeast and *Lactobacilli* on Rough-fed Microbial Activities. J. Anim. Sci., 68: 3392.
- DE CLERK, E., RODRIQUEZ-DIAZ, M., FORSTH, G., LEBBE, L., LOGAN, N.A., and DE VOS, P., 2004. Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity Within This Species, and Emended Description of the Species. Syst. Appl. Microbiol., 27: 50-60.
- DE ROSSI, E., BRIGIDI, P., ROSSI, M., MATTEUZZI, D., and RICCARDI, G., 1991. Characterization of Gram-positive Broad Host-range Plasmids Carrying a Thermophilic Replicon. Res. Microbiol., 142: 389-396.
- DONSKEY, C.J., HOYEN, C.K., DAS, S.M., FARMER, S., DERY, M., and BONOMO, R.A., 2001. Effect of Oral *Bacillus coagulans* Administration on the Density of Vancomycin-Resistant Enetrococci in the Stool of Colonized Mice. Lett. Appl. Microbiol., 33: 84-88.
- DUBNAU, D., 1991. Genetic Competence in *Bacillus subtilis*. Microbiol. Rev., 55: 395-424.
- EKİNCİ, M.S., MCCRAE, S.I., and FLINT, H.J., 1997. Isolation and Overexpression of a Gene Encoding an Extracellular β -(1,3-1,4)-Glucanase from *Streptococcus bovis* JB1. Appl. Environ. Microbiol., 63: 3752-3756.
- EKİNCİ, M.S., 1997. Heterologous Expression of Genes in the Anaerobic Bacterium *S. bovis*. Doktora Tezi, Aberdeen, 228s.
- ERFLE, J.D., TEATHER, R.M., WOOD, P.J., and IRVIN, J.E., 1988. Purification and Properties of a 1,3-1,4-beta-D-Glucanase (Lichanase, 1,3-1,4-beta-D-Glucan 4-Glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.73) from *Bacteroides succinogenes* cloned in *Escherichia coli*. Biochem. J., 255(3): 833-841.
- FLINT, H.J., McPHERSON, C.A., and BISSET, J., 1989. Molecular Cloning of Genes from *Ruminococcus flavefaciens* Encoding Xylanase and β (1-3,1-4) glucanase Activities. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1230-1233.

- FLINT, H.J., MARTIN, J., McPHERSON, C.A., DANIEL, A.S., and ZHANG, J.-X., 1993. A Bifunctional Enzyme, with Seperate Xylanase and $\beta(1,3-1,4)$ -Glucanase Domains, Encoded by the xynD Gene of *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol., 175: 2943-2951.
- FULLER, R., 1989. Probiotics in Man and Animals. J. Appl. Bact., 66:365-378.
- _____, 1990. Probiotics For Far Animals. Probiotics in The Nutrition of Animals. Probiotics in The Nutrition of Animals, 19-21 November 1990, Brno, s.17-25.
- GODFREY, T., 1983. Industrial Enzymology (T. GODFREY and J. REINCHELT eds.), McMillian, London, s.466.
- GOLOVAN, S.P., WANG, G., ZHANG, J., and FORSBERG, C.W., 2000. Characterization and Overproduction of the *Escherichia coli appA* Encoded Bifunctional Enzyme that Inhibits Both Phytase and Acid Phosphatase Activities. Can. J. Microbiol., 46: 59-71.
- GORDON, R.W., and ROLAND, D.A., 1997. Performance of Commercial Laying Hens Fed Various Phosphorus Levels with or without Supplemental Phytase. Poult. Sci., 76: 1172-1177.
- GORLACH, J.M., VEN DER KNAAP, E., and WALTON, J.D., 1998. Cloning and Targeted Disruption of MLG1, a Gene Encoding Two of Three Extracellular Mixed-linked Glucanases of *Cochliobolus carbonum*. Appl. Environ. Microbiol., 64: 385-391.
- GOSALBES, M.J., PEREZ GONZALEZ J.A., GONZALES, R., and NAVARRO, A., 1991. Two Beta-Glycanase Genes are Clustered in *Bacillus polymyxa*: Molecular Cloning, Expression, and Sequence Analysis of Genes Encoding a Xylanase and an Endo-Beta-(1,3)-(1,4)-Glucanase. J. Bacteriol, 173(23): 7705-7710.
- GREAVES, M.P., ANDERSON, G., and WEBLEY, D.M., 1967. The Hydrolysis of Inositolphosphates by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta, 132: 412-418.

- GREINER, R., KONIETZYN, U., and JANY, K.D., 1993. Purification and Characterization of Two Phytases from *E. coli*. Arch. Biochem. Biophys., 341: 201-206.
- GREINER, R., and KONIETZYN, U., 2006. Phytase for Food Application. Food Technol. Biotechnol., 44(2): 125-140.
- HAN, Y.M., and LEI, X.G., 1999. Role of Glycosylation in the Functional Expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*. Arch. Biochem. Biophys., 364 (1), 83-90.
- HAN, Y., WILSON, D.B., and LEI, X.G., 1999. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol., 65(5): 1915-1918.
- HANAHAN, D., 1983. Studies on Transformation of *E. coli* with Plasmids. J. Mol. Biol., 166:557-580.
- HARDY, K.G., 1985. *Bacillus* Cloning Methods (D.M. GLOVER Ed.). DNA Cloning Vol: II, A Practical Approach.. IRL Press, Oxford, s.1-17.
- HARLAND, B.F., and MORRIS, E.R., 1995. Phytate: A Good or Bad Food Component? Nutr. Res., 15: 733-754.
- HARTER-DENIS, J., 1999. Phytase Application in Commercial Broiler Diets in Maryland. Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech 15th Annual Symposium, 511-519.
- HAVENSTEIN, G.B., CRITTENDEN, L.B., PETITTE, J.N., QURESHI, M.A., and FOSTER, D.N., 1992. Application of Biotechnology in the Poultry Industry. Animal Biotech. 3(1):15-36.
- HENG, N.C.K., JENKINSON, H.F., and TANNOCK, G.W., 1997. Cloning and Expression of an Endo-1,3-1,4- β -Glucanase Gene from *Bacillus macerans* in *Lactobacillus reuteri*. Appl. Environ. Microbiol., 63(8): 3336-3340.
- HENRISSAT, B., 1991. A Classification of Glycoside Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities. Biochem. J., 280: 309-316.
- HENRISSAT, B., and BAIROCH, A., 1993. New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Similarities. Biochem. J. 293: 781-788.

- HENRISSAT, B., and BAIROCH, A., 1996. Updating the Sequence-based Classification of Glycosyl Hydrolases. *Biochem. J.*, 316: 695-696.
- HESSELMAN, K., and THOMKE, S., 1982. Influence of Some Factors on Development of Viscosity in the Water Extract of Barley. *Swed. J. Agric. Res.*, 12: 17-22.
- HESSELMAN, K., and AMAN, P., 1986. The Effect of β -glucanase on the Utilization of Starch and Nitrogen by Broiler Chickens Fed Low-and High-Viscosity Barley. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 147: 83-89.
- HINCLIFFE, E., 1984. Cloning and expression of a *Bacillus subtilis* endo-1,3-1,4-beta-D-glucanase gene in *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 1285-1291.
- HOFEMEISTER, J., KURTZ, A., BORRIS, R., and KNOWLES, J., 1986. The Beta-Glucanase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* Shows Extensive Homology with that of *Bacillus subtilis*. *Gene*, 49(2): 177-187.
- HOOOPER, P., 1989. The Role of Probiotics (Intestinal Inoculants) in Production Animals. World Association of Veterinary Food Hygienists Xth (Jubilee) International Symposium in Stockholm, 2-7 July, s.27-30.
- HOROWITZ-WLASSOWA, L.M., and NOWETELNOW, N.H., 1933. Über eine sporogene Milchsäurebakterienart, *Lactobacillus sporogenes* n. sp. *Cent F. Bak. II Abt.*, 87: 331.
- HOVARTH, H., HUANG, J., WONG, O., KOHL, E., OKITA, T., KANNANGARA, C.G., and Von WETTSETIN, D., 2000. The Production of Recombinant Proteins in Transgenic Barley Grains Wettstein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 1914-1919.
- HYRONIMUS, B., LE MARREC, C., and URDACI, M.C., 1998. Coagulin, a Bacteriosin-Like Inhibitory Substance Produced by *Bacillus coagulans*. *J. Appl. Microbiol.*, 85:42-50.
- HYRONIMUS, B., LE MARREC, C., HADJ SASSI, A., and DESCHAMPS, A., 2000. Acid and Bile Tolerance of Spore-Forming Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 61:193-197.

