

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK ALFA – GLUKURONİDAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT
PROTEİN OLARAK İFADESİ VE ENZİMATİK KARAKTERİZASYONU**

HİLAL TAŞDEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Yunus ENSARİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Haziran - 2022

KARS



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI



**TERMOFİLİK ALFA – GLUKURONİDAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT
PROTEİN OLARAK İFADESİ VE ENZİMATİK KARAKTERİZASYONU**

Hilal TAŞDEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr.Öğr. Üyesi Yunus ENSARİ

HAZİRAN - 2022
KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı öğrencisi Hilal TAŞDEMİR 'in Dr. Öğr. Üyesi Yunus ENSARİ danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “TERMOFİLİK ALFA – GLUKURONİDAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT PROTEİN OLARAK İFADESİ VE ENZİMATİK KARAKTERİZASYONU” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

.. / .. / 20..

	Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Medine ÇOTAK	
Üye	: Doç. Dr. Özkan ÖZDEN	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Yunus ENSARİ	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. / .. / 20. . gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fikret AKDENİZ
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hilal TAŞDEMİR

28/06/2022

ÖZET

(Yüksek Lisans Tezi)

TERMOFİLİK ALFA – GLUKURONİDAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT PROTEİN OLARAK İFADESİ VE ENZİMATİK KARAKTERİZASYONU

Hilal TAŞDEMİR

Kafkas Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Yunus ENSARİ

Küresel ekonominin önemli kaynaklarından olan fosil yakıtlar sera gazı emisyonuna ve çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Ayrıca artan küresel nüfusun ihtiyaçları ve endüstriyel üretimden doğan çevre sorunları alternatif bir çözüm arayışına neden olmuştur. Bu problemlerin çözümünde fosil yakıtlara alternatif olarak lignosellülozik biyokütle gelmektedir. Bitkilerden elde edilen lignosellülozik biyokütlenin yapısında selüloz, hemiselüloz ve lignin bulunmaktadır. Lignosellülozik biyokütle enzimatik ön işleme alt birimlerine parçalanmaktadır. Hemiselüloz yapının degradasyonunda endüstriyel öneme sahip aksesuar enzimler görev almaktadır. Hemiselüloz degradasyonunda rol alan enzimlerden biri de α -glukuronidaz enzimidir.

Bu tez çalışmasında termofilik bir bakteri olan *Geobacillus kaustophilus* genomunda bulunan α -glukuronidaz enzimi rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak pQE30 ifade vektörüne klonlanmış ve ardından *Escherichia coli*'de heterolog ifadesi gerçekleştirilmiştir. Heterolog ifadesi gerçekleştirilen α -glukuronidaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmek için enzimin optimum sıcaklığı, optimum pH değeri, aktivitesinin en yüksek olduğu tampon çözelti belirlenmiştir ve son olarak çeşitli kimyasalların enzim aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında lignosellülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizinde kullanılmak üzere yeni bir termofilik α -glukuronidaz enzim adayı rekombinant olarak üretilmiş ve başarılı bir şekilde karakterize edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Lignosellülozik biyokütle, α -glukuronidaz, rekombinant DNA, enzim aktivitesi

ABSTRACT

(Master's Degree Thesis)

EXPRESSION OF THERMOPHILIC ALPHA-GLUCURONIDASE ENZYME AS RECOMBINANT PROTEIN AND ITS ENZYMATIC CHARACTERIZATION

Hilal TAŞDEMİR

Kafkas University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering

Advisor: Assist. Prof. Yunus ENSARİ

Fossil fuels, which are important sources of the global economy, cause greenhouse gas emissions and increase environmental pollution. Furthermore, the demands of an expanding global population, as well as environmental issues associated with industrial production, prompted the search for alternative alternatives. The lignocellulosic biomass shows up as an alternative to fossil fuels in the solution of these problems. The lignocellulosic biomass, obtained from plants, contains cellulose, hemicellulose, and lignin. The lignocellulosic biomass is broken down into sub-units by the enzymatic pretreatment. Industrially important accessory enzymes take roles in the breakdown of the hemicellulosic structure. One of the enzymes playing a part in the degradation of hemicellulose is α -glucuronidase.

In this study, the α -glucuronidase enzyme, which is found in the genome of *Geobacillus kaustophilus* - a thermophilic bacterium -, was cloned into pQE30 expression vector through recombinant DNA technology and expressed heterologously in *Escherichia coli*. Later on, optimum temperature, pH and buffer solution was determined for biochemical characterization of the α -glucuronidase. Additionally, effects of some chemicals on the enzyme activity were also investigated. In conclusion, a novel thermophilic α -glucuronidase enzyme was produced as recombinant enzyme in order to use in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.

Keywords: Lignocellulosic biomass, α -glucuronidase, recombinant DNA, enzyme activity

ÖNSÖZ

Tez çalışması sırasında her türlü bilgi, teşvik ve deneyimleri ile yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yunus ENSARİ'e, teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitiminin her aşamasında yanımda olan, bana desteklerini ve inançlarını esirgemeyen, hayatımın her aşamasında olduğu gibi tezimin her aşamasında de varlığından güç aldığım annem Adalet ASLAN'a ve eşim Ahmet N. TAŞDEMİR' e teşekkür ederim.



Hilal TAŞDEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	IV
ABSTRACT	V
ÖNSÖZ.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
Sayfa	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.1.1. Lignosellüzik Biyokütle.....	1
1.1.2. Lignosellüzik Yapı Ve Ön İşlenmesi.....	2
1.1.3. Selüloz	5
1.1.4. Hemiselüloz	6
1.1.5. Lignin.....	7
1.1.6. Hemiselülitik Enzimler.....	7
1.1.6.1.Ksilenaz	8
1.1.6.2. Alfa- Glukuronidaz	8
1.1.6.3. Alfa- Galaktosidaz	9
1.1.6.4. Mannanaz.....	10
1.1.6.5. Asetilksilan – Esteraz.....	10
1.1.6.6. α -L- Arabinofuranosidaz.....	10
1.1.7. Endüstriyel Enzim Kaynağı Olarak Termofilik Bakteriler.....	11
1.2. Rekombinant DNA Teknolojisi	11
1.2.1 Hedef DNA Molekülünün Elde Edilmesi.....	13
1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	13

1.2.3. DNA'nın Vektöre Bağlanması (Klonlama)	15
1.2.3.1 Restriksiyon kesimi	16
1.2.3.2 Ligasyon (Moleküllerin Birbirine Bağlanması).....	16
1.2.4. Transformasyon	17
1.2.5. Protein Ekspresyonu (Gen ifadesi)	17
1.3. Çalışmanın Amacı	18
2. MATERYAL - YÖNTEM.....	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Çalışmada kullanılan <i>Escherichia coli</i> ırkları.....	19
2.1.2. Çalışmada kullanılan vektör	19
2.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	20
2.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	22
2.1.5. Çalışmada kullanılan kitler	22
2.1.6. Çalışmada kullanılan enzim setleri	23
2.1.7.Çalışmada Kullanılan Cihazlar	23
2.2. Yöntem.....	24
2.2.1. <i>Geobacillus kaustophilus</i> α -glukuronidaz geninin gen spesifik primerler ile çoğaltılması.....	24
2.2.2. α -glukuronidaz enziminin protein dizisi.....	24
2.2.3. DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi	25
2.2.4. Agaroz jelden DNA saflaştırma.....	26
2.2.5. Plazmit İzolasyonu.....	26
2.2.6. Restriksiyon kesimi ve ligasyon	27
2.2.7. Kompetent <i>E.coli</i> hücresi hazırlanması	28
2.2.8. Plazmit DNA'nın kompetent <i>E.coli</i> hücrelerine transformasyonu.....	29
2.2.9. Elde edilen klonların koloni PZR ile validasyonu	30

2.2.10. <i>Geobacillus kaustaphilus</i> α -glukuronidaz enziminin rekombinant protein olarak <i>E.coli</i> 'de İfadesi ve saflaştırılması.....	31
2.2.11. Proteinlerin SDS-PAGE ile analizi.....	33
2.2.12. BCA İle Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	33
2.2.13. α -glukuronidaz Enziminin Aktivite Tayini.....	33
2.2.14. α - glukuronidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	34
3.BULGULAR.....	36
3.1. <i>Geobacillus kaustaphilus</i> α - Glukuronidaz Geninin Klonlanması.....	36
3.1.1. <i>Geobacillus kaustaphilus</i> α - glukuronidaz geninin PZR ile amplifikasyonu	36
3. 2. α - Glukuronidaz Geninin Vektöre DNA' ya Aktarılması.....	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	50
5. KAYNAKÇA	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1: Lignoselülozik biyokütle enzimatik litik kompleksi	4
Şekil 1. 2: Ön işlem basamakları.....	5
Şekil 1. 3: Hemiselüloz degradasyonunda rol alan enzimlerin şematik organizasyonu ...	7
Şekil 1. 4: Rekombinant DNA teknolojisi basamakları	12
Şekil 1. 5: Plazmit Vektör Haritası	16
Şekil 2. 1: pQE30 vektörünün haritası	20
Şekil 3. 1. <i>Geobacillus kaustophilus</i> α - glukuronidaz proteininin NCBI conserved domain database (CDD) analizi.	36
Şekil 3. 2: α - glukuronidaz enziminin amplifikasyonu için gerçekleştirilen PZR işleminin agaroz jel analizi.....	37
Şekil 3. 3: α - glukuronidaz genin transformasyonu sonucu <i>E. coli</i> DH5 α hücreesindeki koloni görünümü	38
Şekil 3.4: α - glukuronidaz geni için koloni PZR analizinin agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 3. 5: α - glukuronidaz genine ait DNA dizi analizi sonuçlarının örnek görünümü.	40
Şekil 3. 6: α - glukuronidaz genine ait DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizinin BLAST analizi	41
Şekil 3. 7: α - glukuronidaz geninin transformasyonu sonucu <i>E. coli</i> BL21 hücreesindeki koloni görünümü	42
Şekil 3. 8: α - glukuronidaz enziminin SDS-PAGE analizi	43
Şekil 3. 9: BCA ile protein konsantrasyon tayini için BSA kullanılarak hazırlanan standart grafiği	44
Şekil 3. 10: α -glukuronidaz enziminin kolorimetrik aktivite tayininde kullanılmak üzere hazırlanan pNP standart grafiği.....	45
Şekil 3. 11: α -glukuronidaz enzim aktivitesi tayini için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi	46
Şekil 3. 12: α - glukuronidaz enziminin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi.....	47
Şekil 3. 13: α - glukuronidaz enziminin optimum pH ve tamponunun belirlenmesi	48
Şekil 3. 14: α - glukuronidaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi.....	48
Şekil 3. 15: α - glukuronidaz enzimine çeşitli kimyasalların etkisi	49

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. 1: Bazı tarımsal kaynakların ve atıkların lignoselüloz içerikleri	3
Tablo 2. 1: <i>E. coli</i> ırkları ve genotipleri	19
Tablo 2. 2 : <i>Geobacillus kaustaphilus</i> α -glukuronidaz geninin amplifikasyonunda kullanılacak primer dizileri.	24
Tablo 2. 3 : <i>Geobacillus kaustaphilus</i> α -glukuronidaz geninin amplifikasyonu reaksiyon koşulları.....	25
Tablo 2. 4 : <i>Geobacillus kaustaphilus</i> α -glukuronidaz geninin amplifikasyonu için gradient PZR sıcaklık koşulları	25
Tablo 2. 5 : Çift enzim restriksiyon kesim için reaksiyon şartları	27
Tablo 2. 6 : Tek enzim restriksiyon kesim için reaksiyon şartları	27
Tablo 2. 7: Ligasyon için reaksiyon şartları.....	28
Tablo 2. 8 : <i>Geobacillus kaustaphilus</i> α -glukuronidaz geninin koloni PZR şartları.....	30
Tablo 2. 9 : <i>Geobacillus kaustaphilus</i> α -glukuronidaz geninin koloni PZR ile validasyonunda kullanılan sıcaklık koşulları.	31

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μl : Mikrolitre
 μM : Mikromolar
 CO_2 : Karbondioksit
 CoCl_2 : Kobalt Klorür
 distH_2O : Distile su
DTT: Diklora difenil triklor etan
PNPAGA : 4-Nitrophenyl- α -D-glucuronide
 FeCl_3 : Demir (III) Klorür
 H_2O_2 : Hidrojen Peroksit
 H_2SO_4 : Sülfirik Asit
 HCl : Hidroklorik Asit
IPTG: İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
 K_2HPO_4 : Dipotasyum Fosfat
 KCl : Potasyum Klorür
 KH_2PO_4 : Mono Potasyum Fosfat
 MgCl_2 : Magnezyum Klorür
 MnCl_2 : Mangan (II) Klorür
 NaCl : Sodyum Klorür
 NAD^+ : Nikotinamid adenin dinükleotit
 NaOH : Sodyum Hidroksit
PZR : Polimer Zincir Reaksiyonu
UV: Ultraviole

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Küresel ekonomi için önemli olan fosil yakıtlar beraberinde sera gazı emisyonu ve hava kirliliği gibi çeşitli çevre sorunlarına sebep olmaktadır (Lee ark., 2012; Sindhu ark., 2016). Bununla birlikte mevcut fosil kaynakların tükenmesi ve dengesiz arz talep ilişkisi günden güne fosil kaynaklı yakıtların fiyatlarının artması ile sonuçlanmaktadır (Sindhu ark., 2016). Fosil yakıtların birçok dezavantajı olmasından dolayı alternatif yollar geliştirilmiştir. Birçok ülkede yakıt üretimi için tasarlanmış biyolojik fabrikalar mevcuttur. Bu fabrikalar çevre kirliliğini ortadan kaldırmayı ve fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmayı hedefleyen bir oluşumdur (Kulyashov ve ark., 2020).

Ülkelerin artan nüfusu ve yaşanan ekonomik büyüme nedeniyle enerji ihtiyacı ve talebi günden güne artmaktadır. Bu talep beraberinde çevre kirliliği ve enerji kıtlığı gibi sorunları ortaya çıkarmaktadır. Bu sorunlar için alternatif çözüm yenilenebilir enerji kaynaklarıdır. Bu kaynakların başında da lignoselülozik biyokütle gelmektedir (Wu ark., 2020).

1.1.1. Lignosellüzik Biyokütle

Orman atıkları ve tarımsal atıklar gibi lignoselülozik bileşenler yıllık 200 milyar tonluk verimle doğada en bol bulunan doğal biyokütleyi oluşturmaktadır. Son yıllarda, enerji üretimi için hammadde olarak lignoselülozik biyokütlenin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Bu durumun en önemli nedenleri fosil yakıt kaynaklarının tükenmesi ve iklim değişikliklerinin olmasıdır (F. Wang ve ark., 2021).

Tarım endüstrisinde birçok farklı tarımsal ürün büyük miktarlarda yetiştirilmekte ve tarımsal ürünlere bağlı olarak eşit oranda tarımsal atık elde edilmektedir (Østby ve ark., 2020). Bu atıklar gıda, kimya ve ilaç sektörü gibi birçok alanda kullanıldığı için bu tip atıklara olan ilgi artmaktadır. Lignosellülozik biyokütle yenilenebilir bir biyopolimerdir ve bu biyopolimerlere karşı artan ilgi ve isteklilik yeni biyoürünlerin geliştirilmesine

imkan sağlamaktadır. Lignoselülozik biyokütle tarımsal atıklar (hurma gövdesi, buğday samanı, mısır koçanı, hindistan cevizi kabuğu, şeker kamışı küspesi, meyve posaları), orman artıkları (sert ve yumuşak odunlar), enerji bitkileri (dallı darı), gıda atıkları ve şehir ile endüstri atıklarından (atık kağıt vb.) oluşmaktadır (Lee ve ark., 2014).

Tarım endüstrisi sonucu üretilen lignoselülozik yapıların bozunabilir olması ekonomik açıdan büyük öneme sahiptir (Martins ve ark., 2020). Lignoselülozik biyokütle artan enerji ihtiyacına karşı enerji verimliliği ve çevre açısından sürdürülebilir bir kaynaktır. Lignoselülozik biyokütleyle ulaşımın bu denli kolay olması biyokütleyi taşıma amaçlı yakıt ve diğer kimyasalların üretimi için önemli bir kaynak haline getirmektedir (Lee ve ark., 2014).