- HUANG, H., LUO, H., YANG, P., MENG, K., WANG, Y., YUAN, T., BAI, Y., and YAO, B., 2006. A Novel Phytase with Preferable Characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350: 884-889.
- IQBAL, T.H., LEWIS, K.O., and COOPER, B.T., 1994. Phytase Activity in the Human and Rat Small Intestine. *Gut*, 35: 1233-1236.
- IRVING, G.C.J., and COSGROVE, J., 1971. Inositolphosphate Phosphatase of Microbial Origin. Observation on the Nature of the Active Center of Bacterial (*Pseudomonas* sp.) Phytase. *Austral. J. Biol.*, 24: 1559-1564.
- IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature), 1977. Nomenclature of Phosphorus Containing Compounds of Biochemical Importance. *Eur. J. Biochem.*, 79:1-9.
- JENSEN, L.G., OLSEN, O., KOPS, O., WOLF, N., THOMSEN, K.K., and Von WETTSTEIN, D., 1996. Transgenic Barley Expressing a Protein-engineered, Thermostable (1,3-1,4)- β -glucanase During Germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3487-3491.
- JONGBLOED, A.W., MROZ, Z., and KEMME, P.A., 1992. The Effect of Supplementary *Aspergillus niger* Phytase in Diets for Pigs on Concentration and Apparent Digestibility of Dry Matter, Total Phosphorus and Phytic Acid in Different Sections of the Alimentary Tract. *J. Anim. Sci.*, 70: 1159-1168.
- JONGBLOED, A.W., LEWIS, N.P., and MROZ, Z., 1997. Impact of Nutrition on Reduction of Environmental Pollution by Pigs: An Overview of Recent Research. *Vet.*, 19(3): 130-134.
- JONNISON, E., 1985. *Lactobacilli* as Probiotics to Pigs and Calves. A Microbiological Approach, Pappot 148, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, s.1-65.
- KEATING, L., KELLY, C., and FOGARTY, W., 1998. Mechanism of Action and the Substrate-Dependent pH Maximum Shift of the α -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Res.*, 309:311-318.
- KEROVUO, J., LAURAEUS, M., NURMINEN, P., KALKKINEN, N., and APAJALAHTI, J., 1998. Isolation, Characterization, Molecular Gene

- Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6):2079-2085.
- KEROVUO, J., 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Academic Dissertation, Helsinki, 68 s.
- KEROVUO, J., and TYNKKYEN, S., 2000. Expression of *Bacillus subtilis* Phytase in *Lactobacillus plantarum* 755. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30:325-329.
- KEROVUO, J., Von WEYMARN, N., POVELAINEN, M., AUER, S., and MIASNIKOV, A., 2000. A New Efficient Expression System for *Bacillus* and its Application to Production of Recombinant Phytase. *Biotechnol. Lett.*, 22: 1311-1317.
- KIM, Y.O, KIM, H.K., BAE, K.S., YU, J.H., and OH, T.K., 1998a. Purification and Properties of a Thermostable Phytase From *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.*, 22: 2-7.
- KIM, Y.O, LEE, J.K., KIM, H.K., YU, J.H., and OH, T.K., 1998b. Cloning of the Thermostable Phytase Gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its Overexpression in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Letters*, 162: 185-191.
- KIM, Y.O, LEE, J.K., OH, B.C., and OH, T.K., 1999. High Level Expression of a Recombinant Thermostable Phytase in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(12): 2205-2207.
- KIM, J.Y., KIM, H.B., and LEE, D.S., 2002. Cloning and Expression of the *Bacillus circulans* Endo- β -1,3-1,4-glucanase Gene (*bglBC1*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 24: 53-57.
- KIM, J.Y., 2003. Overproduction and Secretion of *Bacillus circulans* Endo- β -1,3-1,4-glucanase Gene (*bglBC1*) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Biotechnol. Lett.*, 25: 1445-1449.
- KITAMURA, E., and KAMEI, Y., 2006. Molecular Cloning of the Gene Encoding β -1,3-(4)-glucanase A from a Marine Bacterium, *Pseudomonas* sp. PE2, an Essential Enzyme for the Degradation of *Phytium porphyrae* Cell Walls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 630-637.

- KITAZONO, A., YOSHIMOTO, T., and TSURU, D., 1992. Cloning, Sequencing, and High Expression of the Proline Immunopeptidase Gene from *Bacillus coagulans*. J. Bacteriol., 174: 7919-7925.
- KONCA, Y. ve BAHTİYARCA, Y., 1996. Farklı Seviyelerde Fosfor İçeren Rasyonlara Maya Kültürleri ve Fitaz İlavesinin Genç Japon Bildircinlarında Performans ve Fosforun Kullanımı Üzerine Etkisi. Ulusal Kumes Hayvanları Sempozyumu'96, 27-29 Kasım 1996, Adana, Sempozyum Kitabı, 190-201.
- KONIETZNY, U., and GREINER, R., 2002. Molecular and Catalytic Properties of Phytase-Degrading Enzymes (Phytases). Int. J. Food Sci. Technol., 37: 791-812.
- KONIETZNY, U., and GREINER, R., 2004. Bacterial phytase: Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. Braz. J. Microbiol., 35: 11-18.
- KUTLU, H.R., 2000. Kanatlı Rasyonlarında Enzim Kullanımı, Çiftlik Dergisi, Nisan 2000, 194: 84-88.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- LAMBRECHTS, C., BOZE, H., MOULIN, G., and GALZY, P., 1992. Utilization of phytate by some yeast. Biotechnol. Lett., 14: 61-66.
- LLOBERAS, J., QUEROL, E., and BERNUES, J., 1988. Purification and Characterization of an Endo- β -1,3-1,4-D-glucanase Activity from *Bacillus licheniformis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 29: 32-38.
- LLOBERAS, J., PEREZ-PONS, J.A., and QUEROL, E., 1991. Molecular Cloning, Expression and Nucleotide Sequence of the Endo- β -1,3-1,4-D-Glucanase Gene From *Bacillus licheniformis*. Eur. J. Biochem., 197: 337-343.
- LOUW, M.E., and WATSON, S.J.R., 1993. Characterization, Cloning and Sequencing of a Thermostable endo-(1,3-1,4) Beta-glucanase Encoding Gene From Alkalophilic *Bacillus brevis*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 38, 507-513.
- MAENZ, D.D., and CLASSEN, H.L., 1998. Phytase Activity in the Small Intestinal Brush Border Membrane of the Chicken. Poult. Sci., 77: 557-563.

- McCORMICK, M.E., 1984. Probiotics in Ruminant Nutrition and Health. Proceedings 1984 Georgia Nutrition Conference For The Feed Industry, Atlanta, s.62-69.
- MİDİLLİ, M., MUĞLALI, Ö.H., ALP, M., KOCABAĞLI, N., TANÖR, M.A. ve TOKLU, G.S., 2003. Yeme Katılan Fitaz Enziminin Broylerlerde Besi Performansı ve Mineral Dengesi Üzerine Etkisi. II. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi, 18-20 Eylül 2003, Konya.
- MIKSCH, G., KLEIST, S., FRIESH, K., and FLASCHEL, E., 2002. Overexpression of the Phytase from *E. coli* and its Extracellular Production in Bioreactors. Appl. Microbiol. and Biotech., s.253.
- MNISI, S.M., LOUW, M.E., and THERON, J., 2005. Cloning and Characterization of a Carboxylesterase from *Bacillus coagulans* 81-11. Curr. Microbiol., 50:196-201.
- MOCHIZUKI, D., and TAKAHASHI, H., 1999. Method for producing phytase. Patent Application EP 0931837-A.
- MROZ, Z, JONGBLOED, A.W., and KEMME, P.A., 1994. Apparent Digestibility and Retention of Nutrients Bound to Phytate Coplexes as Influenced by Microbial Phytase and Feeding Regimen in Pigs. J. Anim. Sci., 72: 126-132.
- MURPHY, N., McCONNELL, D.J., and CANTWELL, B.A., 1984. The DNA Sequence of the Gene and Genetic Control Sites for the Excreted *B. subtilis* Enzyme β -glucan Hydrolase. Nucl. Acids Res., 12:5355-5367.
- NAKAMURA, T., SUZUKI, T., TOKUDA, J., KATO, N., SAKAI, Y., MOCHIZUKI, D., and TAKAHASHI, H., 1999. Secretory Manufacture of *Schwanniomyces occidentalis* Phytase Using a *Candida boidinii* host. Eur. Patent Appl. EP 931, July 28, s.837.
- NAYINI, N.R., and MARKAKIS, P., 1984. The Phytase of Yeast. Food Sci. Technol., 17: 126-132.
- NEMESKERY, T., 1983. Probiotics For Young Animals. Feed International, 2: 46-48.

- NEWBOLD, C.J., 1995. Microbial Feed Additives for Ruminants (R.J. WALLACE and A. CHESSON Eds.). Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding, New York, s.259-278.
- NOUSIAINEN, J., and SETALA, J., 1993. Lactic Acid Bacteria As Animal Probiotics (S. SALMINEN and A. VON WRIGHT Eds.). Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker, New York, US, s.315-356.
- OLSEN, O., BORRIS, R., SIMON, O., and THOMSEN, K.K., 1991. Hybrid *Bacillus* (1-3, 1-4)- β -glucanases: Engineering Thermostable Enzymes by Construction of Hybrid Genes. Mol. Gen. Genet., 225: 177-185.
- PANDEY, A., SZAKACS, G., SOCCOL, C.R., RODRÍGUEZ-LEON, J.A, and SOCCOL, A.T., 2001. Production, Purification and Properties of Microbial phytases. Bioresource Technol., 7: 203-217.
- PASAMONTES, L., HAIKER, M., WYSS, M., TESSIER, M., and VANLOON, A.P.G.M., 1997a. Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Heat-Stable Phytase from the Fungus *Aspergillus fumigatus*. Appl. Environ. Microbiol., 63 (5):1696-1700.
- PASAMONTES, L., HAIKER, M., HENRIQUEZHUECAS, M., MITCHELL, D.B., and VANLOON, A.P.G.M., 1997b. Cloning of the phytases from *Emmericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr., 1353(3): 217-223.
- PAYOT, T., CHEMALY, Z., and FICK, M., 1999. Lactic Acid Production by *Bacillus coagulans*-Kinetic Studies and Optimization of Culture Medium for Batch and Continuous Fermentations. Enzyme Microbial Technol., 24:191-197.
- PHILLIPPY, B.Q., and MULLANEY, E.J., 1997. Expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Escherichia coli*. J. Agricult.. Food Chem., 45(8):3337-3342.
- PLANAS, A., 2000. Bacterial 1,3-1,4- β -Glucanases: Structure, Function and Protein Engineering (Review). Biochim. Biophys. Acta, 1543: 361-382.

- POLAT, C., ŞAMLI, H.E. ve HANGÜN, Ö., 1999. Ekzojen Enzimlerin Etlik Piliçlerde Karkas Verimi Üzerine Etkileri. Uluslararası Hayvancılık'99 Kongresi 21-24 Eylül 1999, İzmir-Türkiye, s.357-361.
- POWAR, V.K., and JAGANNATHAN, V., 1982. Purification and Properties of Phytate-specific Phosphatase from *B. subtilis*. J. Bacteriol., 151:1 102-1108.
- RAHA, A.R., CHANG, L.Y., SIPAT, A., YUSOFF, K., and HARYANTI, T., 2006. Expression of Thermostable Xylanase Gene from *Bacillus coagulans* ST-6 in *Lactococcus lactis*. Lett. Appl. Microbiol., 42: 210-214.
- RAMON-BLANCO, C., SANZ-GOMEZ, J.J., LOPEZ-DIAZ, T.M., OTERO, A., and GARCIA-LOPEZ, M.L., 1999. Numbers and Species of *Bacillus* during the Manufacture and Ripening of Castellano Cheese. Milchwissenschaft-Milk Science International, 54: 385-388.
- RAVINDRAN V., DENBOW, D.M., ORNEGAY, E.T., SELF, B.B., and HULET, R.M., 1993. Supplemental Phytase Improves Availability of Phosphorus in Soybean Meal for Turkey Poults. Poult. Sci., Suppl. 1: 73.
- RHEE, M.S., KIM, J.W, QIAN, Y., INGRAM, L.O., and SHANMUGAM, K.T., 2007. Development of Plasmid Vector and Electroporation Condition for Gene Transfer in Sporogenic Lactic Acid Bacterium, *Bacillus coagulans*. Plasmid, 58: 13-22.
- RODER, H., CHENG, H., HENSLEY, H.H., LATYPOV, R.F., MAKI, K., SAMUEL, D., WANG, L., and ZHANG, J., 2003. Protein Folding, Structure and Function. Fox Chase Cancer Center 2003 Scientific Report (http://www.fccc.edu/docs/sci_report/Roder.pdf).
- RODRIGUEZ, E., HAN, Y., and LEI, X.G., 1999. Cloning, Sequencing, and Expression of an *Escherichia coli* Acid Phosphatase/Phytase Gene (*appA2*) Isolated from Pig Colon. Biochem. Biophys. Res. Commun., 257:117-123.
- RODRIGUEZ, E., WOOD, Z.A., KARPLUS, P.A., and LEI, X.G., 2000a. Site-directed Mutagenesis Improves Catalytic Efficiency and Thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 Acid Phosphatase/Phytase Expressed in *Pichia pastoris*. Arch. Biochem. Biophys., 382: 105-112.

- RODRIGUEZ, E., MULLANEY, E.J., and LEI, X.G., 2000b. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase Gene in *Pichia pastoris* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268(2): 373-378.
- ROZKOV, A., 2001. Control of Proteolysis of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. Royal Institute of Technology, Department of Biotechnology, Stockholm,-Sweden.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T., 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- SANDERS, N.E., MORELLI, L., and BUSH, S., 2001. “*Lactobacillus sporogenes*” is not a *Lactobacillus* probiotic. *ASM News*, 8: 6
- SCHALLMEY, M., SINGH, A. and WARD, O.P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Can. J. Microbiol.*, 50: 1-17.
- SCHIMMING, S., SCHWARZ, W.H., and STAUDENBAUER, W.L., 1991. Properties of a thermoactive Beta-1,3-1,4-Glucanase (Lichenase) from *Clostridium thermocellum* Expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177(1): 447-452.
- SCHÖNER, F.J., and HOPPE, P.P., 1992. Microbial Phytase: A Tool to Alleviate Environmental Phosphorus Pollution from Broiler Production. *Proc. XIX World's Poultry Sci. Cong.*, Amsterdam, 3: 429.
- SEKIGUCHI, T., HARADA, Y., SHISHIDO, K., and NOSOH, Y., 1984. Cloning of Beta-Isopropylmalate Dehydrogenase Gene from *Bacillus coagulans* in *Escherichia coli* and Purification and Properties of the Enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, 788(3): 267-273.
- SELLE, P.H. and RAVINDRAN, V., 2006. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology* (In Press).
- SHAH, V., and PAREKH, L.J., 1990. Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: Purification and Properties. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 27: 98-102.
- SHIEH, T.R., and WARE, J.H., 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.*, 16: 1348-1351.

- SHIMIZU, M., 1992. Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(8): 1266-1269.
- SIMONS, P.C., VERSTEEGH, H.A.J., JONGBLOED, A.W., KEMME, P.A., SLUMP, P., BOS, K.D., WOLTERS, G.E., BEUDEKER, R.F., and VERSCHOOR, G.J., 1992. Improvement of Phosphorus Availability by Microbial Phytase in Broilers and Pigs. *Brit. J. Nutr.*, 64:525-533.
- SIMONS, P.C. and VERSTEEGH, H.A.J., 1993. Het Effect van Toevoeging van Microbiële Fytase aan Leghennen Op de Technische Resultaten en de Skeleten Eischeidekwaliteit. *Spelderholt Uitgave No.568*.
- SISSONS, J.W., 1989. Potential of Probiotic Organisms to Prevent Diarrhoea and Promote Digestion in Farm Animals-a Review. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 1.
- SPIELIAERT, R., HREGGVIDSSON, G.O., KRISTIANSSON, J.K., EGGERTSSON, G., and PALSDOTTIR, A., 1994. Cloning and Sequencing of a *Rhodothermus marinus* Gene, *bglA*, Coding for a Thermostable β -glucanase and its Expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 224: 923-930.
- STAVRIC, S. and KORNEGAY, E.T., 1995. Microbial Probiotics for Pigs and Poultry (R. J. WALLACE and A. CHESSON Eds.). *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*, s.205-231.
- STONE, B.A., and CLARKE, A.E., 1992. *Chemistry and Biology of 1,3- β -Glucans*, La Trobe University Press, Bundoora, Australia.
- SULLIVAN, M.A., YASBIN, R.E., and YOUNG, F.E., 1984. New Shuttle Vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which Allow rapid Detection of Inserted Fragments, *Gene*, 29: 21-26.
- SUZUKI, Y., and TOMURA, Y., 1986. Purification and Characterization of *Bacillus coagulans* Oligo-1,6-Glucosidase. *Eur. J. Biochem.*, 158: 77-83.
- SVADBINA, I.V., ZELINSKAYA, N.V., KOVALEVSKAYA, N.P., ZHELEZNAYA, L.A., and MATVIENKO, N.I., 2003. Isolation and Characterization of Site-Specific DNA-methyltransferases from *Bacillus coagulans* K.. *Biochem. (Moscow)*, 69(3): 299-305.