1.1.2. Lignoselülozik Yapı Ve Ön İşlenmesi

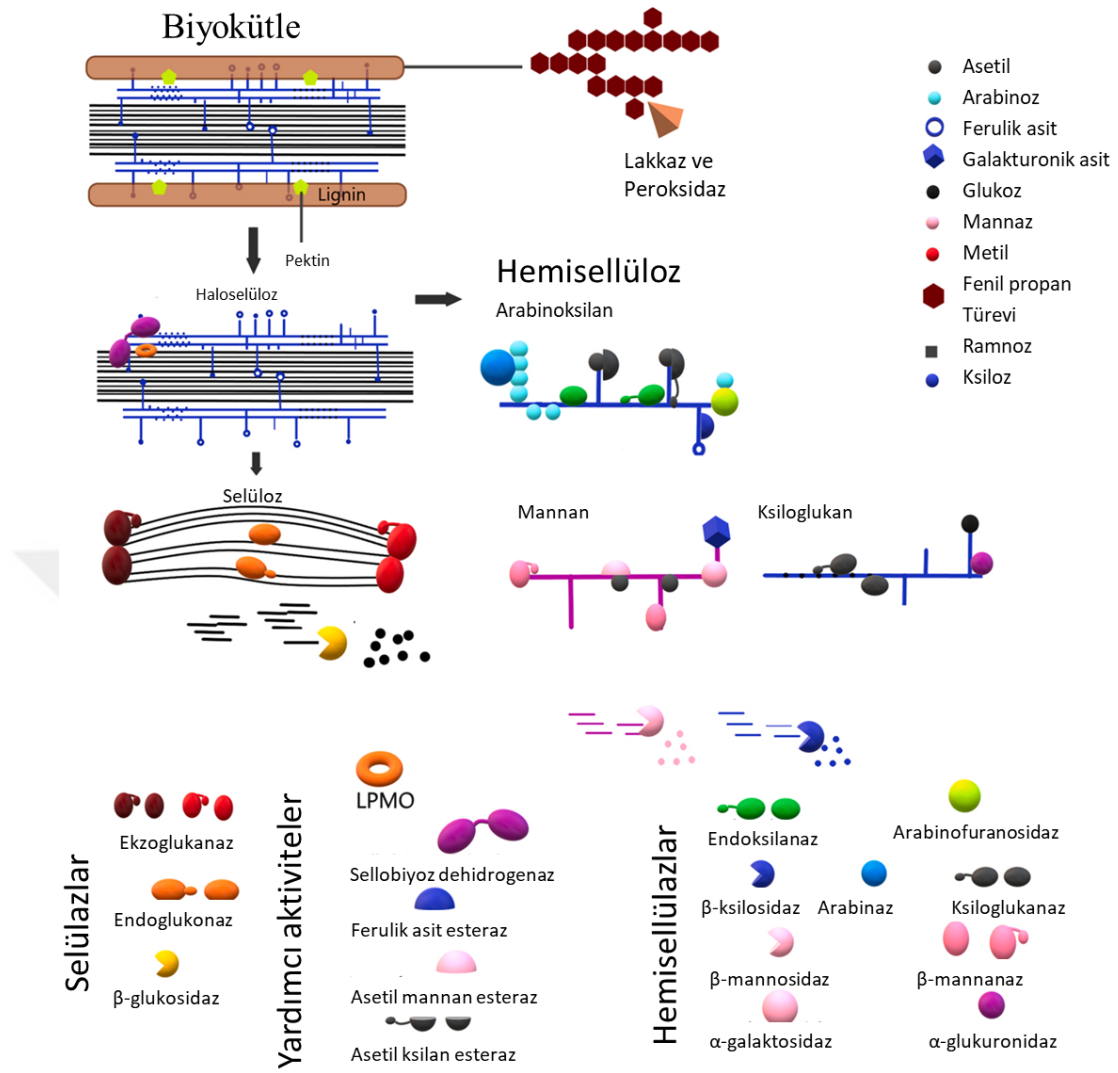
Lignoselülozik biyokütle gezegenimizde en bol bulunan kaynaktır ve her yıl 40 milyon tondan fazla gıda ve yem olarak kullanılmayan bitkisel materyal üretilmektedir. Bunlara ek olarak orman ve tarım faaliyetlerinden elde edilen atıklarla birlikte bu rakam yaklaşık olarak 200 milyar tona ulaşmaktadır (Jaramillo ve ark., 2015). Lignoselülozik biyokütle temel olarak selüloz (%40-50), hemiselüloz (%30-40) ve ligninden (%20-40) oluşmaktadır (Çöpür ve ark., 2011).

Lignoselülozik materyal olan ürünlerin içerdikleri selüloz oranları incelendiğinde ağaç kabuğu %20-30, bambu %40-50, odun %40-50, hasır %80- 90, keten %95-99, oranında selülozdan oluştukları görülmüştür (Tablo 1.1) (Var, 2019).

Tablo 1. 1: Bazı tarımsal kaynakların ve atıkların lignoselüloz içerikleri (Var, 2019)

Lignoselülozik Materyaller	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Sert ağaç sapı	40-55	24-40	18-25
Yumuşak ağaç sapı	45-50	25-35	25-35
Fındık kabuğu	25-30	25-30	25-35
Mısır koçanı	45	35	15
Kağıt	85-99	0	0-15
Buğday samanı	30	50	15
Pirinç samanı	32,1	24	18
Yaprak	15-20	80-85	0
Keten tohumu	80-95	5-20	0
Gazete kağıdı	40-55	25-40	18-30
Kimyasal kağıt hamurundan gelen kağıt atığı	60-70	10-20	5-10
Ön atıksu katıları	8-15	-	24-29
Küspe	33,4	30	18,9
Domuz atığı	6	28	-
Katı sığır gübresi	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Ot	25	35,7	6,4
Çimen	45	31,4	12

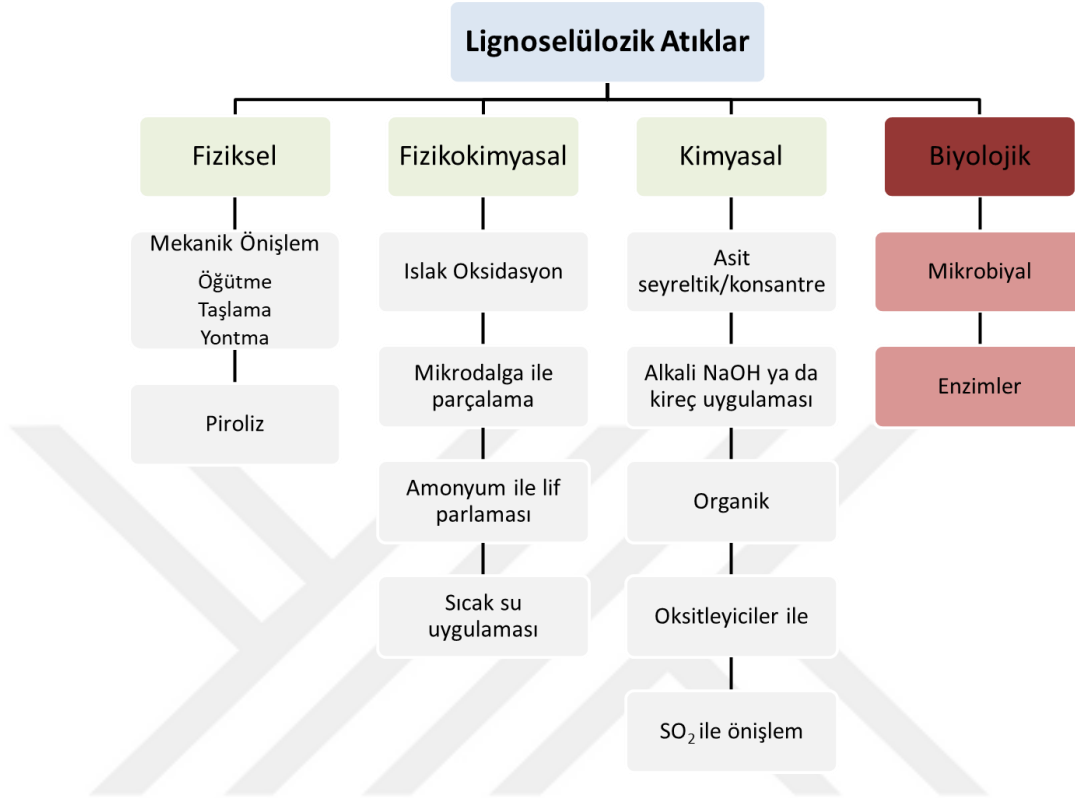
Lignoselülozik biyokütle günümüzde birincil olarak biyoetanol üretiminde kullanılmakla birlikte enzim, gıda katkıları, farmasötik ve kozmetik kimyasallar gibi çeşitli ürünlerin üretilmesinde de kullanılabilir (Jaramillo ve ark., 2015; Maitan-Alfenas ve ark., 2015; Arevalo-Gallegos ve ark., 2017). Lignoselülozik biyokütlenin katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülebilmesi için yapısında bulunan basit şekerlerin açığa çıkarılması gerekmektedir (Şekil 1.1.). Biyokütlenin kompleks yapısı bu işlemi oldukça zorlu hale getirmektedir (Ezeilo ve ark., 2017).



Şekil 1. 1: Lignoselülozik biyokütle enzimatik litik kompleksi (Martins ve ark., 2020).

Lignoselülozik biyokütleden yakıt ya da diğer ürünlerin üretimi; ön işlem, hidroliz ve fermentasyon olmak üzere üç ana basamaktan oluşmaktadır (Madadi ve ark., 2017). Ön işlem glukoza erişmek için lignoselülozik yapının sertliğini kırar, enzimatik hidroliz de ise selülitik ve hemiselülitik enzimler kullanılır (Toor ve ark., 2020). Biyokütlenin kimyasal ön işlemi genellikle bir asidik veya alkali ortamda yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir (Ariaenejad ve ark., 2020). Ön muamele yöntemleri dört gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.2). Bunlar, kimyasal, biyolojik, fizikokimyasal ve fiziksel ön işlemlerdir. Lignoselülozik biyokütlenin biyolojik ön işlenmesinde mikroorganizmalar

doğrudan kullanılabilirdiği gibi bu mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tek tek ya da çeşitli kombinasyonları da kullanılabilir (Deveci ve ark., 2019).



Şekil 1. 2: Ön işlemler basamakları (Deveci ve ark., 2019).

1.1.3. Selüloz

Selüloz, lignoselülozun çekirdek kısmını oluşturur (Huang ve ark., 2017). Selüloz, kovalent olarak D-anhidroglukopiranoz birimlerinden oluşan doğrusal bir polimerdir (F. Wang ve ark., 2021). Selüloz homopolimer olarak kabul edilir, çünkü analiz edildiğinde yapısının % 95'ten fazla glikozdan oluştuğu görülür. Selülozlar bu nedenle doğrusal bir homopolimerdir (Huang ve ark., 2017). Lignoselülozik biyokütle, genellikle %50-80 oranında C6 ve C5 içeren kompleks karbonhidratlara sahiptir (Toor ve ark., 2020).

Lignoselülozun tam anlamda enzimatik hidrolizinin gerçekleşebilmesi için birçok selülotik ve hemiselülotik enzime ihtiyaç duyulmaktadır ve selülozun hidrolizi için kullanılan selülazlar; **1)** selüloz zincirini orta kısımdan parçalayarak selülozun

polimerizasyon derecesini düşüren ve selülozu oligosakkaritlere parçalayan endoselülazlar, **2)** selüloz zincirinin uç kısımlarını hidrolizleyen ekzoselülazlar, **3)** sellobiyoz ve çözünür dekstrin yapısındaki D-glukoz birimlerinin salımını katalizleyen β -glukozidazları içermektedir (Xu ve ark., 2007; Suwannarangsee ve ark., 2012; Van Dyk ve ark., 2012; Hong ve ark., 2007).

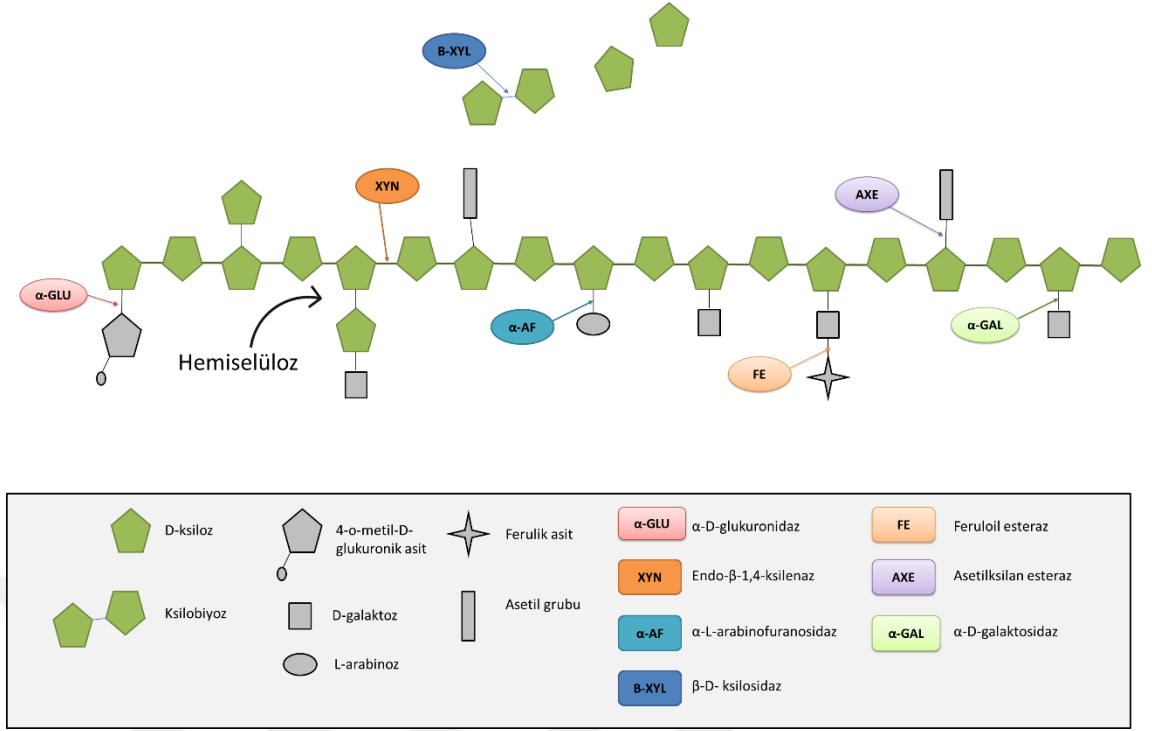
1.1.4.Hemiselüloz

Hemiselüloz lignosellülozik yapının ikincil bileşenidir ve bitkiler hemiselüloz açısından oldukça zengindir. Hemiselülozlar çeşitli heteropolisakkarit bileşiklerdir (Abo ve ark., 2019). Hemiselüloz yenilenebilir potansiyeli yüksek ve sürdürülebilir enerji kaynağıdır (Huang ve ark., 2017). Hemiselülozlar lignosellülozik bitkilerde yapısal bir role sahiptir. Hemiselüloz, selüloz ve lignin arasında bağlantıyı sağlar. Selülozdan farklı olarak, hemiselülozlar çeşitli heteropolisakkarit bileşiklerdir (Abo ve ark., 2019).

Hemiselüloz: Şeker grubu olan, heksozlar; mannoz, glukoz ve galaktoz, pentozlar; ksiloz ve arabinoz aynı zamanda şeker asitleri; metil-glukuronik asit gibi içinde bulunan ana şeker kalıntılarına göre sınıflara ayrılmıştır (Malgas ve ark., 2019). Hemiselüloz zinciri selüloza göre çok daha kısadır ve polimerizasyon yoğunluğu daha düşüktür (F. Wang ve ark., 2021).

Hemiselüloz yapının (Şekil 1.3) parçalanmasında temel olarak endoksilenaz ve β -ksilosidaz enzimi görev almakla birlikte hemiselüloz yapıda bulunan yan zincirlerin hidrolizinde yardımcı enzimler olarak adlandırılan α -L-arabinofuranozidaz, **α -glukuronidaz**, α -galaktozidaz, asetilksilan esteraz ve β -mannanaz gibi enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır (Xu ve ark., 2007; Suwannarangsee ve ark., 2012; Van Dyk ve ark., 2012; Hong ve ark., 2007).

Hemiselüloz içerisinde glukuronik asidin yan grup şeklinde yer alması hemiselülozun enzimatik hidrolizini kısıtlayan etmenlerden biridir. Bu durum birçok endüstriyel sürecin gelişimini geçiktiren aşılması zor bir teknolojik bariyer haline gelmiştir. Tek bir yardımcı enzimin lignosellülozların kısmen düşük maliyetli ham maddelerin kullanımı için yeni ve ilgi çekici bir alternatif sağlamaktadır.



Şekil 1. 3: Hemiselüloz degradasyonunda rol alan enzimlerin şematik organizasyonu (Berlin, 2013).