- TABERNERO, C., COLL, P.M., FERNANDEZ-ABALOS, J.M., PEREZ, P., and SANTAMARIA, R.I., 1994. Cloning and DNA Sequencing of *bgaA*, a Gene Encoding an Endo- β -1,3-1,4-Glucanase, from an Alkalophilic *Bacillus* Strain (N137). *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1213-1220.
- TEATHER, R.M., and WOOD, P.J., 1982. Use of Congo Red Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria From the Bovine Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 777-780.
- TEATHER, R.M., and ERFLE, J.D., 1990. DNA Sequence of a *Fibrobacter succinogenes* Mixed-Linkage-Glucanase (1,3-1,4- β -D-Glucan 4-Glucanohydrolase) Gene. *J. Bacteriol.*, 172: 3837-3841.
- TENG, D., WANG, J., FAN, Y., YANG, Y., TIAN, Z., LUO, J., YANG, G., and ZHANG, F., 2006. Cloning of β -1,3-1,4-glucanase Gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and Its Expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72:705-712.
- TOPAKTAŞ, M., 1991. Moleküler Genetik Kitabı, 428 s.(Yayınlanmamış)
- TUNCER, İ., 2000. Kanatlı Rasyonlarında Probiyotik Kullanımı. *Çiftlik Dergisi*, Mayıs, 2000, 195:39-42.
- TUOMOLA, E., CRITTENDEN, R., PLAYNE, M., ISOLAURI, E., and SALMINEN, S., 2001. Quality Assurance Criteria for Probiotic Bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(suppl): 393S-398S.
- TYE, A.J., SIU, F.K.Y., LEUNG, T.Y.C., and LIM, B.L., 2002. Molecular Cloning and the Biochemical Characterization of Two Novel Phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 190-197.
- ULLAH, A.H.J., SETHUMADHAVAN, K., MULLANEY, E.J., ZIEGELHOFFER, T., and AUSTIN-PHILLIPS, S., 1999. Characterization of Recombinant Fungal Phytase (*phyA*) Expressed in Tobacco Leaves. *Biochem. Res. Commun.*, 264(1): 201-206.
- VANBELLE, N., TELLER, and E., FOCANT, M., 1990. Probiotics in Animal Nutrition:A review. *Arch. Anim. Nutr.*, 40: 543-567.
- VAN HARTINGSVELDT, W., VAN ZEIJL, C.M.J., HARTEVELD, M., GOUKA, R.J., SUYKERBUYK, M.E.G., LUITEN, R.G.M., VAN PARIDON, P.A.,

- SELTEN, G.C.M., VEENSTRA, A.E., VAN GORCOM, R.F.M., and VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J., 1993. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Gene*, 127: 87-94.
- VAN HORN, H.H., HARRIS, B., TAYLOR, M.J., BACHMAN, K.C., and WILCOX, C.J., 1984. By Product Feeds for Lactating Dairy Cows: Effects of Cottonseed Hulls, Sunflower Hulls, Corrugated Paper, Peanut Hulls, Sugarcane Bagasse and Whole Cottonseed with Additives of Fat, Sodium Bicarbonate and *Aspergillus oryzae* Product on Milk Production. *J. Dairy Science*, 67: 2922-2938.
- VECCHI, E., and DRAGO, L., 2006. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: Misidentification or Mislabelling? *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 1(1): 3-10.
- VEHMAANPERÄ, J., 1989. Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 61: 165-170.
- VOHRA, A., and SATYANARAYANA, T., 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23(1): 29-60.
- WALLACE, R.J., and NEWBOLD, C.J., 1992. Probiotics for Ruminants. In *Probiotics: the Scientific Basis*. (Ed. R. Fuller), Chapman and Hall, London, UK, s.317-353.
- WANG, X., UPATHAM, S., PANBANGRED, W., ISARANGKUL, D., SUMMPUNN, P., WIYAKRUTTA, S., and MEEVOOTISOM, V., 2004. Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequence Analysis of a Phytase from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5. *Science Asia*, 30: 383-390.
- WEIDMEJER, R.D., ARAMBEL, M.J., and WALTERS, J.L., 1987. Effect of Yeast Cultures and *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract on Ruminant Characteristic and Nutrient Digestibility. *J. Dairy Sci.*, 70:2063-2068.

- WHITE, W.B., SUNDE, M.L., BIRD, H.R., MARLETT, J.A., PRENTICE, N.A., and BURGER, W.C., 1983. Viscosity of β -glucan as a Factor in the Enzymatic Improvement of Barley for Chicks. *Poult. Sci.*, 62: 853-862.
- WILSON, K.H., and PERINI, F., 1988. Role of Competition for nutrients in Suppression of *Clostridium difficile* by the Colonic Microflora. *Infect. Immun*, 56: 2610-2614.
- WU, J.F., 1987. The Microbiologist's Function In Developing Action-Specific Microorganisms (T.P. LYONS Ed.). *Biotechnology In The Feed Industry*, Alltech Technical Publication, Kentucky, s.181-197.
- YAO, B., ZHANG, C.Y., WANG, J.H., and FAN, Y.L., 1998. Recombinant *Pichia pastoris* Over-Expressing Bioactive Phytase. *Science in China Series C-Life Sciences*, 41(3): 330-336.
- YONGGING, C., DAXIN, S., XINGGI, H., HONG, J., WANYUAN, A., and WEIJUN, Z., 2005. Subcloning and FrunctionalAnalysis of a *Bacillus subtilis* β -1,3-1,4-glucanase Gene (*bglS*) in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.*, 21(4): 267-271.
- YOON, S.J., CHOI, Y.J., MIN, H.K., CHO, K.K., KIM, J.W., LEE, S.C., and YUNG, Y.H., 1996. Isolation and Identification of Phytase-procuding Bacterium, *Enterobacter* sp.4, and Enzymatic Properties of Phytase Enzyme. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 18: 449-454.
- YOON, H., LEE, K., KIM, H.Y., KIM, H.K., SHIN, D., HONG, B., and CHO, H., 2002. Gene Cloning and Biochemical Analysis of Thermostable Chitosanase (*TCH-2*) from *Bacillus coagulans* CK108. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(5): 986-995.
- ZININ, N.V., SERKINA, A.V., GELFAND, M.S., SHEVELEV, A.B., and SINEOKY, S.P., 2004. Gene Cloning, Expression and Characterization of Novel Phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS Microbiology Letters*, 236(2): 283-290.
- ZVERLOV, V.V., FUCHS, K.P., SCHWARZ, W.H., and VELIKODVORSKAYA, G.A., 1994. Purification and Cellulosomal Localization of *Clostridium*

thermocellum Mixed Linkage β -glucanase LicB (1,3-1,4- β -D-glucanase).
Biotechnol. Lett., 16:29-34.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde doğdum. İlk öğrenimimi 1987 yılında Adana'da, orta öğrenimimi 1990 yılında Şanlıurfa'da ve lise öğrenimimi 1993 yılında Adana'da tamamladım. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yüksek öğrenimime başlayarak 1997 yılında bu bölümden mezun oldum. 1999 yılında aynı üniversitenin Zootečni Bölümü'nde yüksek lisans eğitimime başladım. 2002 yılında Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Ziraat Yüksek Mühendisi olarak mezun oldum ve aynı yıl doktora eğitimime başladım. 1999 yılından itibaren Zootečni Bölümü Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi ünvanı ile çalışmakta olup halen aynı görevi sürdürmekteyim.

EKLER

EK-1. BESİ YERİ VE SOLÜSYONLAR

1.1. Buğday Kepeği Ekstraktı (Wheat Bran Extract)'nın Hazırlanması

%10 olacak şekilde hazırlanan buğday kepeği (1 kg buğday kepeği, 10 litre saf suda çözülür.) 121 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası oda sıcaklığında soğutulan ekstrakt süzülerek kepek kısmı uzaklaştırılmıştır. Kalan sıvı kısma; %0.04 g (NH₄)₂SO₄, %0.02 g MgSO₄.7H₂O, %0.05 g KH₂PO₄, %0.04 g K₂HPO₄, %0.2 g CaCl₂ ilave edilmiştir. Buğday Kepeği Ekstraktına, hazırlanan hacme uygun olacak şekilde LB besi yeri (%1 w/v Bacto tryptone, %0.5 w/v Yeast extract, %1 w/v NaCl) veya Medyum1 (Pepton (meat) 7.8 g/l, Pepton (caseine) 7.8 g/l, Yeast Extract 2.8 g/l, NaCl 5.6 g/l, Glukoz 1.0 g/l) içeriği ilave edildikten sonra pH 7.0'a ayarlanmıştır. Daha sonra %0.06 g Sodyum Fitat ve %1.5 w/v Agar ilave edilerek katı besi yeri hazırlanmıştır. Fitaz enzim aktivitesi tayini için; sıvı LB veya MedyumI besi yerlerinde üretilen bakteriler yukarıdaki gibi hazırlanan katı besi yerlerine inoküle edilerek uygun üreme sıcaklıklarında (37°C veya 40°C'de) bir gece inkübe edilmiştir (Powar ve Jagannathan, 1982).