1.1.5. Lignin

Lignin, doğada en bol bulunan üçüncü polimerdir, selüloz ve biyosentezlenmiş aromatiklerin tek grubudur (Abo ve ark, 2019; F. Wang ve ark., 2021). Oldukça karmaşık bir doğal polimer olarak lignin öncelikle üç tipik hidroksifenilpropanoidden monolignoller olarak bilinir ve bunlar; *p*-kumaril, koniferil ve sinapil alkoller olan aromatiklerdir (Sun, 2020). Lignin hemiselülozlarla çapraz bağlı olarak, bitkilerde yaygın olarak bulunur. Kimyasal ürün ve yakıt üretmek için hammadde olarak kullanılan bir depolimerizasyon yapısıdır (F. Wang ve ark., 2021).

1.1.6. Hemiselülitik Enzimler

Lignoselüloz biyokütlenin yapısında ksiloz, galaktoz, glukuronik asit gibi şeker moleküllerinin hemiselüloz zincirinde bulunması selülozun doğrudan hidrolizinde

önemli bir engel oluşturmaktadır. Bu sebeple yukarıda belirtildiği gibi lignoselülozik biyokütlenin enzimatik degradasyonunda hemiselüloolitik enzimler oldukça önemlidir.

1.1.6.1.Ksilenaz

Selüloz ve hemiselüloz biyokütlenin ana bileşenleridir ve lignosellülozik biyokütle doğrusal olan ksilanın bozunması, hemiselülozdaki polisakaritler, kullanımına büyük katkı sağlayacaktır. Ksilenazlar ksilan iskeletindeki β -1,4 bağlarını rastgele olarak kırarak ksilani ksiloza parçalar. Ksilenazlar temel olarak GH ailelerinden 10 ve 11 içerisinde yer alır (Xing ve ark., 2021). Özel katalizleme özelliği nedeniyle, ksilenazlar endüstriyel açıdan önemli enzimler olarak sınıflandırılırlar ve birçok farklı endüstride geniş kullanıma sahiptirler (Hu ve ark., 2020). Ksilenazların lignoselülozik biyokütlenin enzimatik degradasyonuna ek olarak, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kağıt hamuru ağartma için kullanım potansiyeline sahiptir (Seemakram ve ark., 2020). Ayrıca ksilenaz tekstil, hayvan yemi, gıda işletmelerinde ve tarım endüstrilerinde kullanılmaktadır (Amobonye ve ark., 2021). Bunlara ek olarak ksilenaz aktivitesi sonucu elde edilen ksilooligosakkaritler (XOS) antioksidan, antialerjik, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir (Dong ve ark., 2020).

1.1.6.2. Alfa- Glukuronidaz

Glukuronik asit ya da metil-glukuronik asit sert odunların, koniferlerin ve birçok tahılın yapısında bulunan ksilana bağlı olarak bulunmaktadır. Bu nedenle glukuronoksilanların tamamen kullanılabilmesi için bağlı bulunan glukuronik asit ve türevlerini ksilandan uzaklaştıran glukuronidazlara (E.C. 3.2.1.131) ihtiyaç vardır (Wang ve ark., 2016). Glukuronidazlar glukozid hidrolazlar arasında GH4, GH67 ve GH115 aileleri içerisinde sınıflandırılır (Wang ve ark., 2016; Ragowski ve ark., 2014). Bazıları yalnızca kısa ksilooligomerler ya da küçük model moleküller üzerine aktivite gösterirlerken diğerleri polimerik ksilandan glukuronik asitin hidrolizini gerçekleştirir (Adıgüzel, 2013).

Glukuronik asit ve 4-O-metil-glukuronik asit (GlcA / MeGlcA), sert ağaçlar, koniferler ve birçok tahıl tanesinin yapısındaki ana ksilan zincirlerinde bulunur (Yan ve ark., 2017). GH115 ailesinde bulunan α -glukuronidazlar ksilan ve ksilooligosakkaritlerdeki α -D-(4-O-metil) glikopiranosüluronik asidi (Me) GlcA) koparır (Chong ve ark., 2015). GH67 ve GH115 ailelerinde bulunan glukuronidaz enzimlerini kodlayan genler tanımlanmıştır (Martínez ve ark., 2016).

α -glukuronidazlar (EC 3.2.1.139) ksilooligosakkaritlerin yapısında yer alan α -D glukuronik asit (GlcA) ya da 4-o-metil eter formu (MeGlcA) ile d-ksiloz birimleri arasındaki α -1,2 glikozidik bağın hidrolizini katalizlemektedir. Bu bağın hidrolizini katalizleyen α -glukuronidazların büyük çoğunluğu glikozit hidrolaz 67 (GH67) ailesinde yer almaktadır. (Septiningrum ve ark., 2015). Glikozit hidrolazlar amin asit dizisi benzerliklerine göre gruplanır (Aalbers ve ark., 2015). 4-O-metil glukuronik asit bileşenlerinin varlığı, ksilan zincirinin adsorbsiyonunu etkileyen ana faktörlerden biridir ve ksilanın α -glukuronidaz ile muamele edilmesi ksilanın adsorbsiyon seviyesini kayda değer ölçüde arttırmaktadır (Chimphango ve ark., 2016).

Ksilanların yapısal olarak çeşitli birimleri içermesi nedeniyle, ksilanın karmaşık hidrolizinde endoksilenazlar ve β -ksilosidazlar ile birlikte α -glukuronidazlar, α -L-arabinofuranosidazlar, asetil ksilan esterazlar, feruloil esterazlar ve glukuronil esterazlar birlikte rol almaktadır (Mohapatra ve Manoj, 2019).

1.1.6.3. Alfa- Galaktosidaz

α -galaktosidazlar (EC 3.2.1.22) galaktooligosakkaritler, galaktomannanlar, galaktolipitler gibi farklı substratlardan α -1,6 bağlı terminal galaktoz birimlerinin hidrolizini katalizlemektedir. Amino asit dizi benzerliklerine göre α -galaktosidazlar GH4, 27, 36, 57, 97 ve 110 aileleri olmak üzere alt farklı glikozit hidrolaz ailesi içerisinde sınıflandırılırlar. Bitki, bakteriler ve mantarlarda farklı α -galaktosidazlar bulunmasına rağmen çoğunluğu GH27 ya da GH36 sınıfı içerisinde yer almaktadır (Coconi Linares ve ark., 2020).

1.1.6.4. Mannanaz

Yumuşak odunlu bitkilerde, meyvelerde ve tohumlarda hemiselüloz yapısı mannan formunda bulunmaktadır. Mannan bitkilerde farklı dört şekilde bulunur. Bunlar; lineer mannan, galaktomannan, glukomannan ve galaktoglukomannandır. Mannan yapısının hidrolizinde temel olarak β -mannanaz enzimi görev almaktadır (Hettiarachchi ve ark., 2019; Dawood ve ark., 2020). Endo- β -1,4 mannosidaz mannan içeren substratlardaki 1,4- β -D mannozidik bağın kırılmasını katalizler ve sonuç olarak kısa manno oligosakkaritler açığa çıkar (Liu ve ark., 2018). β -mannanazların lignoselülozik biyokütle hidrolizine ek olarak kağıt, yem, gıda, deterjan endüstrilerinde de kullanımı bulunmaktadır (Zhu ve ark., 2020).

1.1.6.5. Asetilksilan – Esteraz

Sert ağaçlardaki başlıca hemiselüloz asetil glukuronoksilan'dır. β -1,4-bağlı ksilopiranosil (Xylp) ana zincirine sahip polisakkarit %10'u 4-O-metil-a-D-glukopiranosil taşıyan kalıntılardır (Puchart ve ark., 2020). Asetilksilan esteraz lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizinde oldukça önemli bir role sahiptir. Bu enzim ksilan zincirine bağlı halde bulunan asetik asit birimlerini uzaklaştırır ve böylece ksilanaz enziminin ksilan zinciri üzerinde aktivite göstermesine yardımcı olur (Morana, 2017). Endüstride de kullanılan ucuz ve çevreye zarar vermeyen bir enzimdir (Y. Wang ve ark., 2018).

1.1.6.6. α -L- Arabinofuranosidaz

α -L-arabinofuranosidazlar (EC 3.2.1.55) çeşitli bitkilerin yapısında bulunan arabinoksilan, arabinogalaktan ve arabinanların yapısında bulunan L-arabinoz birimlerinin salınımını katalizler. Bu enzim lignoselülozik biyokütlenin tam olarak hidrolizlenebilmesi için diğer hemiselüloolitik enzimler ile sinerjistik şekilde çalışmaktadır. Buna ek olarak α -L-arabinofuranosidazlar hayvan yemlerinde sindirilebilirliği artırma, kağıt sanayisinde delignifikasyon ve meyve sularının berraklaştırılmasında da kullanılmaktadır (Morana, 2017)

1.1.7. Endüstriyel Enzim Kaynağı Olarak Termofilik Bakteriler

Birçok endüstriyel ve biyoteknolojik sürecin oldukça sert koşullarda gerçekleştiği düşünüldüğünde yüksek sıcaklık, yüksek basınç, düşük/yüksek pH, gibi uç koşullarda yaşayan ekstremofilik mikroorganizmalar bu tip süreçlerde kullanılacak yeni enzimler için oldukça büyük ve çalışılması gereken bir kaynaktır (Demirjian ve., 2001; van den Burg ve ark., 2003).

Oldukça ekstrem koşullarda aktivite gösterebilen enzimlerin keşfiyle birlikte yeni endüstriyel süreçlerin gelişmesi mümkün olmuştur (Demirjian ve ark., 2001). Örneğin lignoselülozik biyokütlenin dönüşüm işlemi genelde 50 °C'nin üzerinde gerçekleşen bir işlemdir ve bu sebeple de dönüşüm sürecinde termal stabilitesi yüksek olan termofilik enzimlerin kullanımının daha avantajlı olduğu söylenilebilir (Moraes ve ark., 2010).

Genel olarak termofilik enzimler (60-85 °C arasında optimum aktivite gösterirler) yüksek spesifik aktiviteye sahip olduklarından, biyodönüşüm sürecinde az miktarda enzim ile işlem tamamlanabilir. Stabiliteleri yüksek olduğundan uzun süre kullanılabilirler. Ayrıca dönüşümün yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesiyle daha iyi bir substrat çözünürlüğü ve enzim penetrasyonunun yanı sıra daha düşük kontaminasyon sağlanmaktadır (Turner ve ark., 2007).

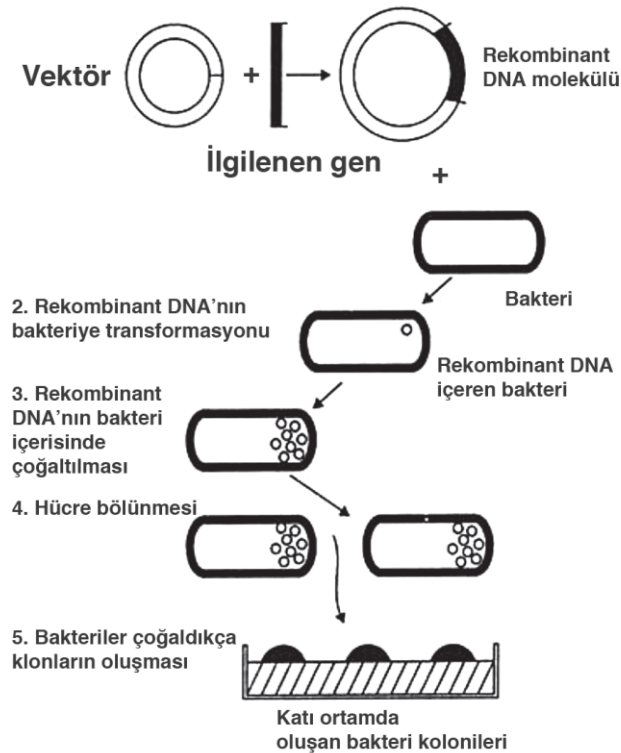
Günümüzde endüstride ve diğer alanlar da kullanılan birçok enzimin kaynağını ekstrem koşullarda yaşayan organizmalar oluşturmakta ve bu enzimlerin kullanıldığı pazar her geçen gün büyümektedir. Termofilik mikroorganizmalar endüstriyel ve biyoteknolojik potansiyele sahip olmasından dolayı ilgi görürler. Örneğin lignoselülozik biyokütleyi etkin bir şekilde parçalayabilen bir termofilik bakteri biyoyakıt üretiminde kullanılmıştır (Jiang ve ark., 2017).

1.2. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinat DNA, bir türün genlerini veya DNA'sını diğer bir türün genleri veya DNA'sı ile birleştirmesi işlemine verilen isimdir (Huda ve Öner, 1997). Rekombinant DNA teknolojisi sonucu elde edilen DNA molekülüne kısaca verilen isim rDNA'dır (Firidin,

2010). Rekombinant DNA teknolojisi DNA ile ilgili bazı enzimlerin fonksiyonlarının anlaşılmasıyla birçok yöntemi kullanılabilir kılmıştır. Temelde genetik çeşitliliği sağlayan durumları yapay şekilde de gerçekleştirmeyi sağlamaktadır (Şahin, 2013). Kısaca DNA üzerindeki birçok uygulamayı kapsamaktadır (Gülnaz, ve ark.,2017). Rekombinant DNA teknolojisi ilk olarak elzem proteinlerin üretiminde kullanılmaya başlanmıştır (Huda ve Öner, 1997).

Rekombinant DNA teknolojisi amaçlanan genin fazla miktarlarda üretimi ya da genin ifade edilmesine olanak sağlamaktadır. Rekombinant DNA molekülü istenilen gen bölgesini kapsayan DNA molekülü ile plazmit DNA molekülü olmak üzere iki temel kısımdan oluşur. Rekombinant DNA teknolojisinin basamakları Şekil 1.4'te gösterilmiştir (Soydemir ve Aksoy, 2017.). Rekombinant DNA teknolojisi temel olarak hedef genin eldesi, genin vektör DNA'ya klonlama işlemi, rDNA'nın konak hücreye aktarılması ve protein ifadesi adımlarını içermektedir (Griffiths ve ark., 1999a).



Şekil 1. 4: Rekombinant DNA teknolojisi basamakları (Soydemir ve Aksoy, 2017.).

1.2.1 Hedef DNA Molekölünün Elde Edilmesi

Rekombinant DNA teknolojisinde ilk olarak, çoğaltılmak istenen ya da protein olarak ifade edilmek istenen hedef DNA molekülünün elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda ilgili organizmadan genomik DNA (gDNA) izolasyonu gerçekleştirilir. Rekombinant DNA teknolojisinin ilk yıllarında hedef genlerin eldesinde restriksiyon enzimleri ile gDNA kesilirken daha sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) keşfi ve DNA dizi analizi yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte genlere spesifik oligonükleotid primerler kullanılarak PZR vasıtasıyla doğrudan hedef genler çoğaltılabiliştir. Ancak son yıllarda sentetik biyolojinin gelişmesiyle birlikte, hedef genler ifade edilmek istenen konak organizmaya spesifik olarak kodon uyumlu şekilde ticari olarak sentezlenmekte ve klonlama için gen kaynağı olarak sentetik genler kullanılmaktadır.

1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA'nın uzunluğu belli, istenilen bölgesinin hücre dışı bir ortamda fazla miktarda çoğaltılması işlemine Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) denir. DNA dizisi derişimi her PZR adımında logaritmik olarak artarmaktadır (Karataş, 2015). Kısaca PZR aracılığıyla nükleik asitler *in-vitro* koşullarda çoğaltılmaktadır. PZR sıcaklığa bağlı olarak tekrarlanan üç aşama içerir. Bunlar:

1. Denatürasyon: 94–98 °C arasında gerçekleşir. Sarmal DNA'nın ikili yapısını bir arada tutan hidrojen bağlarını kırarak molekülün denatüre olmasını sağlar.
2. Annealing (bağlanma): 50-60 °C arasında gerçekleşir. Her bir oligonükleotid primerin komplementer olduğu kalıp DNA'ya bağlandığı adımdır.
3. Extansion (uzama): 72 °C gerçekleşir. Yeni bir DNA'nın oluştuğu bölümdür (Brown, 2020).

Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşmesi için çeşitli bileşenlere ihtiyaç vardır. Bunlar kalıp DNA, oligonükleotid primerler, nükleotidler (dNTPler), tampon çözeltisi, MgCl₂ ve DNA polimeraz enzimidir.

Kalıp DNA;

Amplifikasyonu hedeflenen DNA bölgesini üzerinde bulunduran DNA molekülüdür. PZR’de kalıp DNA olarak plazmidler, gDNA, DNA fajlar ve birçok genler kalıp olarak kullanılabilir. PZR’de kalıp olarak DNA’nın kullanılırken, bazı durumlarda RNA’da kullanılabilir.

DNA Polimerazlar;

DNA polimerazlar yeni DNA zincirlerinin sentezini katalizler. PZR’de ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimleri kullanılmaktadır. DNA polimeraz enzimi sentezi gerçekleştirebilmek için oligonükleotid primerlere ihtiyaç duyar. 5’ uçtan 3’ uca doğru, primerin serbest 3’ hidroksil ucuna ortamdaki dNTP’lerin nükleofilik etkisiyle, fosfodiester bağlarının oluşumunu katalizler ve böylece yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanmış olur. Klasik PZR reaksiyonlarında yaygın olarak *Thermus aquaticus* DNA polimeraz (Taq) kullanılmakla birlikte etkinliği ve doğruluğu arttırılmış yeni nesil DNA polimeraz enzimleri de sıklıkla kullanılmaktadır.

Primerler;

Primerler çoğaltılacak olan hedef diziye spesifik kısa tek iplikli DNA parçalarıdır. DNA polimeraz enziminin DNA zincirinin sentezi için ihtiyaç duyduğu 3’ serbest OH grubunu sağlar.

dNTP Karışımı;

Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yeni DNA zincirinin sentezinde yapı taşı olarak görev almaktadır. dNTPler saflığı yüksek, tekli veya dörtlü karışım şeklinde bulunurlar.

Tamponlar ve Magnezyum;

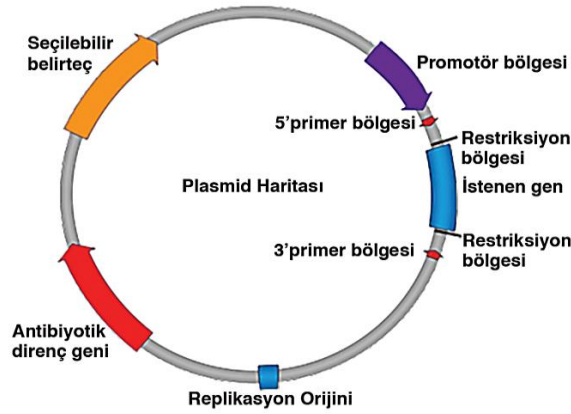
Tamponlar, DNA polimeraz enzimin reaksiyon katalizi için ihtiyaç duyduğu optimum koşulları sağlar. DNA Polimeraz enzimlerinin aktivite göstermesi için kofaktör olarak magnezyum iyonuna ihtiyaç duyarlar.

PZR, klonlama, genetik hastalık araştırılmasında, adli tıpta, mutasyonların belirlenmesinde, hedef gen bölgesi ve dizi analizi gibi birçok alanda yararlanılır (Gülnaz, ve ark., 2017). PZR birçok alanda kullanılırken farklı reaksiyon çeşitlerinden yararlanılır.

- a. Kantitatif PZR (eş zamanlı, gerçek zamanlı PZR): Klasik zincir reaksiyonunun eş zamanlı olarak başlangıç DNA miktarının hesaplandığı şeklidir (Karataş, 2014).
- b. Katı fazlı PZR: Genel olarak yüzeye sabitlenmiş DNA teknolojisinde kullanılır.
- c. Çoklu PZR: Kalıp olarak kullanılan DNA dizisini çoğaltmak için aynı reaksiyon içerisine birden fazla primer çifti ekleyerek çoğaltma işlemi yapılmaktadır.
- d. Touch down PZR: Çoğalması istenmeyen DNA dizisine engel olmak için kullanılır.
- e. Hot start PZR: Kullanılan solüsyonlardan doğan orjinal olmayan bağlamalardan doğan istenmeyen DNA dizilimini oluşmamasını sağlar.
- f. Yuvalanmış PZR (Nested) : 2 adet zincir reaksiyonunu kapsar. İlk reaksiyon dış primer kullanarak bir bölgenin çoğalmasını sağlarken. Diğerisi ise iç kısma bağlanarak daha küçük bölgelerin çoğalmasını sağlar.
- g. Asimetrik PZR: DNA çift sarmalının bir tanesinin çoğalmasını sağlar (Karataş, 2014)

1.2.3. DNA'nın Vektöre Bağlanması (Klonlama)

Klonlama ve gen ifadesi çalışmalarında vektör DNA molekülü olarak plazmitler çok fazla kullanılmaktadır. Plazmitler; maya, bakteri ve bazı ökaryotik canlılarda bulunmaktadır. Plazmitler konak hücre genomundan bağımsız şekilde kendini replike edebilen halkasal ekstra kromozomal DNA molekülleridir (Soydemir ve Aksoy,2017).



Şekil 1. 5: Plazmit Vektör Haritası (Soydemir ve Aksoy,2017)

İfade edilmesi ya da klonlanması hedeflenen DNA'nın vektöre bağlanması için ilk olarak restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve sonrasında ligasyon işlemi ile plazmit DNA'ya aktarım işlemi gerçekleştirilir.

1.2.3.1 Restriksiyon kesimi

Nükleik asitleri parçalayan enzimlere nükleazlar denir. (Karataş, 2014). Restriksiyon endonükleazlar, çift sarmallı kısa DNA dizilerini tanıyan ve bu yapıların içindeki belirli bölgeleri keserek, DNA'dan bir genin ya da geni taşıyan DNA dizisinin çıkarılmasında aktif rolü olan enzimlerdir (Kolören, ve ark., 2017). DNA'yı belirli dizilerden kesen enzimler DNA yönlendirmeleri için anahtar görevindedir. Bazı restriksiyon enzimleri küt uçlar bazıları da anahtar kilit ilişkisi ile yapışkan uçlar meydana getirirken oluşturmaktadırlar (Kuk ve Erensoy, 2008). Gen klonlama çalışmalarında yaygın olarak yapışkan uç oluşturan restriksiyon enzimleri tercih edilmektedir. Restriksiyon kesim işlemi hem hedef DNA molekülü hem de plazmit DNA molekülü için gerçekleştirilir ve böylece her iki DNA molekülü de aynı yapışkan uçlara sahip olur.

1.2.3.2 Ligasyon (Moleküllerin Birbirine Bağlanması)

İki DNA molekülünün bir araya getirilip fosfodiester bağı kurarak kovalent olarak birbirlerine bağlanması işlemine ligasyon denir (Karataş, 2014). Fosfodiester bağları kuran enzim DNA ligaz enzimidir (Karataş, 2015).

1.2.4. Transformasyon

Yabancı DNA'nın hücre zarından geçip başka bir konak hücrenin içine alınmasıdır. Transformasyonda yabancı DNA moleküllerini hücre içerisine almaya yetenekli olan hücrelere kompetent hücre denir (Brown, 2020). Hücreler çeşitli kimyasallar ile kompetent hale getirilirler. Transformasyon işlemi ligasyon sonucu oluşan rekombinant plazmit DNA'nın kompetent hücrenin içerisine sokulması işlemidir. Transformasyon işlemi ısı şoku ile yapılabileceği gibi elektroporasyon gibi farklı yöntemlerle de gerçekleştirilebilir. Transformasyon işlemi sonrasında hücreler antibiyotikli ortamda inkübe edilirler ve sonuçta rekombinant DNA molekülünü içeren koloniler elde edilmektedir (Karataş, 2015). Transformasyonda birçok koloni elde edilir, burada bu kolonilerden hangisinin hedef DNA'yı içerdiği tespit edilir (Şahin, 2013). Bunun için transformasyon sonucu pozitif klonlar seçilerek dizi tayini yapılır.

1.2.5. Protein Ekspresyonu (Gen ifadesi)

Gen ifadesi veya ekspresyonu, yukarıda anlatıldığı şekilde bir plazmit DNA molekülüne klonlanan genlerin, fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesine verilen isimdir (Brown, 2020). İfade sonrası elde edilen rekombinant proteinler sıklıkla ifade vektörü üzerinde bulunan takı proteini yardımıyla saflaştırılırlar ve çalışmanın hedefine bağlı olarak saf proteinler daha ileri analizlerde kullanılırlar.

1.3.Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında termofilik bir bakteri olan *Geobacillus kaustophilus* genomunda kodlanan α -glukuronidaz enzimini kodlayan genin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *E.coli*'ye aktarılması, rekombinant protein olarak ifadesi ve elde edilen enzimin biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması amaçlanmaktadır.



2. MATERYAL - YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* ırkları

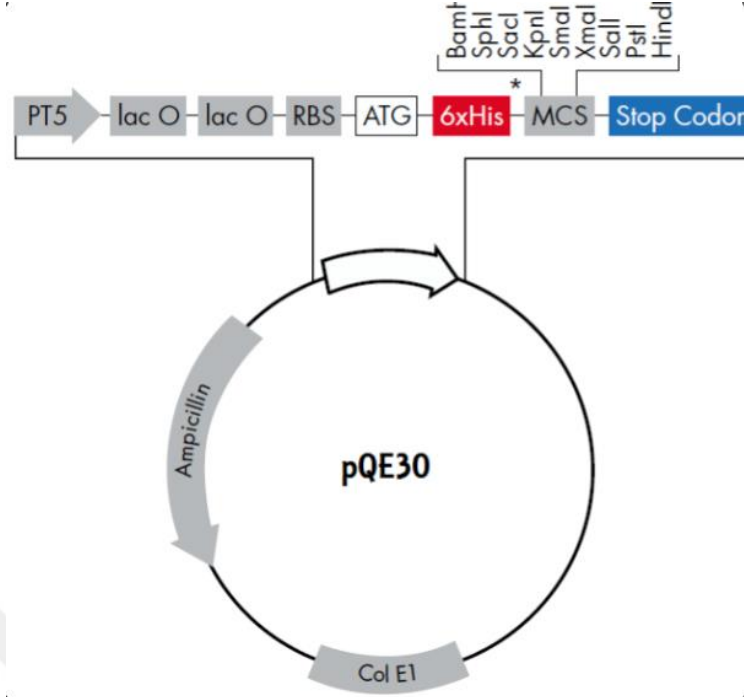
Tablo 2. 1: *E. coli* ırkları ve genotipleri

Organizma	Genotip
<i>E. coli</i> Rosetta	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm pRARE2 (CamR)</i>
<i>E. coli</i> DH5- α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-</i>
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)</i>

2.1.2. Çalışmada kullanılan vektör

Vektör: pQE30

Bu tez çalışması kapsamında *Geobacillus kaustophilus* α -glukuronidaz enziminin rekombinant olarak ifadesi için pQE30 vektörü kullanılmıştır. pQE vektörleri T5 promotoru kontrolünde hedef genin 6X-His takısı içerecek şekilde yüksek miktarda ifadesine olanak sağlamaktadır.



Şekil 2. 1: pQE30 vektörünün haritası

2.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

- Amfisilin (Serva): 100 mg amfisilin 1 ml distile suda çözündürülür ve membran filtreden geçirilerek steril edilir. Daha sonra 500 µl'lik miktarlara bölünerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.
- 1 kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific)
- 6X DNA loading dye (Thermo Scientific)
- Etidyum bromür (Sigma): 10 mg/mL konsantrasyonda distile su içerisinde çözülmüştür. +4 °C'de alüminyum folyoya sarılı şekilde karanlıkta saklanmıştır.
- CaCl₂ (Bio Life Sciences)
- Tiyamin hidroklorür (Merck) çözeltisi: 10 g tiyamin hidroklorür 100 mL suda çözülür 100 g/L konsantrasyonda hazırlanmıştır. Elde edilmiş olan çözelti membran filtreden geçirilerek steril edilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır.
- IPTG (GoldBio): 0,1M'lik stok çözeltisi olarak hazırlanmış ve ardından membran filtreden geçirilip steril edilmiştir. Elde edilen steril IPTG -20 °C'de muhafaza edilmiştir.
- Borik asit (Merck)

- Akrilamid/Bisakrilamid solüsyonu (29:1), %40 (w/v) mix (Bio Basic)
- Amonyum persülfat solüsyonu (Bio Basic): % 10 konsantrasyonda olacak şekilde distile su içerisinde hazırlanmıştır ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir.
- Tris (Sangon Biotech)
- Sodyum karbonat (Bio Basic)
- TEMED (Merck)
- MES (Gold Bio) tamponu: 20 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır.
- EDTA (BBI Life Sciences)
- 10X TBE Tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA): 108 grizma base ve 55 gr borik asit 600 ml distH₂O’da çözündürülür ve 40 ml 0.5 M EDTA eklenip 1L tamamlanmıştır.
- Etanol (Merck): %70 konsantrasyonda kullanılmıştır.
- İzopropanol (Serva)
- %10 SDS stok solusyonu: Sodyum dodesil sülfat %10 oranında suda çözündürülerek kullanılmaktadır.
- Metanol (Tekkim)
- Agaroz
- Gliserol (Merck): %80 oranında dH₂O ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Sodyum Klorür (NaCl) (Merck)
- SDS (Sangon Biotech): 10 mM
- FeCl₃ (Bio Basic): 10 mM
- CoCl₂ (Tekkim): 10 mM
- MgCl₂ (Bio Basic): 10 mM
- KCl (Bio Basic): 10 mM
- MnCl₂ (Emir Kimya): 10 mM
- Merkaptotetanol(C₂H₆OS) (Bio Basic): 10 mM
- DTT (Gold Bio): 10 mM
- Sodyum Citrate (Bio Basic): 10 mM
- PNPAGA (Megazyme): 50 mM
- HEPES: 50 mM
- NAD⁺ (Bio Basic): 10 mM
- K₂HPO₄ (Merck)

- KH_2PO_4 (Merck)
- Sodyum Asetat (Carlo Erba Reagenti): 50 mM
- Hidroklorik asit Solüsyonu
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Glisin (BBI Life Sciences)
- Yeast extract (Merck)
- Agar (Sangon Biotech)
- Asetik asit (Merck)
- Tripton (Sigma Aldrich)

2.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerleri

LB (Luria-Bertani) broth (sıvı) besiyeri

E.coli hücrelerinin kültivasyonunda ve rekombinant protein ifadesinde LB sıvı besiyeri kullanılmıştır. 10 g sodyum klorür, 10 g Tripton, ve 5 g maya ekstraktı 1000 mL distile suda çözündürülmüş ve 120 °C’de 20 dk otoklavda steril edilmiştir.

LB (Luria-Bertani) agar (katı) amfisilin besiyeri

10 g Tripton, 5 g maya ekstraktı, 10 g NaCl ve 20 g agar 1000 mL distile suda çözündürülmüş ve 120 °C’de 20 dk otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra 1 mL amfisilin (100 mg/mL) eklenerek petri tabaklarına dökülür ve soğuduktan sonra havayla teması kesilerek + 4 °C’de muhafaza edilir.

2.1.5. Çalışmada kullanılan kitler

Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit, QAIGEN QIAquick Gel Extraction Kit, Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

2.1.6. Çalışmada kullanılan enzim setleri

Taq DNA Polimeraz (AMPLİQON), T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific), *HindIII* restriksiyon enzimi (Thermo Scientific), *KpnI* restriksiyon enzimi (Thermo Scientific).

2.1.7.Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan bütün genel laboratuvar cihazları aşağıda listelenmiştir.

- UV Kabin (BLULAB)
- Otoklav (Nüve)
- Çalkalamalı inkübatör (MIULAB ES-60E)
- Mikroplaka spektrofotometre (Thermo Scientific, Multiskan sky)
- Santrifüj (HERMLE, 15-50ML’LİK)
- Santrifüj (Sangon Biotech)
- pH metre (OHAUS)
- Isı bloğu (DLAB, HB120-S)
- Manyetik-ısıtmalı karıştırıcı (VELP SCIENTIFICA)
- Analitik terazi (OHAUS)
- Vorteks (Fisherbrand)
- Yatay elektroforez sistemi (MIULAB MINIE-135)
- Dikey elektroforez sistemi (BIO-RAD Miniprotean Tetra Cell)
- PZR cihazı (BIOER GenePro)
- UV görüntüleme cihazı (Invitrogen iBright CL1000)
- SONOPULS ultrasonikatör (BANDELİN)
- Buz üretme cihazı (ITV)

2.2. Yöntem

2.2.1. *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz geninin gen spesifik primerler ile çoğaltılması

Geobacillus kaustaphilus α -glukuronidaz enzimini kodlayan protein dizisine ait genin kopyasının PZR ile üretilmesi için ilgili genin *E.coli*'de ifadesi amacıyla kodon optimizasyonu yapılmış kopyasını içeren plazmit DNA molekülü kalıp olarak kullanılmıştır. *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enzimini kodlayan protein dizisi aşağıda gösterilmiştir. Kodon optimizasyonu yapılmış sentetik gen GenScript firmasına ürettirilmiştir. *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz geninin çoğaltılması için Tablo 2.2'de yer alan oligonükleotid primerler kullanılmıştır. α -glukuronidaz geninin PZR ile çoğaltılmasında primerlerin optimal bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi için gradient PZR uygulanmıştır ve reaksiyon ile sıcaklık koşulları Tablo 2.4'de gösterilmiştir.