1.2. Besi Ortamları İçin Stok Antibiyotik Hazırlanması

a) Amfisilin (25 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktar amfisilin tartılarak saf suda çözülür. Bakteriyel filtreden (0.2 µm) geçirilerek steril bir şekilde mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılır ve -20 °C'de muhafaza edilir. Besiyerine son konsantrasyon 50-100 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

Amfisilin, penisilin türevi bir antibiyotik olup hücre duvarı sentezini bloke ederek bakterinin ölümüne neden olur. Bu antibiyotiğe dirençli bakteriler tarafından sentezlenen β -laktamaz, antibiyotiğin β -laktam halkasını kopararak inaktif eder.

b) Kanamisin (25 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktar kanamisin tartılarak saf suda çözülür. Bakteriyel filtreden (0.2 μ m) geçirilerek steril bir şekilde mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılır ve -20 °C’de muhafaza edilir. Besiyerine son konsantrasyon 10 μ g/ml olacak şekilde ilave edilir.

Kanamisin, deoksistreptamin aminoglikosidaz olup ribozoma bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Dirençli bakteriler tarafından sentezlenen aminoglikosid fosfotransferaz antibiyotiği inaktif ederek etkisiz hale getirir.

1.3. Liziz Solüsyonu (pH 7.5)

50 mM EDTA

100 mM NaCl

İstenen hacim için gerekli malzemeler hesaplanarak tartılır ve pH’sı 7.5’e ayarlanır. Otoklavlanarak +4 °C’de muhafaza edilir.

1.4. Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol (25:24:1)

Stok fenolden bir pipet yardımıyla dikkatlice 25 ml çekilir. Üzerine 24 ml kloroform ve 1 ml izoamil alkol ilave edilerek toplam hacim 50 ml’ye tamamlanır. Kullanmadan önce iyice çalkalanarak homojenize edilmelidir. İçinde bulunduğu şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalı ve +4 °C’de saklanmalıdır. Kullanım süresi 1 ayı geçmemelidir.

1.5. Kloroform/İzoamil Alkol (24:1)

24 birim kloroform, 1 birim izoamil alkol ile karıştırılarak hazırlanır. İçinde bulunduğu şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalı ve +4 °C’de saklanmalıdır.

1.6. 3 M Na-asetat (pH 4.8 ve 5.2)

Hazırlanmak istenen hacimde, 3 M olacak şekilde Na-asetat tartılır ve manyetik karıştırıcı üzerinde bir miktar saf suda çözülür. Glasial asetik asit ile pH’sı ayarlanır ve saf su ile istenen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilir.

1.7. TE Solüsyonu (pH 8.0)

10 mM Tris (pH 7.6)

0.1 M EDTA (pH 8.0)

Hazırlanacak hacim için gerekli Tris ve EDTA hesaplanarak stoktan alınır ve saf su ile hacme tamamlanır. Otoklavlanarak kontamine etmeden kullanılır.

1.8. RNaz Hazırlanması (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gerekli kadar miktar RNaz A dikkatli bir şekilde tartılarak RNaz solüsyonunda (10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 15 mM NaCl) çözülür. 100°C’de 15 dk tutularak DNaz aktivitesi inhibe edilir. Oda sıcaklığında soğuduktan sonra mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılır ve -20 °C’de muhafaza edilir.

1.9. Yükleme Tamponu (6X)

%40 Sukroz (w/v), saf suda çözülür

%0.25 Bromfenol mavisi

Yukarıda verilen oranlara göre, istenen hacim için gereken miktarlarda sukroz ve boya tartılarak iyice homojenize edilir. Mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılarak +4 °C’de muhafaza edilir. DNA solüsyonu ile 1:5 oranında (1 hacim boya, 5 hacim DNA solüsyonu) karıştırılır.

1.10. Agaroz Jel

Belirlenen hacim için gerekli miktarda agaroz tartılarak bir erlen içerisine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (Ek 1.11.) konarak alev üzerinde eriyinceye kadar tutulur. Elle tutulacak sıcaklığa kadar (45-50 °C) soğuduktan sonra son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr solüsyonu (Ek 1.12.) ilave edilir. Jel kabına dikkatli bir şekilde dökülerek jel tırağı yerleştirilir ve donması için yaklaşık 40 dk beklenir. Jel elektroforez tankına alınarak üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edilir. Tarak çıkarılarak oluşan kuyulara DNA örneği yerleştirilir.

1.11. 5X TBE Tamponu (pH 8.0)

Bir litre için;

54 gr Tris-baz

27.5 gr Borik asit

10 mM EDTA (pH 8.0)

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre orantılanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülerek pH’sı NaOH ile 8.0’a ayarlanır ve otoklav yapılarak sterilize edilir.

Kullanım konsantrasyonu olan 1X yapmak için 1 hacim 5X TBE alınarak üzerine 4 hacim saf su ilave edilir.

1.12. Ethidium Bromid (EtBr) (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gereken miktar Ethidium bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve saf suda vortekslenerek iyice çözülür. Işığa hassas

olduğu için koyu renkli bir şişeye konur, veya bulunduğu kap alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C’de muhafaza edilir. Kuvvetli bir mutajen olduğu için tartım ve kullanım sırasında çok dikkatli olunmalı, mutlaka eldiven ve maske kullanılmalıdır.

EtBr floresan bir boya olup DNA ve RNA’da bulunan bazlar arasına girerek bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerlerinin belirlenmesini sağlar.

1.13. TNE Solüsyonu

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

100 mM NaCl

1 mM EDTA (pH 8.0)

İstenen hacim için gerekli tris, NaCl ve EDTA hesaplanarak stoklarından alınır, saf su ile hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra kontamine etmeden kullanılır. +4 °C’de muhafaza edilmelidir.

1.14. Lizozim Solüsyonu (pH 8.0) (5 mg/ml)

50 mM Glukoz

10 mM EDTA

25 mM Tris

Önce 25 ml 1 M glukoz hazırlanarak steril filtreden geçirilir ve stok olarak saklanır. İstenen hacimdeki solüsyon için gerekli tris, EDTA ve glukoz hesaplanarak stoktan alınır ve saf su ile hacme tamamlanır. Otoklav yapılmaz, buz dolabında saklanır. Kullanılacağı zaman istenen hacimde solüsyon alınarak 5 mg/ml olacak şekilde liyofilize lizozim tartılarak eklenir ve iyice vortekslenir. Kullanılincaya kadar buz üzerinde tutulmalıdır. Her zaman taze hazırlanması gerektiği için fazlası dökülür.

1.15. SDS Solüsyonu

0.2 M NaOH

%1 SDS (w/v)

10 ml için; 0.08 gr NaOH ve 0.1 gr SDS tartılarak üzerine 10 ml steril saf su ilave edilir. Vortekslenerek iyice homojenize edilir. Kullanılincaya kadar buz üzerinde tutulmalıdır. Her zaman taze hazırlanması gerektiği için fazlası dökülür.

1.16. 0.1 M MgCl₂

İstenen hacim için gerekli MgCl₂ hesaplanarak tartılır ve istenilen hacimde saf su ile çözülür. Otoklavlanarak +4 °C’de muhafaza edilir. Kontamine etmeden kullanılır.

1.17. 0.1 M CaCl₂

İstenen hacim için gerekli CaCl₂ hesaplanarak tartılır ve istenilen hacimde saf su ile çözülür. Otoklavlanarak +4 °C’de muhafaza edilir. Kontamine etmeden kullanılır.

1.18. X-gal (20 mg/ml)

İstenen hacim için gerekli miktarda X-gal tartılarak N,N-Dimetilformamid içerisinde çözülür. Koyu renkli bir şişeye alınarak veya bulunduğu kap alüminyum folyo ile sarılarak -20 °C’de muhafaza edilir. Hazırlanan besi yeri 45-50 °C’ye kadar soğuduktan sonra son konsantrasyon 40 µg/ml olacak şekilde stoktan ilave edilir.

1.19. SHMG Solüsyonu (pH 7.0)

0.25 M Sukroz

1 mM HEPES

1 mM MgCl₂

%10 v/v Gliserol

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre hesaplanarak alınır. Hacmin biraz altında saf su ile çözülür. pH'sı NaOH ile 8.0'a ayarlanır. Otoklavlanarak +4 °C'de muhafaza edilir. Kontamine etmeden kullanılır.