2.2.2. α -glukuronidaz enziminin protein dizisi: (Erişim numarası; WP_044731445)

```
>WP_044731445.1 alpha-glucuronidase [Geobacillus kaustophilus]
MTAGYEPCLWRYERKDYQSRLRFEEIVAKRTSPIFQAAVEELQKGLRSMMEIEPQVVQEVNETANSIWLGTLEDEEFERPLEGTLVHP
EGYVIRSDVDDGPFRIYIIGKTDAGVLYGVFHLRLQMGENIAQLSIIQPKNRLRMINHWDNMDGSIERGYAGRSIFFVADQFVKQ
NQRIKDYARLLASVGINAISINNVNVHKTETKLITDHFLLPDVAEVADIFRTYGIKTFLSINYASPIEIGGLPTADPLDPEVRRWWKET
AKRIYQYIPDFGGFVVKADSEFRPGPFITYGRDHAEGANMLAEALAPFGLVIWRCFVYNCQQDWRDRTTDRAKAAYDHFPLDGGQFRE
NVILQIKNGPMDQVREPVSPLFGAMPKTNQMMEVQITQEYTGQKHLCLFLIPQWKETLEFDITYAKGKGSVKVKVIDGSLFDYRYSGI
AGVSNIGNDPNWTGHTLAQANLYGFGRLAWNPDLSAEEIANEWVVQTFGDDSRVETISWMLLSSWRIYENYTSPLGVGWMVNPGRHHY
GPNVDGYEYSHWGTYYHADRDRGIGVDRTVATGTGYTAQYFPENAAYESLDTCPDELLLFHHVPYTHRLHSGETVIQHIYNTHFEGV
EQAKQLRKRWEQLKGKIDEKRYHDVLERLTIQVEHAKERDVTINTFYRKSGIDDQYGRKIYR
```

Tablo 2. 2 : *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz geninin amplifikasyonunda kullanılacak primer dizileri.

Gen adı	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
<i>Geobacillus kaustaphilus</i> α -glukuronidaz	GeoKau_Glukro_F _w	ATAGGTACCATGACGGCGGGATACGAACC
	GeoKau_Glukro_Rev	CATAAGCTTTTACCGATAAATTTTCCGCCC G

İleri (Fw) primer dizilerinde kalın karakterler KpnI restriksiyon tanıma bölgesini ve altı çizili bölge genin başlangıç kodonunu göstermektedir. Geri (Rev) primer dizilerinde kalın karakterler HindIII restriksiyon tanıma bölgesini ve altı çizili karakterler dur kodonunu göstermektedir.

Tablo 2. 3 : *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz geninin amplifikasyonu reaksiyon koşulları

Bileşen	Miktar
10X Taq Buffer	2,5 μ L
İleri primer (2,5 mM)	2,5 μ L
Geri primer (2,5 mM)	2,5 μ L
dNTP mix (2,5 mM herbiri)	2,5 μ L
Kalıp DNA	0,1 μ L
Taq DNA polimeraz	0,2 μ L
dH ₂ O	14,7 μ L

Tablo 2. 4 : *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz geninin amplifikasyonu için gradient PZR sıcaklık koşulları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95°C	5dk	1
Denatürasyon	95 °C	1dk	28
Bağlanma	55-65 °C	1dk	
Uzama	72 °C	3dk	
Son uzama	72 °C	10dk	1

2.2.3. DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi

PZR sonucunda elde edilen ürünler ile plazmit DNA ve restriksiyon kesim reaksiyonları sonrasında örnekler agaroz jel elektroforezi ile analiz edilip görüntülenmiştir. DNA örnekleri %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve TBE tamponu içerisinde 60 dk. 90 voltta yürütülmüştür. Yürütme sonrasında DNA bantları Invitrogen iBright CL1000 görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

2.2.4. Agaroz jelden DNA saflaştırma

1. Kesilen DNA parçalarının ağırlıkları belirlenir ve ardından tüplere jel ağırlığının 3 katı hacimde QG tamponu eklenir ve 50 °C’de 10 dk inkübe edilir ve her birkaç dakikada bir ters düz edilerek karıştırılır.
2. Ardından tüplere jel ağırlığı ile eşit hacimde izopropanol eklenir ve elde edilen karışım kit içerisinde yer alan kolonlara transfer edilir. 13000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılır ve altta kalan sıvı atılıp kolon tekrardan tüp içerisine geri konur.
3. Kolonlara 500 µL QG tamponu eklenir ve 13000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra altta kalan sıvı atılır.
4. Kolona 750 µL PE tamponu konur, 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 13000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılır ve alt sıvı atılır.
5. Son olarak boş şekilde 13000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılır ve kolonlar yeni 1.5 mL tüplere alınır.
6. Kolonlara 30 µL EB tamponu eklenir ve 4 dk oda sıcaklığında inkübe edilir ve ardından 13000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılır. Daha sonra tüpler -20°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.5. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonunda amaç, hedef geninin aktarılacağı plazmit DNA’yı hazırlamak, klonlama işlemi sonrasında klonlamanın kontrolünü yapmak ve plazmitin ekspresyon işleminde konakçı hücreye tranforme edilmesi için hazırlanması amacıyla gerçekleştirilir. Plazmit izolasyonu Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit, kullanılarak yapılmıştır.

1. Elde edilen pozitif koloni LB (uygun antibiyotik içeren) besiyerine ekilir, 37 °C’de ve 165 rpm çalkalama hızında 16 saat inkübe edilir.
2. Yaklaşık 16 saat inkübasyon sonrası 5 mL kültür ortamı 12000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılır. Süpernatant dökülür ve altta kalan peletle işleme devam edilir.
3. Hücre peletine 250 µL resüspansiyon solüsyonu eklenir ve pelet çözülene kadar vortexlenir.
4. Hücre peleti tamamen çözüldükten sonra üzerine 250 µL lizis tamponu eklenir ve 6-8 kez yavaşça ters düz edilir.

5. Berraklaşan hücre lizati üzerine 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklenir.
6. 5 dk 12000 rpm santrifüj yapılır. Üstte kalan süpernant çekilerek kolona aktarılır.
7. Kolon 12000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılır, kolonun altında kalan sıvı dökülür.
8. Kolona 500 µL yıkama solüsyon aktarılır. 12000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılır ve altta kalan sıvı uzaklaştırılır.
9. Kolon 1,5 mL’lik yeni tüpe aktarılır ve üzerine 50 µL elüsyon tamponu eklenir. 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 rpm’de 2 dk santrifüj yapılır ve alt sıvı –20 °C’de muhafaza edilir.

2.2.6. Restriksiyon kesimi ve ligasyon

Saflaştırma ve izolasyon sonrasında elde edilen α -glukuronidaz geninin ve pQE30 vektörünün ligasyon işleminden önce restriksiyon enzimleriyle kesimleri gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon kesim işleminde amaç yapışkan uç oluşturmaktır. Restriksiyon kesim işlemleri ihtiyaca göre enzimleri tek tek ya da ikisini birden içerecek şekilde yapılmıştır.

Tablo 2. 5 : Çift enzim restriksiyon kesim için reaksiyon şartları

Bileşen	Miktar
DNA	6 µL
Restriksiyon enzimi kesim I	0,5 µL
Restriksiyon enzimi kesim II	0,5 µL
Restriksiyon enzim tamponu	1 µL
dH ₂ O	2 µL

Tablo 2. 6 : Tek enzim restriksiyon kesim için reaksiyon şartları

Bileşen	Miktar
DNA	3 µL
Restriksiyon enzimi I ya da II	0,5 µL
Restriksiyon enzim tamponu	2,5 µL
dH ₂ O	19 µL

Hazırlanan restriksiyon kesim reaksiyonlarında DNA olarak elde edilen α -glukuronidaz geni ya da pQE30 plazmiti kullanılmıştır. Restriksiyon kesim işlemi 37 °C’de 10 saat gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından reaksiyon ürünleri agaroz jele yüklenmiştir ve jelde yürütülmüştür. Daha sonra hedef büyüklükteki DNA bantları jelden kesilmiştir ve jelden saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırılan ürün ile de ligasyon yapılmıştır. Ligasyon işlemi yapılırken DNA parçasının miktarı NanoDrop cihazı ile ölçülerek belirlenir. Bu işlem nanogram cinsinden yapılır.

$$x = \frac{\text{vektör (ng)}}{\text{vektör büyüklüğü (kb)}} * \frac{\text{klonlanacak DNA(mol)}}{\text{vektör (mol)}}$$

Bu formülden yola çıkarak kullanılacak vektör ve insert DNA (α -glukuronidaz geni) miktarları hesaplanmış ve bu miktarlar kullanılarak ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan ligasyon reaksiyonları +4 °C’de geceboyu inkübe edilmiştir ve ardından *E.coli* kompetent hücrelerine transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ligasyon için reaksiyon şartları

Tablo 2. 7: Ligasyon için reaksiyon şartları

Bileşen	Miktar
T4 DNA ligaz tamponu	2 μ L
Vektör (pQE30)	3 μ L
İnsert	10 μ L
T4 DNA ligaz	0,2 μ L
dH ₂ O	4,8 μ L

2.2.7. Kompetent *E.coli* hücresi hazırlanması

Transformasyon plazmit DNA’nın konakçı hücresine aktarımıdır. Bu aktarımın olması için yabancı DNA’yı almaya yetenekli hücreler olması gerekir, bu hücrelere kompetent hücreler denir. Kompetent *E.coli* hücreleri aşağıda yer alan protokole göre hazırlanmıştır.

1. Kompetent yapılmak istenen hücre LB besiyerine ekilir ve gece boyu 37 °C’de ve 165 rpm’de inkübe edilir.

2. İnkübasyonun ardından 200 mL'lik sıvı besiyerine 1 mL kültürden aşılama yapılır ve 37 °C'de 165 rpm'de inkübe edilir. İnkübasyon esnasında belirli aralıklarla OD₆₀₀ değeri spektrofometre ile ölçülür.

3. Kültürler OD₆₀₀ değeri 0,4-0,6 arasında oluncaya kadar inkübe edilirler. İstenilen OD₆₀₀ değerine ulaşılnca, kültürler 4100 rpm'de 15 dk santrifüj yapılır. Süpernant kısmı uzaklaştırılır ve pelet elde edilir.

4. Pelet üzerine 7,5 mL CaCl₂ eklenir ve pelet pipetleme yapılarak yavaş bir şekilde çözündürülür. Daha sonra 15 dk buzda bekletilir ve 4100 rpm'de 15 dk tekrar santrifüj yapılır.

5. Süpernant dökülür ve pelet üzerine 0,25 mL CaCl₂ koyulur ve pipetleme yapılarak yavaş bir şekilde çözündürülür.

6. Hücre çözeltisine 0,6 mL %80'lik gliserol eklenip nazıkçe karıştırılır ve hücreler 50 µL hacimlerde bölünerek - 80 °C'de muhafaza edilir.

2.2.8. Plazmit DNA'nın kompetent *E.coli* hücrelerine transformasyonu

Ligasyon işlemi sonucu elde edilen rekombinant plazmitlerin kompetent *E.coli* hücrelerine aktarımında ısı şoku ile transformasyon işlemi uygulanmıştır.

1. -80 °C'den alınan kompetent *E.coli* hücreleri 5 dk buzda bekletilir.
2. Ardından ligasyon reaksiyonundan gerekli miktarda hacim (2-5 µL arası) kompetent hücrelerin üzerine eklenir ve tekrardan buz içerisinde 30 dk. inkübe edilir.
3. Daha sonra tüpler 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 dk inkübe edilir. Ardından buza alınır ve 3 dk süre ile buzda bekletilir.
4. Tüpün içerisine 500 µL LB besiyeri eklenir ve 37 °C'de 60 dk inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonrasında hücrelerden 100 µL alınarak uygun antibiyotiği içeren petrilere yayılır ve 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılır.

2.2.9. Elde edilen klonların koloni PZR ile validasyonu

Transformasyon sonrası LB agar petrilerde oluşan koloniler steril kürdan yardımıyla küçük karelere bölünmüş yeni bir LB agar petrisine aktarılıarak master plate hazırlanır. Böylece elde edilen her bir klondan daha fazla hücre elde edilmiştir. Elde edilen klonlarda hedef genin varlığını belirlemek için koloniler doğrudan kalıp olarak kullanılarak hedef büyüklükte DNA'ya sahip olup olmadıkları belirlenir.

Master plate üzerinde çoğalma gösteren hücrelerden bir miktar hücre pipet ucu ile alınır ve 100 µL distile su içerisinde çözündürülür ve ardından ısı bloğunda 95 °C'de 5 dk inkübe edilerek hücrelerin yüksek sıcaklıkta parçalanması sağlanır. İnkübasyon sonrasında tüpler 12000 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Elde edilen süpernatant koloni PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılır. Koloni PZR için kullanılan reaksiyon koşulları ve sıcaklık programı Tablo 2.2.6 ve Tablo 2.2.7'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 8 : *Geobacillus kaustophilus* α-glukuronidaz geninin koloni PZR şartları

Bileşen	Miktar
10x Taq buffer	1 µL
dNTPmix	1 µL
İleri primer (2,5 mM)	1 µL
Geri primer (2,5 mM)	1 µL
Taq pol.	0,1 µL
Kalıp DNA	5 µL
dH ₂ O	0,9 µL

Tablo 2. 9 : *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz geninin koloni PZR ile validasyonunda kullanılan sıcaklık koşulları.

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95°C	5dk	1
Denatürasyon	95 °C	1dk	27
Bağlanma	64	1dk	
Uzama	72 °C	2dk	
Son uzama	72 °C	10dk	1

Koloni PZR işlemi sonunda tüplere 2’şer μ L 6X DNA yükleme boyası karıştırılmış ve örnekler % 1’lik agaroz jele yüklenerek TBE tamponu içerisinde 90 voltta 60 dk süre ile yürütülmüştür. Yürütme sonrasında DNA bantları Invitrogen iBright CL1000 görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

Görüntüleme sonucunda hedef büyüklükte DNA bandına sahip örnekler ait koloniler 10 mL LB besiyerine (uygun antibiyotik eklenmiş) ekilmiş ve gece boyu 37 °C’de 160 rpm’de inkübe edilmiştir. Elde edilen kültürlerden yukarıda anlatıldığı gibi plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmitlerin içerisinde yer alan insertlerin dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla plazmit örnekleri DNA dizi analizine gönderilmiştir. DNA dizi analizi Sentebiolab firması tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi sonuçları FinchTV programı ile analiz edilmiş ve elde edilen dizilerin hangi proteini kodladığı NCBI veritabanında bulunan blastx aracıyla belirlenmiştir.

2.2.10. *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enziminin rekombinant protein olarak *E.coli*’de İfadesi ve saflaştırılması

DNA dizi analizi sonucunda pozitif olduğu belirlenen koloniden elde edilen rekombinant plazmit molekülü *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enziminin ifade edilmesi amacıyla bir ifade konakçısı olan *E. coli* BL21 hücresine transforme edilmiştir. 5 mL LB besiyeri içeren cam tüplere 5 μ L ampisilin eklenmiş ve transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden bir tanesinin ekimi yapılmıştır. Gece boyu 37° C ve 165 rpm’de inkübe edilmiştir. 50 mL LB besiyeri içine 50 μ L amfisilin

koyulmuş ve kültürden 500 µL alınarak aşılama yapılmıştır. 37 °C’de OD₆₀₀ değeri 0,6-0,8 aralığına gelinceye kadar inkübe edilmiştir. İstenilen OD₆₀₀ değeri elde edildikten sonra 50 µL IPTG ve 50 µL thiamin eklenmiş ve 37 °C ve 165 rpm’de yaklaşık 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür ortamı 4000 rpm’de 30 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 50 mM fosfat tamponu ile yıkanmış ve elde edilen hücre peleti sonraki işlemler için -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Geobacillus kaustophilus α-glukuronidaz enzimi pQE30 vektörü üzerinde bulunan 6X histidin takısı ile birlikte ifade edilmiştir. α-glukuronidaz enziminin saflaştırılması Thermo Scientific HisPur Ni-NTA Purification Kit kullanılarak immobilize metal afinite kromatografisi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hücre pelleti, pellet ağırlığının 4 katı hacimde 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu içerisinde çözülmüştür. Elde edilen hücre süspansiyonu ultrasonikatör vasıtasıyla 5 dk boyunca parçalanmıştır (30 saniye on, 10 saniye off; %40 amplitüd). Lizis işlemi sonrası lizat +4 °C ve 12000 rpm’de 30 dk santrifüjlenmiştir.
2. Kolonlar içerisinde yer alan saklama tamponunun uzaklaştırılması için 700 rcf’de 2 dk santrifüjlenir ve tüpün içinde kalan sıvı uzaklaştırılır.
3. Kolona reçine hacminin iki katı kadar (2 mL) dengeleme tamponu (10 mM imidazol içeren fosfat tamponu) konur ve reçinenin içerisine girmesi beklenir.
4. Kolon 700 rcf’de 2 dk santrifüjlenir ve tüpün içinde kalan sıvı uzaklaştırılır.
5. Hazırlanan hücre lizatı kolona eklenir ve +4 °C’de 30 dk inkübe edilir.
6. Kolon 700 rcf’de 2 dk santrifüjlenir ve tüpün içinde kalan sıvı uzaklaştırılır.
7. Kolona 2 mL yıkama tamponu (25 mM imidazol içeren fosfat tamponu) konur ve 700 rcf’de 2 dk santrifüjlenir. Yıkama işlemi toplamda 3 kez tekrarlanır.
8. Kolona 1 mL elüsyon tamponu (250 mM imidazol içeren fosfat tamponu) eklenir ve 700 rcf’de 2 dk santrifüjlenir. Elüsyon işlemi toplamda 3 kez tekrarlanır.