1.20. Kongo-Red Boyası

%0.1 w/w Kongo-Red olacak şekilde istenilen hacim için gerekli miktar tartılarak saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda iyice çözündürülür. SDS-Lik-PAGE için daha sonra Kongo-Red içerisine 5 mM NaOH ilave edilerek çözülmesi sağlanır.

1.21. SDS-PAGE'nin Hazırlanması (Laemmli, 1970)

%12'lik ayırıcı jel aşağıda verilen oranlarda kimyasalların ilavesiyle hazırlanır:

12 ml Akrilamid (%30; 30 gr akrilamid ve 0.8 gr bisakrilamid tartılarak toplam 100 ml olacak şekilde saf suda çözülür.)

5.62 ml Tris (2 M, pH 8.8)

0.3 ml SDS (%10)

12.1 ml Saf su

Karışım hazırlandıktan sonra, polimerizasyonu sağlamak için üzerine 200 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 20 µl TEMED ilave edilerek daha önce hazırlanan iki cam levhadan oluşan düzeneğin arasındaki boşluğa bir pastör pipeti yardımıyla üstten 4-5 cm boşluk kalacak şekilde dökülür. Üzerine ince bir katman oluşturacak şekilde su ile satüre edilmiş bütanol ilave edilerek donması için 45 dk beklenir. Jel donduktan sonra üstteki bütanol bir teksir kağıdına emdirilerek alınır. Bu arada aşağıda verilen oranlarda kimyasalların karışımıyla toplayıcı jel bir erlen içerisine hazırlanır:

1.8 ml Akrilamid

3.65 ml Tris (0.5 M, pH 6.8)

0.15 ml SDS (%10)

9.4 ml Saf su

Polimerizasyonu sağlamak için 100 µl amonyum persülfat (%10) ve 10 µl TEMED eklenerek bir pipet yardımıyla toplayıcı jelin üzerine dökülür. Jel tarağı yerleştirilerek donması için 45 dk beklenir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak yarısına kadar elektrod solüsyonu konmuş olan tankın içerisine kısa cam iç tarafa gelecek şekilde yerleştirilir. Karşı tarafa iki cam levha yan yana konularak uzun cam iç tarafa gelecek şekilde yerleştirilir. Daha sonra iki cam levhanın arasına jelin üzerine çıkacak kadar, dışına ise 4-5 cm yüksekliğinde elektrod solüsyonu (Ek 1.23.) ilave edilir.

Substratlı SDS-PAGE hazırlamak için, ayırıcı jele %10 buğday kepeği ekstraktı/%2 w/v'lik Na-fitat veya %2 w/v'lik likenandan olacak şekilde ilave edilir.

1.22. Kaynatma Solüsyonu

1 ml %30 spacer jel solüsyonu (0.5 M Tris-HCL (pH 7.6), %10 w/v SDS)

0.8 ml %25 SDS

0.5 ml β-merkaptoetanol

1 ml Gliserol

Bir-kaç bromfenol mavisi kristali

Yukarıda verilen oranlara göre istenen hacim için gereken miktarlarda malzeme alınarak homojenize edilir. Oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir. Protein örneği ile 1:2 oranında (1 hacim protein, 0.5 hacim kaynatma solüsyonu) karıştırılarak 3 dk süreyle kaynar suda tutulur ve SDS-PAGE'de elektroforez edilir.

1.23. Elektrod Solüsyonu (1 litre için)

0.05 M Glisin

0.05 M Tris-baz

%0.1 SDS

Yukarıda verilen oranlara göre istenen hacim için gereken miktarlarda malzeme tartılarak bir kaba konur. İstenen hacmin biraz altında saf su ile çözüldükten sonra yine saf su ile hacme tamamlanır.

1.24. Coomassie Blue Boyası (1 litre)

2 gr Coomassie blue (%0.2 w/v)

500 ml Metanol (%50 v/v)

100 ml Glasial asetik asit (%10 v/v)

400 ml Saf su

Yukarıda verilen miktarlarda malzemeler bir erlen içerisinde alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde iyice homojenize edilir.

1.25. Destain Solüsyonu (Yıkama Solüsyonu) (1 litre)

50 ml Metanol (%5 v/v)

70 ml Glasial asetik asit (%7 v/v)

880 ml Saf su

Yukarıda verilen miktarlarda malzemeler bir erlen içerisinde alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde iyice homojenize edilir.

1.26. 50 mM Na-fosfat Solüsyonu

50 mM Na_2HPO_4

50 mM NaH_2PO_4

İstenen hacim için gereken miktarlarda Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 tartılarak önce her biri için ayrı ayrı solüsyon hazırlanır. Daha sonra geniş bir kaba her iki solüsyondan dikkatlice aktararak birbiri ile pH 7.0 veya 6.5'e ayarlanır. Otoklavlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

1.27. İyodin Boyası (100 ml)

50 ml Metanol

10 gr Potasyum iyodid

1 gr İyodin (iyot)

Yukarıda belirtilen miktarlarda kimyasal malzemeler hazırlanarak bir erlenin içerisine konur. Bir miktar saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda iyice çözdürülür. Hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

EK-2. PROTOKOLLER

2.1. Prokaryotik Organizmalardan Kromozomal DNA İzolasyonu (Cutting ve Van der Horn, 1990)

1. Bakteri kültürü uygun sıvı besiyerine steril öze yardımıyla mastır plaktan ekilerek uygun sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde gece boyunca üremeye bırakılır.
2. Bakteri kültürü 10 ml hacimli steril santrifüj tüplerine paylaştırılarak 4500 dev/dk da 10 dk santrifüj yapılır.
3. Sıvı faz dökülerek bakteri peleti 10 ml liziz solüsyonu (Ek 1.3.) ile çözülerek yıkanır. Kültür tekrar 4500 dev/dk da 10 dk santrifüj yapılarak pelet haline getirilir.
4. Süpernatant uzaklaştırılarak bakteri peleti 4 ml liziz solüsyonu ile çözülür.
5. 10 mg lizozim tartılarak bakteri kültürünün üzerine toz halinde eklenir ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde çalkalamadan 10 dk inkübe edilir.
6. Üzerine 300 µl %20 w/v sarkosil eklenerek inkübasyona 5 dk daha devam edilir.
7. Karışım 1.5 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine (500'er µl) paylaştırılarak üzerine 1 hacim fenol-kloroform (Ek 1.4.) eklenir ve süspansiyon haline gelene kadar dikkatlice alt-üst edilir.
8. Karışım 15000 dev/dk da 10 dk santrifüj yapılır. Üst faz bir otomatik pipet yardımıyla dikkatlice alınarak temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarılır.
9. Üzerine 1 hacim kloroform (Ek 1.5.) eklenerek iyice alt-üst edilir.

10. Karışım tekrar 15000 dev/dk da 10 dk santrifüj yapılarak üst faz bir otomatik pipet yardımıyla alınarak temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarılır.
11. Üzerine 1/10 hacim Na-asetat (3 M, pH 5.2) (Ek 1.6.) ve 2.5 hacim soğuk %99 etanol ilave edilir.
12. Tüpler birkaç kere alt-üst edilerek DNA peletinin süspansiyon içerisinde yumak oluşturması sağlanır.
13. DNA peleti bir pipet veya cam çubuk yardımıyla temiz mikrosantrifüj tüpüne alınır ve üzerine %70 v/v etanol ilave edilerek yıkanır.
14. Kısa bir santrifüjle DNA peleti tüpün dibine toplanarak %70'lik alkol uzaklaştırılır.
15. DNA peleti oda sıcaklığında 10-15 dk kurutularak yaklaşık 50 µl TE solüsyonu (Ek 1.7.) veya steril saf su ile çözülür.

2.2. DNA'nın RNaz Enzimi İle RNA'dan Arındırılması

1. DNA'nın hacmi TE solüsyonu ile 100 µl'ye tamamlanarak 1 µl RNaz A (Ek 1.8.) ilave edilir ve 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılır.
2. Süre sonunda tüpe 40 µl Na-asetat (3 M, pH 4.8) solüsyonu (Ek 1.6.) ve 260 µl saf su ilave edilerek hacim 400 µl'ye tamamlanır.
3. Üzerine 1 hacim (400 µl) fenol/kloroform (Ek 1.4.) ilave edilerek tüp iyice alt-üst edilir. Süspansiyon süt kıvamını aldıktan sonra 15.000 dev/dk da 10 dk santrifüj yapılır.
4. DNA içeren üst faz dikkatlice alınarak temiz bir tüpe konur ve üzerine 1 hacim (400 µl) kloroform (Ek 1.5.) ilave edilir. Tüp birkaç dk alt-üst edildikten sonra 15.000 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj edilir.
5. Üst faz alınarak temiz bir tüpe konur ve üzerine 2.5 hacim (1000 µl) %99'luk soğuk etanol ilave edilir. Karışım homojenize edilerek en az 2 saat süreyle -20 °C'de bekletilir.
6. 15.000 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj yapılarak DNA pelet haline getirilir. Üst faz dökülerek pelet %70 v/v etanol ile yıkanır. Son olarak pelet kurutularak üzerine 30

μ l TE solüsyonu (Ek 1.7.) ilave edilir ve çözünmesi için +4 °C’de 1 gece (veya oda sıcaklığında 2 saat) bekletilir.

2.3. DNA’nın Agaroz Jelden Arındırılması (Fermentas, K0513)

1. Elektroforez edilen DNA’nın bulunduğu agaroz jel bölgesi temiz bir bistüri yardımıyla kesilerek darası alınmış mikrosantrifüj tüpüne konur ve tekrar tartılarak miktarı tespit edilir.
2. Üzerine agaroz ağırlığının 0.5 katı TBE konversiyon solüsyonu, 4.5 katı da bağlama (binding) solüsyonu ilave edilerek 55 °C’de 5 dk veya jel tamamen eriyene kadar inkübe edilir.
3. 2.5 μ g DNA için 5 μ l, her fazlalık 1 μ g DNA içinse ilaveten 2 μ l silika tozu eklenerek 55 °C’de inkübasyona 5 dk daha devam edilir. Bu aşamada her 2 dk’da bir tüp vortekslenir.
4. 13000 dev/dk da 5 saniye santrifüj yapılarak süpernatant kısım dökülür.
5. Pelet 500 μ l soğuk yıkama solüsyonu (washing buffer) ile vortekslenerek çözülür ve 13000 dev/dk da 5 saniye santrifüj yapılarak süpernatant kısım dökülür. Bu işlem toplam 3 defa tekrar edilir ve her defasında 13000 dev/dk da 5 saniye santrifüj yapılarak süpernatant kısım uzaklaştırılır.
6. Pelet 10-15 dk süreyle oda sıcaklığında kurutulur.
7. Pelet 20 μ l TE veya steril saf su ile pipetlenerek çözülür ve 55 °C’de 5 dk bekletilir.
8. Kısa bir santrifüjle silika tozu pelet haline getirilir, süpernatant kısım ise temiz bir mikrosantrifüj tüpe aktarılır.
9. Silika tozu peleti tekrar 20 μ l TE veya steril saf su ile pipetlenerek çözülür ve 55 °C’de 5 dk daha bekletilir. Böylece silika tozu üzerinde kalan son DNA’lar da alınmış olur.
10. Kısa bir santrifüjle silika tozu pelet haline getirilir, süpernatant kısım bir önceki süpernatantın bulunduğu mikrosantrifüj tüpüne aktarılır (toplam 40 μ l).
11. DNA’nın aktarıldığı tüp tekrar kısa bir santrifüjlenir ve DNA ile birlikte kaçan silika tozu pelet haline getirilmiş olur.

12. DNA'nın bulunduğu sıvı kısım temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
13. DNA'nın spektrofotometrede miktar ve saflık derecesi belirlenerek etiketlenir ve +4 °C'de muhafaza edilir.

2.4. *Escherichia coli*'den Plazmid DNA İzolasyonu (Birnboim ve Doly, 1979)

1. Bakteri kültürü uygun konsantrasyonda antibiyotik içeren 25 ml hacimli LB sıvı besiyerine steril öze yardımı ile ekilerek 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde gece boyunca üremeye bırakılır.
2. Gelişmiş olan bakteri kültürü +4 °C'de soğutulduktan sonra 10 ml'lik steril santrifüj tüplerine paylaştırılır ve 4500 dev/dk da 10 dk santrifüj yapılarak pelet haline getirilir.
3. Süpernatant kısım atılarak bakteri peleti üzerine 5'er ml soğuk TNE solüsyonu (Ek 1.13.) eklenerek bir pipet yardımıyla çözülür ve 4500 dev/dk da 10 dk santrifüjle tekrar pelet haline getirilir.
4. Süpernatant kısım uzaklaştırılarak bakteri peleti 5 mg/ml lizozim içeren 200 µl lizozim solüsyonunda (Ek 1.14.) çözülür ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir.
5. Üzerine taze hazırlanmış SDS solüsyonundan (Ek 1.15.) 200 µl ilave edilerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 5 dk daha inkübe edilir.
6. Üzerine 150 µl 3 M Na-asetat solüsyonu (pH 4.8) (Ek 1.6.) ilave edilerek karıştırılır ve buz üzerinde 30 dk daha inkübe edilir.
7. Karışım mikrosantrifüj tüpüne alınarak 15000 dev/dk da 10 dk santrifüj yapılır. Üst faz temiz bir tüpe alınır.
8. Üzerine 1 hacim fenol-kloroform (Ek 1.4.) ilave edilerek süspansiyon haline gelene kadar alt-üst edilir ve tekrar 15000 dev/dk da 10 dk santrifüjlenir.
9. Üst faz bir pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve üzerine 1 hacim kloroform (Ek 1.5.) ilave edilir. Karışım birkaç dk alt-üst edildikten sonra tekrar 15000 dev/dk da 10 dk santrifüj yapılır.
10. Üst faz bir pipet yardımıyla temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınır ve üzerine 2 hacim % 99'luk etanol ilave edilir. Karışım vortekslenerek -20 °C'de en az 2 saat inkübe edilir.

11. 15.000 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj yapılarak DNA pelet haline getirilir. Üst faz dökülerek pelet %70 v/v etanol ile yıkanır. Son olarak pelet kurutularak üzerine 30 µl TE solüsyonu (Ek 1.7.) ilave edilir ve çözünmesi için +4°C’de 1 gece (veya oda sıcaklığında 2 saat) bekletilir.

2.5. *E. coli* DH5α Bakterisinin Kompetent Hale Getirilmesi (Hanahan, 1983)

1. *E. coli* XL1 Blue MRF⁺ bakterisi 1 gece önce 12.5 µg/ml tetrasiklin içeren 5 ml hacimli LB sıvı besiyerine steril öze yardımıyla ekilerek 37 °C’ye ayarlanmış inkübatörde üremeye bırakılır.
2. Ertesi gün, üremiş olan kültürden 25 ml hacimli LB sıvı besiyerine %1 olacak şekilde inoküle edilir ve 37 °C’de OD_{500nm}≅ 0.4 oluncaya kadar (~2.5-3.0 saat) üretilir.
3. Bakteri buz üzerine alınarak 10 ml hacimli steril santrifüj tüplerine paylaştırılır.
4. Bakteri kültürü 4500 dev/dk da 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirilir.
5. Süpernatant kısım dökülerek pelet 2 ml soğuk 0.1 M MgCl₂ (Ek 1.16.) ile yıkanır.
6. Bakteri kültürü 4500 dev/dk da 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirilir.
7. Sıvı kısım uzaklaştırılarak bakteri peleti 2 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ (Ek 1.17.) ile çözülür ve buz üzerinde 20 dk inkübe edilir.
8. Bakteri kültürü 4500 dev/dk da 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirilir.
9. Süpernatant dökülerek bakteri peleti 1000 µl soğuk 0.1 M CaCl₂ ile tekrar çözülür.
10. Bakteri kültürü steril mikrosantrifüj tüplerine 200’er µl olacak şekilde paylaştırılarak kullanıma hazır hale getirilir.

2.6. *E. coli* DH5α Kompetent Bakterisine Transformasyon

1. Kompetent *E. coli* DH5α bakterisi bulunduran iki adet mikrosantrifüj tüpü buz üzerine alınır.
2. Bir tanesine 5-10 µl ligasyon sıvısı ilave edilerek hafifçe pipetlenir ve karışım homojen hale getirilir. Diğer tüpe ise DNA ilave edilmez ve kontrol grubu olarak bırakılır.

3. Tüpler buz üzerinde en az 30 dk bekletilir.
4. Tüpler 42 °C’de 90 saniye tutulur ve hemen tekrar buz üzerine alınır.
5. Tüplerdeki sıvıların tamamı ayrı ayrı 1 ml LB sıvı besiyerlerine (antibiyotik içermiyor) boşaltılarak 37 °C’de 1 saat süreyle üretilir.
6. Daha sonra bakterilerden 100-200 µl alınarak LB/Agar/Amp/X-gal plaklarına (50 µg/ml amfisilin, 40 µg/ml X-gal) steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekilir ve plaklar 5-10 dk kurutulduktan sonra ters çevrilerek 37 °C’ye ayarlanmış inkübatöre ertesi güne kadar üremeye bırakılır.