Elde edilen elüsyon fraksiyonları içerisinde bulunan imidazolün uzaklaştırılması için fosfat tamponuna karşı 24 saat boyunca diyaliz yapılmıştır. Diyaliz esnasında tampon birkaç defa yenilenmiştir. Diyaliz sonunda elde edilen örneklerle eşit hacimde gliserol eklenip -20 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

2.2.11. Proteinlerin SDS-PAGE ile analizi

α -glukuronidaz enzimini içeren hücre lizatları ya da saflaştırılmış α -glukuronidaz enzimi sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Ayırma jeli % 10'luk olacak şekilde hazırlanmıştır (3.575 mL dH₂O, 1.875 mL %40 akrilamid, 1.9 mL 1.5 M Tris (pH 8.8), 0.075 mL % 10 SDS, 0.075 mL % 10 APS ve 0.003 mL TEMED). Paketleme jeli ise % 5 olacak şekilde hazırlanmıştır (3.605 mL dH₂O, 0.625 mL %40 akrilamid, 0.63 mL 1 M Tris (pH 6.8), 0.05 mL % 10 SDS, 0.05 mL % 10 APS ve 0.005 mL TEMED). SDS-PAGE analizi öncesinde 30 μ L protein örneği 6 μ L SDS-PAGE yükleme tamponuyla karıştırılmış ve 98 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Örnekler SDS-PAGE jeline yüklendikten sonra 120 voltta yaklaşık 90 dk yürütülmüşlerdir. Protein bantlarının görünür hale getirilmesi için SDS-PAGE jeli ilk olarak boyama çözeltisinde (% 0.25 coomasie, % 45.5 v/v metanol, % 9.2 v/v asetik asit) inkübe edilmiş ardından boya uzaklaştırma çözeltisinde (% 10 asetik asit) bantlar görünür hale gelinceye kadar bekletilmiştir.

2.2.12. BCA İle Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Rekombinant protein ifadesi sonrasında α -glukuronidaz enzimini içeren hücre lizatları ya da saflaştırılmış α -glukuronidaz preparatlarında protein konsantrasyonu Bikinkoninik Asit (BCA) kullanılarak 562 nm'de kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Protein miktar tayini mikroplaka formatında üreticinin kit içerisinde belirttiği protokole göre yapılmıştır. 25 μ L protein örneği 200 μ L BCA çalışma reaktifi (WR) ile karıştırılmış ve 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve ardından 562 nm'de mikroplaka okuyucuda absorbans ölçümü yapılmıştır. Protein miktarının tayini için sığır serum albümini (BSA; 0-2000 μ g/mL) içeren standart grafiği kullanılmıştır.

2.2.13. α -glukuronidaz Enziminin Aktivite Tayini

Hücre lizatı ya da saflaştırılmış enzim preparatlarında α -glukuronidaz enziminin aktivitesinin tayininde hedef substrat olarak kolorimetrik aktivite tayinini olanak sağlayan 4-nitrofenil- α -D-glukuronid (PNPAGA) kullanılmıştır. Aktivite tayini α -

glukuronidaz aktivitesi sonucu açığa çıkan 4-nitrofenolün 400 nm’de spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Enzim aktivite tayini için 40 µL enzim preperatı, 4 µL PNPAGA (50 mM) ve 56 µL tampon karıştırılmıştır, sonrasında reaksiyon 37 °C’de 20 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve ardından reaksiyon tüplerine 100 µL Na₂CO₃ (1 M) çözeltisi eklenmiş ve 400 nm de absorbans ölçümü yapılmıştır. Enzim aktivitesinin tayini için daha önceden hazırlanmış 4-nitrofenol standart grafiği (0,01-0,1 mM) kullanılmıştır.

2.2.14. α - glukuronidaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

Optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi

α-glukuronidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.5) içerisinde 40 µL enzim preperatı, 4 µL PNPAGA (50 mM) son hacim 100 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyonlar 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 °C’ de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda 100 µL sodyum karbonat (1 M) çözeltisi eklenmiş ve 400 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Optimum pH değerinin ve tamponun belirlenmesi

α-glukuronidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği tampon çözeltinin ve pH değerinin belirlenmesi için 50 mM sodyum asetat (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5), 50 mM tris tamponu (pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) ve 50 mM glisin tamponu (pH 9.0, 9.5, 10.0) kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda 100 µL sodyum karbonat (1 M) çözeltisi eklenmiş ve reaksiyon sonucu oluşan pNP miktarı 400 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi

α-glukuronidaz enziminin aktivite gösterdiği çeşitli kimyasalların etkisi belirlenmiştir. Bu etkinin belirlenmesi için 10 mM SDS, EDTA, FeCl₃, MgCl₂, KCl, CaCl₂, MnCl₂, etanol, DMSO, 2- Mercaptoetanol, DTT, Sodyum sitrat, CoCl₂ kullanılarak reaksiyon

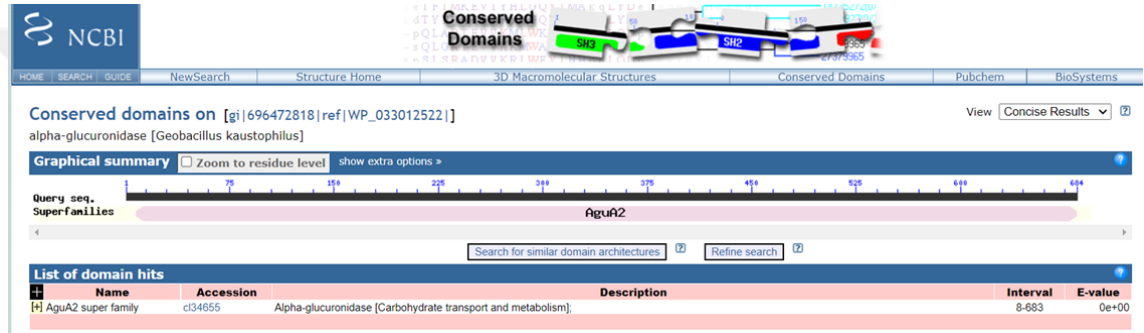
gerçekleştirilmiştir. Reaksiyona 100 µL sodyum karbonat (1 M) çözeltisi eklenmiş ve reaksiyon sonucu oluşan pNP miktarı 400 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.



3.BULGULAR

3.1. *Geobacillus kaustaphilus* α - Glukuronidaz Geninin Klonlanması

Geobacillus kaustaphilus termofilik gram-pozitif bir bakteri türüdür. İlk kez Mariana Çukurundan izole edilmiştir. *Geobacillus kaustaphilus* 37°C–75°C arasında büyümektedir. Optimum büyüme sıcaklığı 55 °C – 65 °C arasındadır. *Geobacillus kaustaphilus* pH 6-8 arasında büyüebilmektedir. Optimum büyüme pH 6.2 ila 7.5 arasındadır.



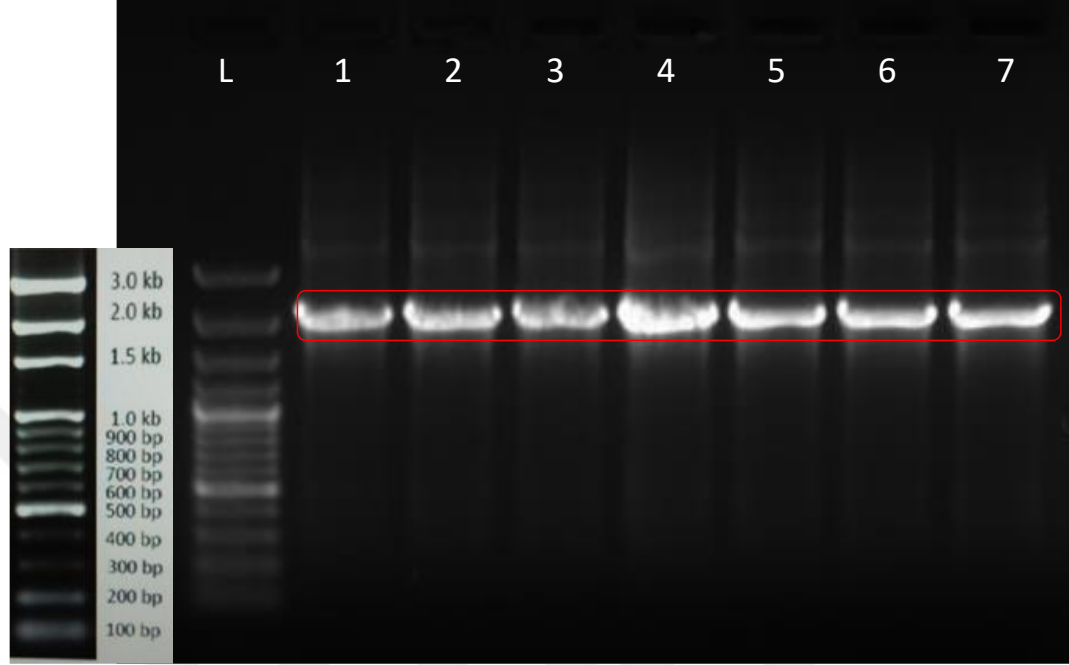
Şekil 3. 1. *Geobacillus kaustaphilus* α - glukuronidaz proteininin NCBI conserved domain database (CDD) analizi.

Geobacillus kaustaphilus α - glukuronidaz proteininin NCBI conserved domain database (CDD) analizi şekil 3.1’de gösterilmiştir. Bu analize göre ilgili protein dizisinin Agua2 süper ailesine ait α - glukuronidaz proteinini kodladığı açıkça görülmektedir.

3.1.1. *Geobacillus kaustaphilus* α - glukuronidaz geninin PZR ile amplifikasyonu

Geobacillus kaustaphilus α - glukuronidaz enziminin *E.coli*’de heterolog ifadesi için ilk olarak ilgili gen kodon optimize olarak sentetik gen olarak Genscript firmasına sentezletilmiştir. Sonrasında genin ifade vektörüne ligasyonunda kullanılacak restriksiyon tanıma bölgelerinin eklenmesi için geninin kopyaları PZR ile elde edilmiştir. α -glukuronidaz geninin PZR amplifikasyonunda primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi için öncelikle 55 ile 65 °C arasında gradient PZR uygulanmıştır ve PZR ürünü % 1’lik agaroz jelde analiz edilmiştir (Şekil 3.2). PZR

işlemi sonucunda hedef büyüklük α -glukuronidaz geni için 2040 baz çiftidir ve şekil 'de görüldüğü gibi 2 kb. bandı hizasında test edilen tüm sıcaklıklarda ürün elde edilmiştir.



Şekil 3. 2 : α - glukuronidaz enziminin amplifikasyonu için gerçekleştirilen PZR işleminin agaroz jel analizi. **1:** 55 ° C, **2:** 56,5 ° C, **3:** 57,6 ° C, **4:** 59 ° C, **5:** 60,7 ° C, **6:** 63,3 ° C, **7:** 64,7 olarak uygulanmıştır

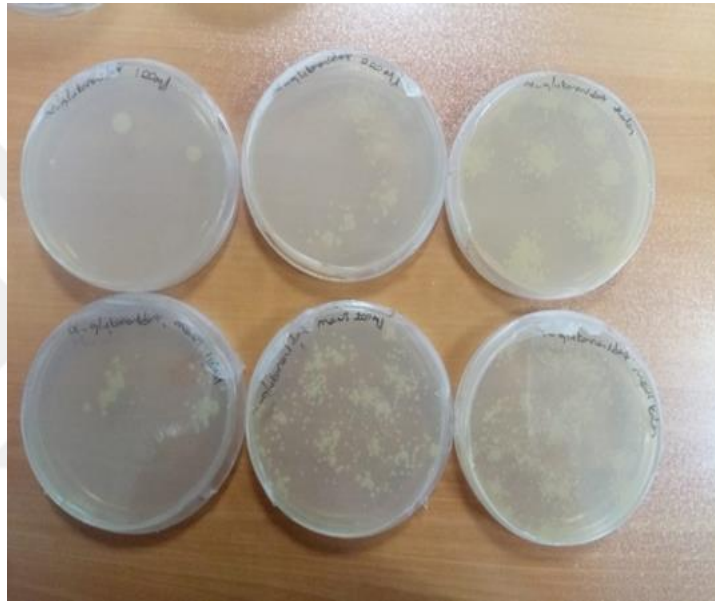
Şekil 3.2’de kırmızı kutu içerisinde gösterilen PZR ürünü jelden kesilmiş ve QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit kullanılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır.

3. 2. α - Glukuronidaz Geninin Vektöre DNA’ ya Aktarılması

α - glukuronidaz geninin klonlama işlemi yapılması için ekspresyon vektörü olarak pQE-30 kullanılmıştır. pQE-30 vektörüne klonlama işleminin yapılabilmesi için ilk olarak ilgili genin ve vektör DNA’nın primer diziler ile gene eklenmiş olan *KpnI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmesi gerekmektedir. Klonlamada ilk olarak iki enzim ile aynı anda kesim yapılmıştır, fakat ligasyon ve transformasyonun ardından herhangi bir koloni oluşumu gözlenmediği için *KpnI* ve *HindIII* enzimleri ile sıralı bir şekilde restriksiyon kesim reaksiyonu yapılmıştır. Restriksiyon kesim işlemi sonrasında hem

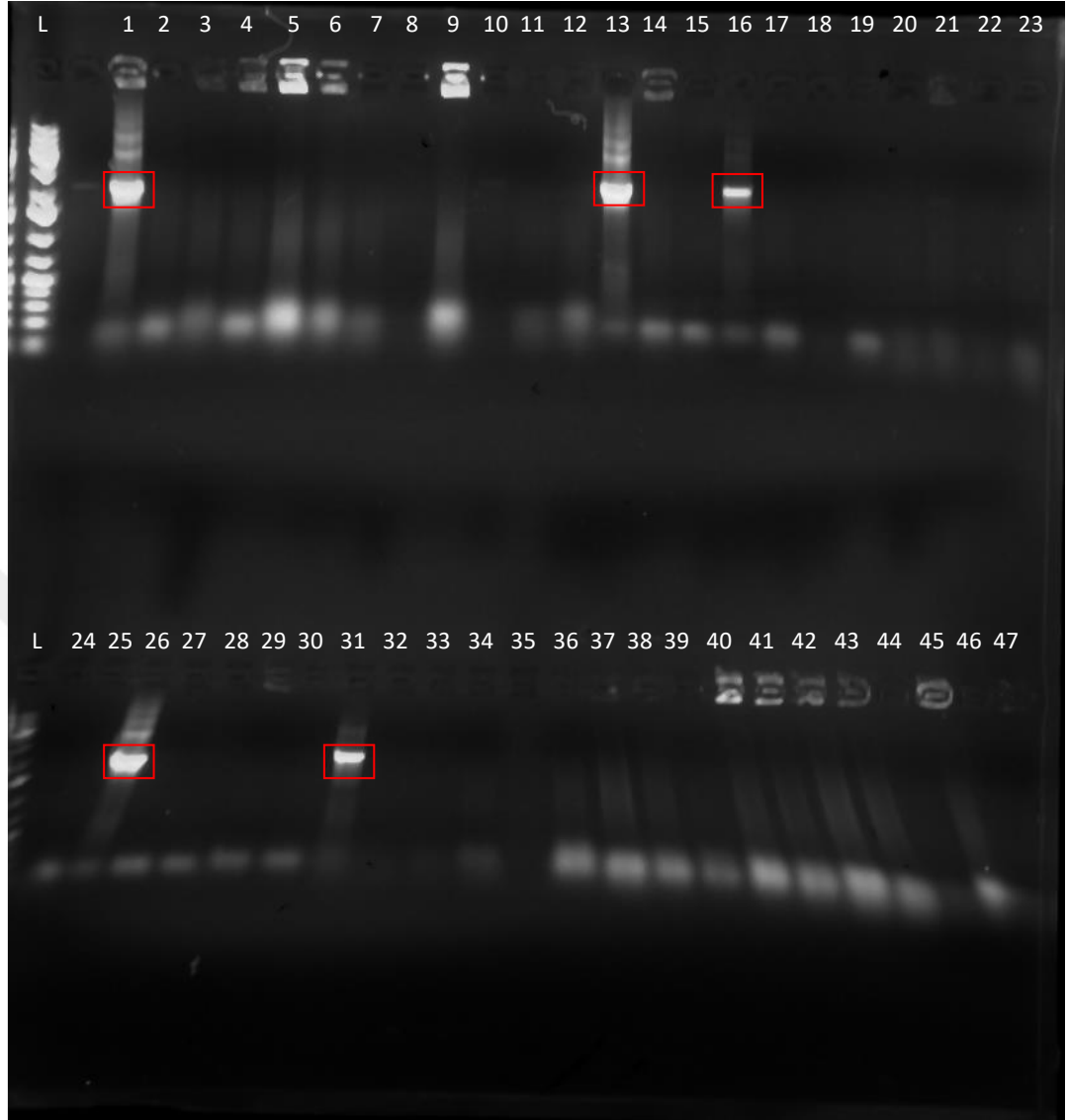
insert DNA hem de pQE-30 plazmiti agaroz jel ile analiz edilmişler ve jelden kesilerek QAIGEN QIAquick Gel Extraction Kit kullanılarak saflaştırılmışlardır.