2.7. pMK3F ve pMK3L Rekombinant Vektörlerinin *B. coagulans* Bakterisine Elektrotransformasyonu

1. Bakteri kültürü MedyumI sıvı besiyerine ekilerek 1 gece 40 °C’de inkübasyona bırakılır.
2. Besiyerinde gelişen bakteriden MedyumI-SP besiyerine (0.25 M sukroz ve 50 mM K-fosfat ile desteklenmiş MedyumI sıvı besiyeri, pH 7.0) %1 olacak şekilde inoküle edilerek $OD_{600nm} \approx 0.6$ oluncaya kadar (~4-5 saat) 40 °C’de inkübasyona bırakılır.
3. Süre sonunda bakteri kültürü 10 ml hacimli steril santrifüj tüpüne alınarak 4500 dev/dk da 10 dk süreyle çöktürülür.
4. Süpernatant kısım atılarak bakteri peleti üç kez soğuk SHMG solüsyonu (Ek 1.19.) ile yıkanır ve her seferinde 4500 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj yapılarak süpernatant kısım uzaklaştırılır.
5. Bakteri peleti, başlangıç hacminin 1/100 oranında soğuk SHMG solüsyonu ile çözülür ve 100’er µl olacak şekilde steril mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılır.
6. Tüplerden bir tanesine 5 µl ligasyon sıvısı ilave edilerek karıştırılır, diğer tüp ise hiçbir DNA ilave edilmeden kontrol olarak bırakılır. Her iki örnek de (bakteri+DNA karışımı ve kontrol) daha önce buz üzerinde soğutulmuş 0.2 cm’lik elektroprasyon kuvvetlerine alınarak 20 dk süreyle buz üzerinde inkübe edilir.

7. Her iki bakteri grubu da 1800 volt (0.9 kV/cm), 25 μ F, 200 Ω ve 25 mA değerleri kullanarak elektrotransformasyon işlemine tabi tutulur.
8. Elektrotransformasyondan sonra bakteriler hemen 1'er ml MedyumISP (MedyumISP, %10 gliserol (v/v)) besiyeri içerisine alınarak 1 saat sureyle 37 $^{\circ}$ C'ye ayarlanmış inkubatorde çalkalama yöntemiyle inkübasyona bırakılır.
9. Sure sonunda bakteri+DNA karışımı olan grup 10 μ g/ml kanamisin içeren MedyumI/Agar plaklarına steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekilir. Kontrol grubuna ait bakteriler ise yine 10 μ g/ml kanamisin içeren MedyumI/Agar plaklarına ilaveten antibiyotik içermeyen MedyumI/Agar plağına da ekilir. Daha sonra ekimi tamamlanan bütün plaklar ters çevrilerek 40 $^{\circ}$ C'ye ayarlanmış inkubatorde ertesine güne kadar inkübasyona bırakılır.

2.8. *Bacillus*'lardan Plazmid DNA İzolasyonu (Hardy, 1985)

1. Bakteri uygun antibiyotik içeren MedyumI sıvı besiyerinde 37 $^{\circ}$ C'de gece boyunca çalkalama yöntemiyle üretilir.
2. Ertesi gün bu kültürden 5 ml'lik MedyumI sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilerek OD₆₀₀ nm'de 0.5-0.8 oluncaya kadar 37 $^{\circ}$ C'de tekrar üremesi beklenir (yaklaşık 3 saat).
3. Bakteriler 1.5 ml hacimli mikrosantrifj tüpüne (eppendorf tüpü) alınarak 15.000 dev/dk da 1 dk sureyle santrifüjle çöktürülür.
4. Bakteri peleti 5 mg/ml lizozim içeren 100 μ l lizozim solüsyonu (Ek 1.14.) ile sulandırılarak buz üzerinde 15 dk inkübe edilir.
5. zerine 200 μ l SDS solüsyonu (Ek 1.15.) ilave edilerek buz üzerinde inkübasyona 5 dk daha devam edilir.
6. Karışıma 150 μ l Na-asetat solüsyonu (pH 4.8) (Ek 1.6.) ilave edilerek buz üzerinde 1 saat daha inkübe edilir.
7. Tüpler 15.000 dev/dk da 5 dk santrifüj yapılarak st faz (süpernatant) temiz bir tüpe alınır. zerine 1:1 oranında fenol/kloroform (Ek 1.4.) ilave edilerek iyice alt-st

edilir ve tekrar 15.000 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj yapılır. Santrifügasyon sonrası üst faz temiz bir tüpe alınır.

8. Üzerine bu sefer 1:1 oranında kloroform (Ek 1.4.) ilave edilerek alt-üst edilir ve 15.000 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj yapılır. Üst faz tekrar temiz bir tüpe alınır.
9. Üzerine 2.5 hacim %99'luk etanol ilave edilerek homojenize edilir ve en az 2 saat süreyle -20 °C'de inkübasyona bırakılır.
10. 15.000 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj yapılarak DNA pelet haline getirilir. Üst faz dökülerek pelet %70 v/v etanol ile yıkanır. Son olarak pelet kurutularak üzerine 30 µl TE (Ek 1.7.) solüsyonu ilave edilir ve çözünmesi için +4 °C'de 1 gece (veya oda sıcaklığında 2 saat) bekletilir.

2.9. Hücre dışı Proteinlerin TCA Muamelesi İle Elde Edilmesi

1. Bakteri kültürü steril öze yardımıyla 25 ml hacimli LB sıvı besiyerine ekilerek 37 °C'de 48 saat süreyle üremeye bırakılır.
2. Süre sonunda bakteriler 10 ml hacimli santrifüj tüplerine alınır ve 4500 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj edilerek çöktürülür.
3. Üst faz 5'er ml olacak şekilde temiz santrifüj tüplere alınır ve üzerine 1 hacim %20 w/v TCA eklenerek bir pipet yardımıyla yardımcı ile homojenize edilir.
4. Elde edilen karışımlar (süpernatant+TCA) 24 saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edilir.
5. Süre sonunda örnekler 4500 dev/dk da 10 dk süreyle santrifüj edilerek proteinlerin pelet oluşturması sağlanır. Üst sıvı kısım dökülerek uzaklaştırılır.
6. Protein peletleri kurutularak 1 M Tris (pH 8)'de çözülür.

2.10. SDS-PAGE'de Toplam Proteinlerin Gösterilmesi

1. Jel iki cam levha arasından dikkatlice çıkarılarak Coomassie blue (Ek 1.24.) boyası bulunan bir kabın içerisine konarak 1 saat süreyle boyanması beklenir.
2. Jel Coomassie blue boyasından uzaklaştırılarak destain (Ek 1.25.) solüsyonu bulunan bir kabın içerisine konur ve ertesi güne kadar jel bu solüsyonda

bekletilir. Birkaç defa solüsyon yenilenerek fazla boyanın daha iyi uzaklaşması sağlanır. Böylece bakterilere ait toplam protein bantları görünebilir hale gelir.

2.11. Fitaz ve Likenaz Enzimlerinden Sorumlu Bantların SDS-Na-Fitat-PAGE ve SDS-Likenan-PAGE’de Gösterilmesi

1. Jel iki cam levha arasından dikkatlice çıkarılarak renatürasyon solüsyonuna (%80 v/v 50 mM Na-fosfat solüsyonu (fitaz için pH 7.0, likenaz için pH 6.5) (Ek 1.26.), %20 v/v izopropanol) alınır ve bu solüsyon içerisinde 1 saat süreyle inkübe edilir. Böylece SDS jelden uzaklaştırılarak proteinler renatüre edilmiş olur.
2. Daha sonra jel 50 mM Na-fosfat solüsyonu + 5 mM β -merkaptoetanol + 1 mM EDTA’dan oluşan solüsyona alınarak +4 °C’de gece boyunca inkübe edilir.
3. Jel bu solüsyondan alınarak 50 mM Na-fosfat solüsyonu (pH 7.2 veya 6.5) içerisine konur ve +4°C’de 1 saat inkübe edilir.
4. Ertesi gün jel streç filme sarılarak fitaz enzimi için 55°C’de, likenaz enzimi için 37°C’de 4 saat inkübe edilir. Böylece fitazın ortamdaki fitatı, likenazın ortamdaki likenanı parçalaması sağlanmış olur.
5. SDS-Na-fitat-PAGE iyodin boyası (Ek 1.27.) ile 5-6 dk, SDS-Lik-PAGE Kongo-red (Ek. 1.20) ile boyanarak rekombinant bakterilere ait enzim bantları ortaya çıkarılır.