KpnI ve *HindIII* ile kesimi yapılan α -glukuronidaz geninin ve pQE30 vektörünün ligasyon işlemi T4 DNA Ligaz enzimi kullanılarak yapılmıştır. Geceboyu gerçekleştirilen ligasyon reaksiyonundan 2 μ L alınarak kimyasal kompetent *E. coli* DH5 α hücresine ısı şoku ile transforme edilmişler ve transformasyon sonrası Amfisilin içeren LB katı besiyerine yayılarak gece boyu 37 ° C’de inkübe edilmişlerdir.



Şekil 3. 3: α - glukuronidaz genin transformasyonu sonucu *E. coli* DH5 α hücresindeki koloni görünümü

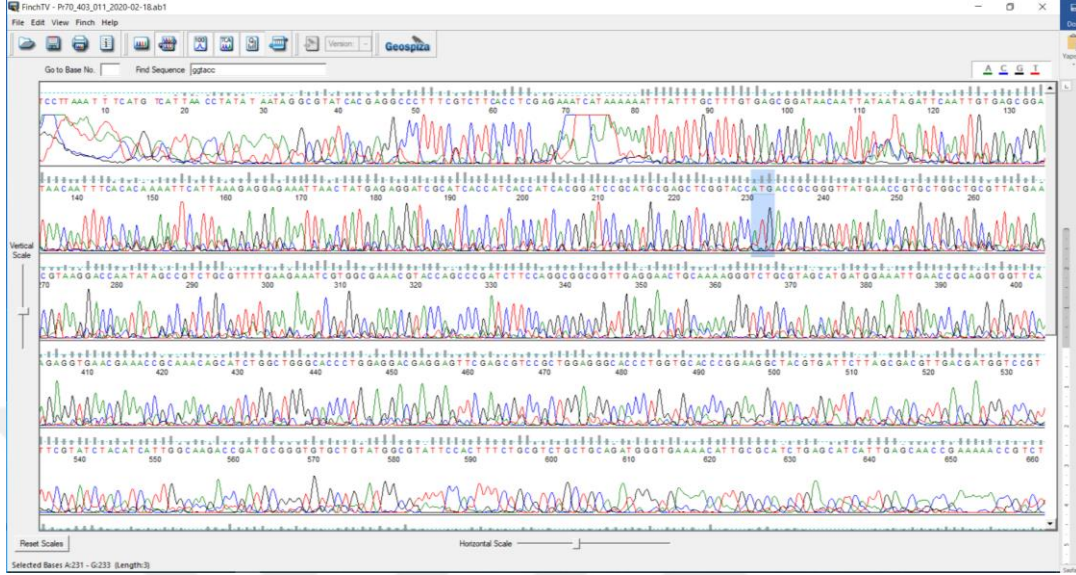
Amfisilin içeren LB katı besiyerinde üremiş olan koloniler içerisinde yer alan plazmitin α - glukuronidaz gen bölgesini içerip içermediğini belirlemek için koloni PZR gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle petri tabaklarında yer alan kolonilerin daha fazla üretilmeleri amacıyla master petriler oluşturulmuştur. Bu amaçla LB-agar besiyeri küçük karelere bölünmüş ve herbir karenin içerisine bir koloni çizgi ekim ile ekilmiş ve gece boyu inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonucu master petrilerde yer alan kolonilerin kaynatılmasıyla elde edilen lizatlar kalıp DNA olarak kullanılmış ve koloni PZR yapılmıştır. Gerçekleştirilen koloni PZR ürünleri agaroz jelde analiz edilmişlerdir (Şekil 3.4) yüklenmiştir.



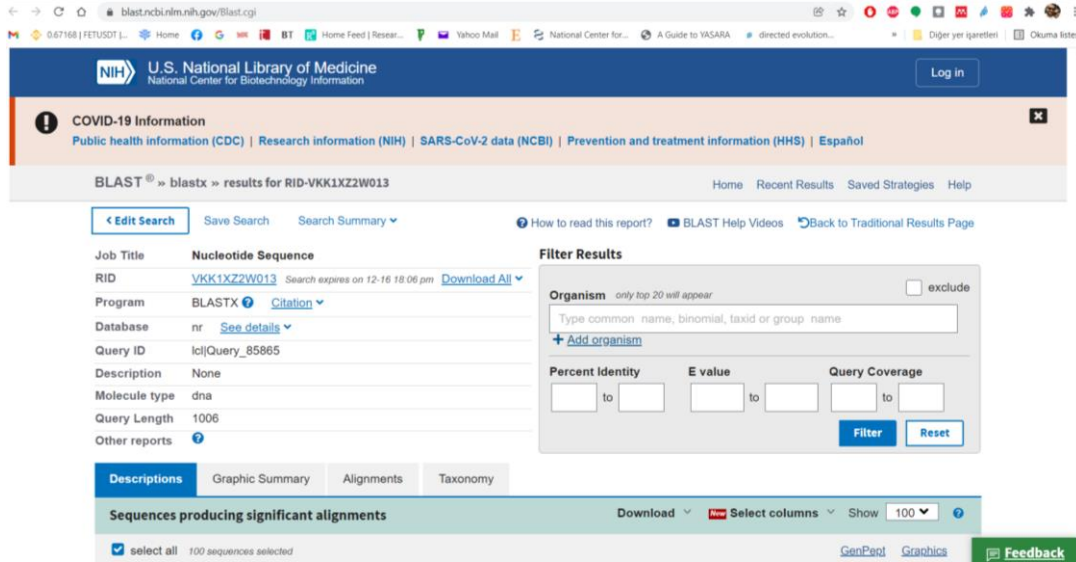
Şekil 3.4: α -glukuronidaz geni için koloni PZR analizinin agaroz jel görüntüsü

Şekil 3.4’de görüldüğü gibi koloni PZR ile analiz edilen toplam 47 adet koloniden beş tanesinin istenilen büyüklükte yani yaklaşık 2 kb. büyüklüğünde DNA bandına sahip olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.4’ de 1, 13, 16, 26, 31 ile numaralandırılmış koloniler içerisinde yer alan DNA parçasının α -glukuronidaz genini kodlayıp kodlamadığını belirlemek üzere dizi analizine gönderilmesine karar verilmiştir. Bu amaçla ilk olarak seçilen 5 adet koloni LB besiyerine inokule edilmiş ve kültürlerden plazmid izolasyonu yapılmıştır. Ardından plazmitler DNA dizi analizine gönderilmiş pozitif koloni belirlenmiştir. Dizi analizi işlemi sonucunda elde edilen sonuçlar FinchTV programı ile analiz edilmiş ve örnek olarak Şekil 3.5’de gösterilmiştir. Kromatogramlardan elde

edilen DNA dizileri daha sonrasında BLAST ile analiz edilmiş ve ilgili dizilerin hangi proteini kodladığı belirlenmiştir (Şekil 3.6).



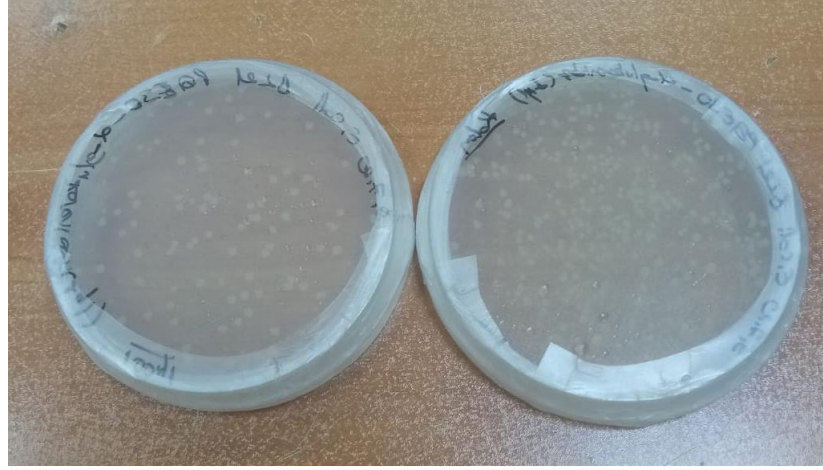
Şekil 3. 5: α - glukuronidaz genine ait DNA dizi analizi sonuçlarının örnek görünümü



	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
✓	hypothetical protein D143_09045 [Geobacillus sp. CAMR12739]	Geobacillus sp...	353	353	56%	1e-119	91.62%	216	KDE47545.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus thermoleovorans group]	Geobacillus ther...	358	358	56%	3e-115	93.72%	679	WP_044731445.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus]	Geobacillus	357	357	56%	1e-114	93.19%	679	WP_021321578.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stea...	357	357	56%	2e-114	93.19%	679	AAI32057.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus sp. GH01]	Geobacillus sp...	357	357	56%	2e-114	93.19%	679	WP_015374976.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus sp. MAS1]	Geobacillus sp...	357	357	56%	2e-114	93.19%	679	WP_023633601.1
✓	RecName: Full=Xylan alpha-(1->2)-glucuronosidase; AltName: Full=Alpha-glucuronidase [Geobacillus stearot...	Geobacillus stea...	355	355	56%	7e-114	92.67%	679	Q08LY5.1
✓	Chain A. ALPHA-D-GLUCURONIDASE [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stea...	355	355	56%	7e-114	92.67%	679	1MQR_A
✓	Chain A. alpha-D-glucuronidase [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stea...	355	355	56%	7e-114	92.67%	679	1K9E_A
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus subterraneus]	Geobacillus subt...	354	354	56%	2e-113	92.15%	679	WP_172418563.1
✓	Xylan alpha-(1->2)-glucuronosidase [Geobacillus sp. BCO2]	Geobacillus sp...	352	352	56%	1e-112	92.15%	679	KPC99757.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus sp. CAMR5420]	Geobacillus sp...	351	351	56%	2e-112	91.62%	679	WP_033025519.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stea...	350	350	56%	6e-112	91.10%	679	KFL17022.1
✓	xylan alpha-1-2-glucuronosidase [Geobacillus]	Geobacillus	348	348	56%	3e-111	91.10%	679	WP_020755810.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus sp. C56-T3]	Geobacillus sp...	344	344	56%	1e-109	90.05%	679	WP_013145189.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus sp. Y412MC52]	Geobacillus sp...	322	322	56%	4e-101	84.10%	683	WP_013523883.1
✓	alpha-glucuronidase [Parageobacillus thermoglucosidarius]	Parageobacillus...	282	282	56%	1e-85	73.85%	683	WP_013877034.1
✓	alpha-glucuronidase [Parageobacillus thermanfarcicus]	Parageobacillus...	281	281	56%	4e-85	73.85%	683	WP_090947852.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus]	Geobacillus	229	229	56%	2e-65	61.93%	684	WP_008880069.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus thermodenitrificans]	Geobacillus ther...	229	229	56%	2e-65	61.93%	684	WP_011887512.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus thermodenitrificans]	Geobacillus ther...	229	229	56%	2e-65	61.93%	684	WP_087960056.1
✓	alpha-glucuronidase [Geobacillus stearothermophilus]	Geobacillus stea...	226	226	56%	3e-64	60.91%	684	WP_193442225.1

Şekil 3. 6: α - glukuronidaz genine ait DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizinin BLAST analizi

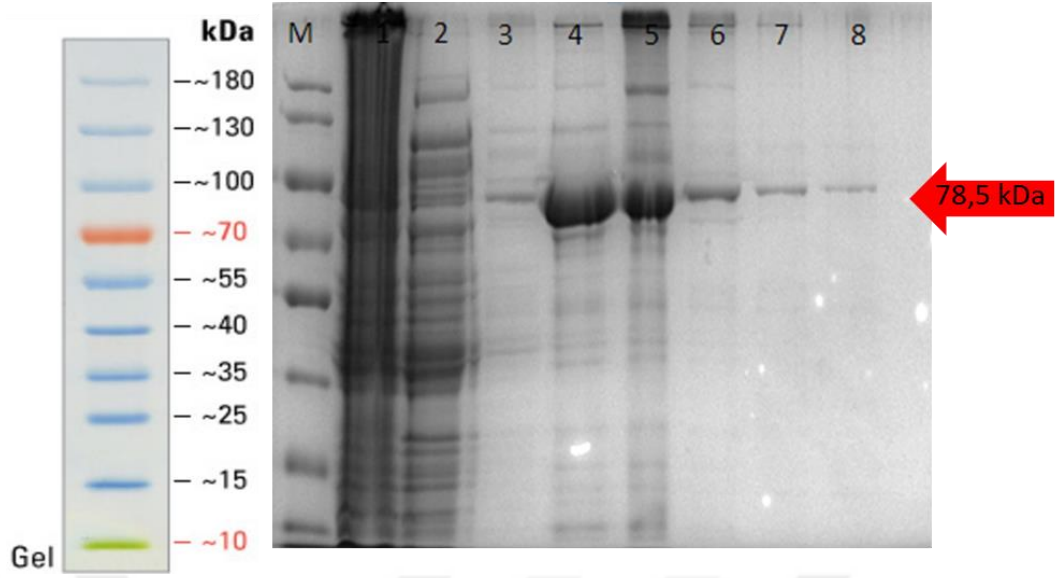
DNA dizi analizi yapılan 5 adet koloniden 1 numaralı koloni hariç diğer 4 koloninin de α – glukuronidaz genine sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen pozitif plazmitlerden 26 numaralı koloniye ait olan rekombinant plazmit DNAsı seçilmiş ve rekombinant protein ifadesi için ifade konakçıları olan *E. coli* Rosetta ve *E. coli* BL21 konakçılarına transforme edilmiştir. Aktif üreme *E. coli* BL21 hücrelerinde gözlenmiş ve bu kültürden gliserol stok yapılmıştır. Hücre -80 °C’de muhafaza edilmiş ve rekombinant protein ifadesi için bu hücre kullanılmıştır.



Şekil 3. 7: α - glukuronidaz geninin transformasyonu sonucu *E. coli* BL21 hücresindeki koloni görünümü

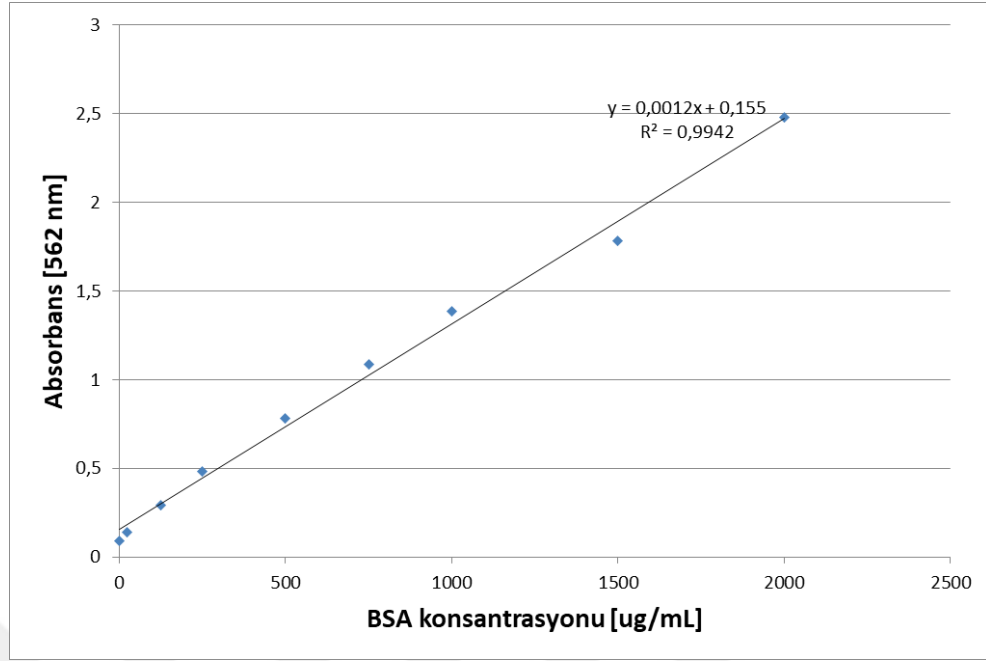
3.3.Rekombinat α - glukuronidaz Proteinin Üretimi ve Saflaştırılması

Dizi analizi sonucu pozitif olduğu belirlenen 26 numaralı koloniye ait α -glukuronidaz genini içeren *E. coli* BL21 suşunda protein ifadesi ve ifade edilen α -glukuronidaz enzimi kısım 2.2.10'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan proteinler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3.8). Saflaştırılan proteinlerin SDS-PAGE analizi sonucunda α -glukuronidaz enziminin başarılı bir şekilde saflaştırıldığı görülmüştür. Şekil 3.8'de kuyucuk 4 ve 5 te yüksek miktarda α -glukuronidaz enziminin varlığına ek olarak diğer proteinlerin safsızlık olarak bulunduğu görülmektedir. Kuyucuk 6, 7 ve 8'de ise α -glukuronidaz enziminin daha yüksek saflıkta olduğu görülmüştür. Saflaştırılan rekombinant protein fraksiyonlarından kuyucuk 6, 7 ve 8'de yer alanlar birleştirilmiş ve sonrasında elüsyon tamponu içerisinde yer alan imidazolün uzaklaştırılması için diyaliz işlemi uygulanmıştır.



Şekil 3. 8: α - glukuronidaz enziminin SDS-PAGE analizi. M: Marker, **1:** Temiz süpernatant, **2:** Flow-through (FT), **3:** Yıkama Fraksiyonu, **4:** Elüsyon Fraksiyonu 1 (100 mM imidazol), **5:** Elüsyon Fraksiyonu 2 (200 mM imidazol), **6:** Elüsyon Fraksiyonu 3 (300 mM imidazol), **7:** Elüsyon Fraksiyonu 4 (400 mM imidazol), **8:** Elüsyon Fraksiyonu 5 (500 mM imidazol).

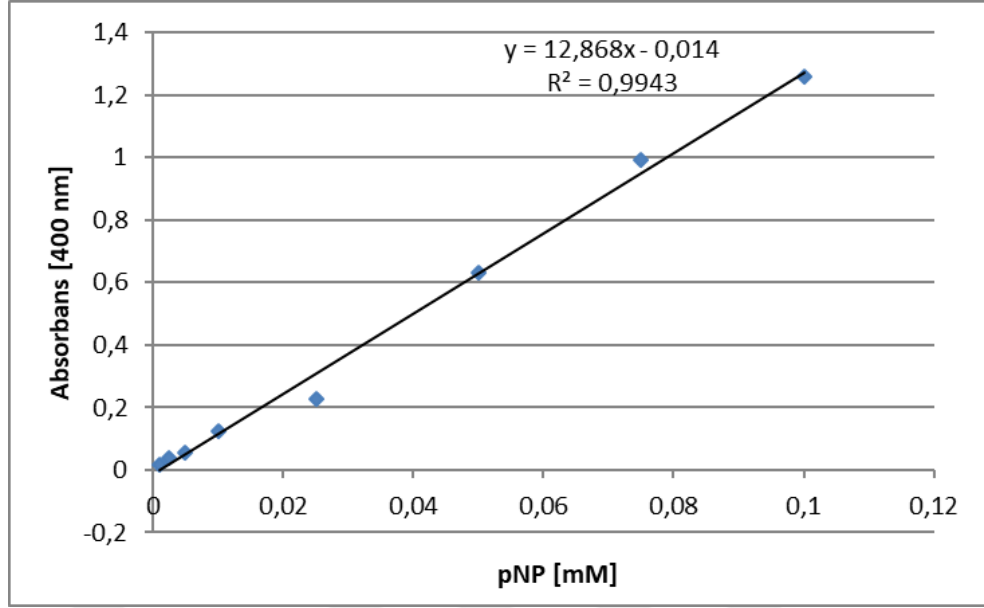
Diyaliz işleminden sonra saflaştırılan α - glukuronidaz enziminin konsantrasyonu Pierce BCA Protein Assay Kit ile belirlenmiştir. Protein miktarının tayini için sıgır serum albümini (BSA; 0-2000 $\mu\text{g/mL}$) içeren standart grafiği kullanılmıştır (Şekil 3.9). BCA analizi sonucunda saflaştırılan α - glukuronidaz enziminin konsantrasyonu 76,04 $\mu\text{g} / \text{mL}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3. 9: BCA ile protein konsantrasyon tayini için BSA kullanılarak hazırlanan standart grafiği

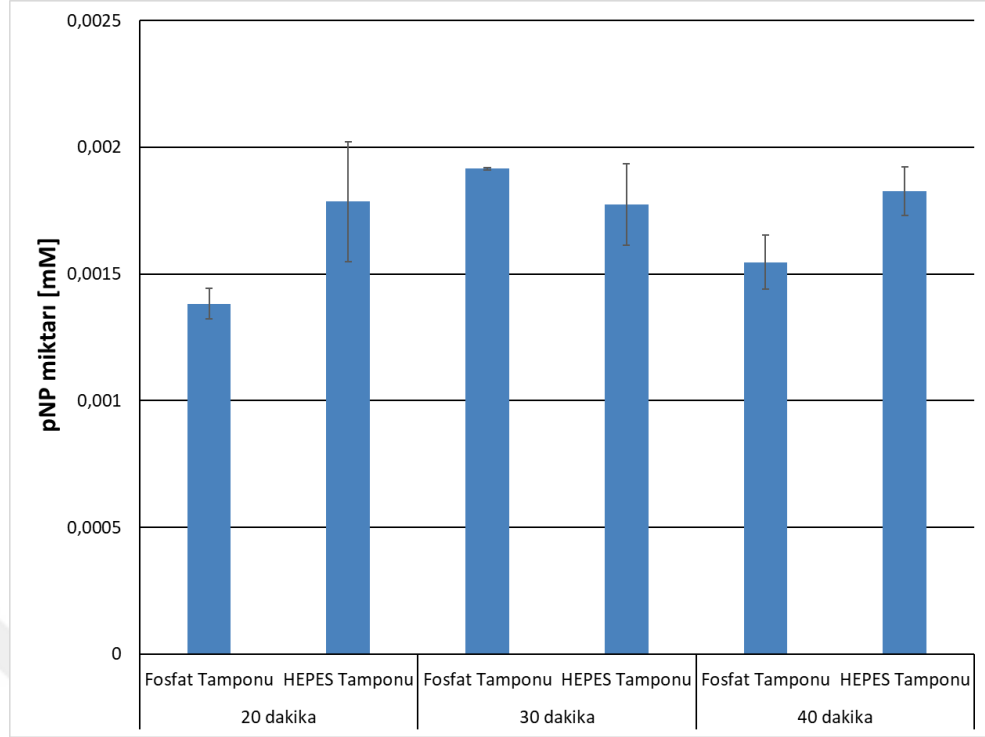
3.4. Rekombinat *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz Enziminin Karakterizasyonu

Rekombinant olarak üretilen ve saflaştırılan *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enziminin karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık, tampon ve pH değeri belirlenmiş ve sonrasında bazı kimyasalların enzim aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. α -glukuronidaz enziminin karakterizasyonunda kısım 2.2.13'te anlatıldığı gibi 4-nitrofenol (pNP) temelli kolorimetrik aktivite tayini kullanılmıştır. Kolorimetrik aktivite tayini için 0.001 mM ile 0.1 mM arasında değişen değerlerde hazırlanmış pNP standard grafiği (Şekil 3.10) kullanılmıştır.



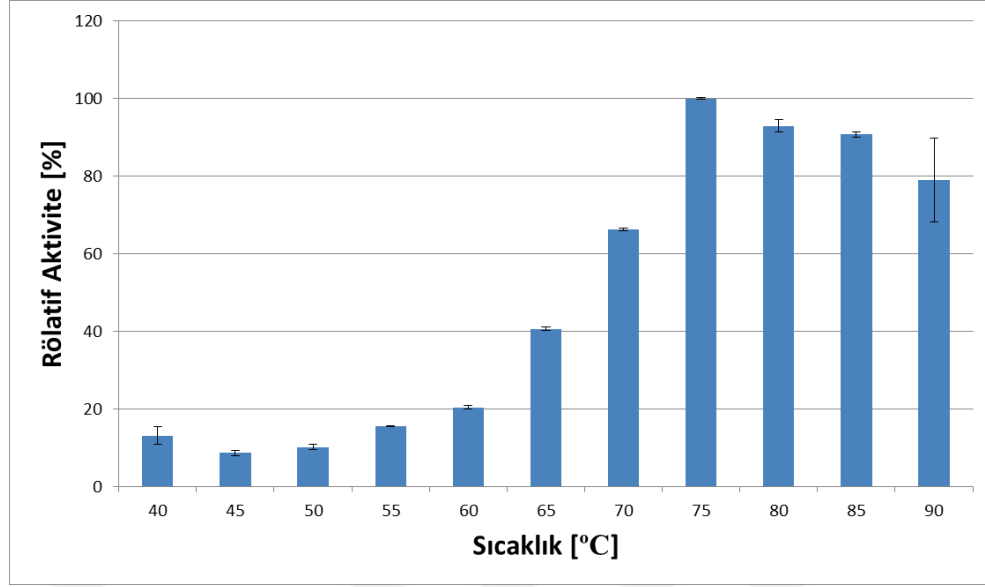
Şekil 3. 10: α -glukuronidaz enziminin kolorimetrik aktivite tayininde kullanılmak üzere hazırlanan pNP standart grafiği

α -glukuronidaz enziminin karakterizasyonundan önce ilk olarak reaksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla enzimatik reaksiyon 40 °C'de 20, 30 ve 40 dk olacak şekilde inkübe edilmiştir. Ayrıca reaksiyon için iki farklı tampon olan fosfat ve HEPES tamponları test edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 405 nm'de spektroskopik ölçüm gerçekleştirilmiş ve açığa çıkan pNP miktarları belirlenmiş ve şekil 3.11'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun koşulların fosfat tamponunda 30 dk olduğu belirlenmiştir.



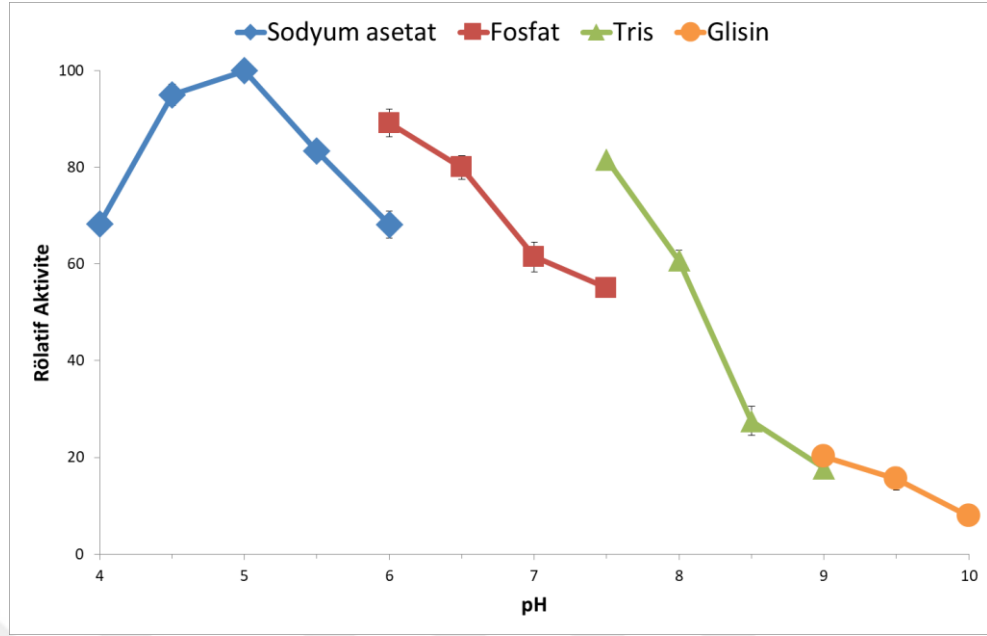
Şekil 3. 11: α -glukuronidaz enzim aktivitesi tayini için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

Rekombinant α -glukuronidaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonunda ilk olarak enzimin optimum sıcaklığı belirlenmiştir. Bu amaçla 40 °C ile 90 °C arasında farklı sıcaklıklarda enzimatik aktivite gerçekleştirilmiş ve sonrasında 405 nm’de açığa çıkan pNP miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. En yüksek enzimatik aktivitenin ölçüldüğü sıcaklık % 100 olarak alınmış ve diğer sıcaklıklarda elde edilen aktivite değerleri bu değere oranlanmıştır (Şekil 3.12). α -glukuronidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 75 °C olduğu görülmüştür.

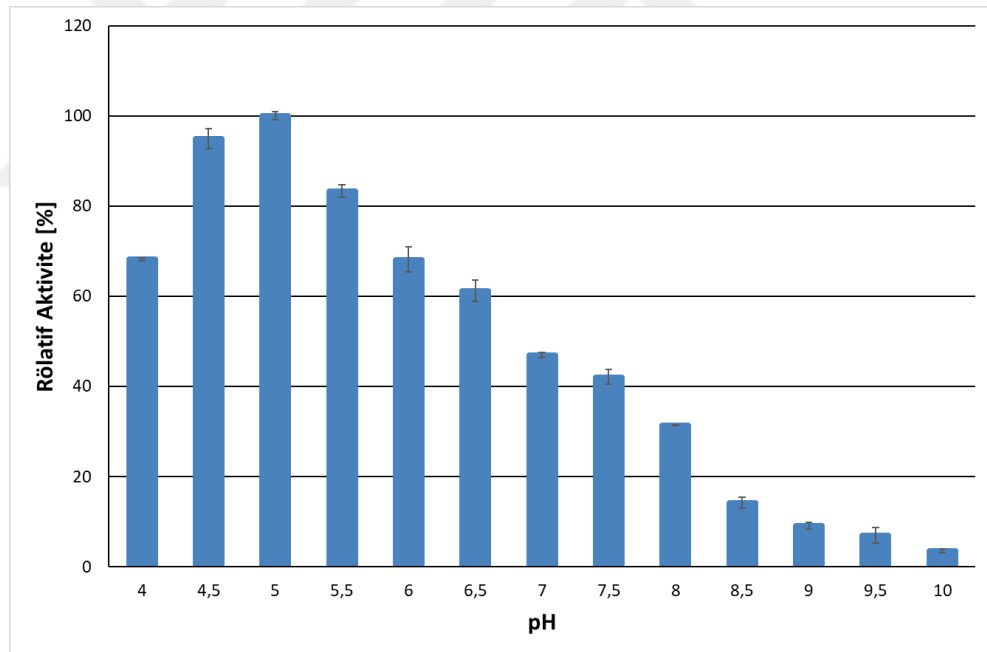


Şekil 3. 12: α - glukuronidaz enziminin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi

α - glukuronidaz enziminin optimum sıcaklığı belirlendikten sonra enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerini ve tampon sistemini belirlemek amacıyla pH 4 ile 6 aralığında sodyum asetat, pH 6 ile 7,5 aralığında fosfat tamponu, pH 7,5 ile 9 aralığında tris tamponu ve son olarak pH 9 ile 10 aralığında ise glisin tamponu kullanılarak enzim aktivitesi gerçekleştirilmiştir. En yüksek enzimatik aktivitenin ölçüldüğü pH değeri % 100 olarak alınmış ve diğer pH değerlerinde elde edilen aktivite değerleri bu değere oranlanmıştır (Şekil 3.13 ve 3.14). Elde edilen aktivite sonuçlarından α - glukuronidaz enziminin optimum pH değerinin pH 5.0 olduğu ve en yüksek aktiviteyi sodyum asetat tamponunda gösterdiği görülmektedir.



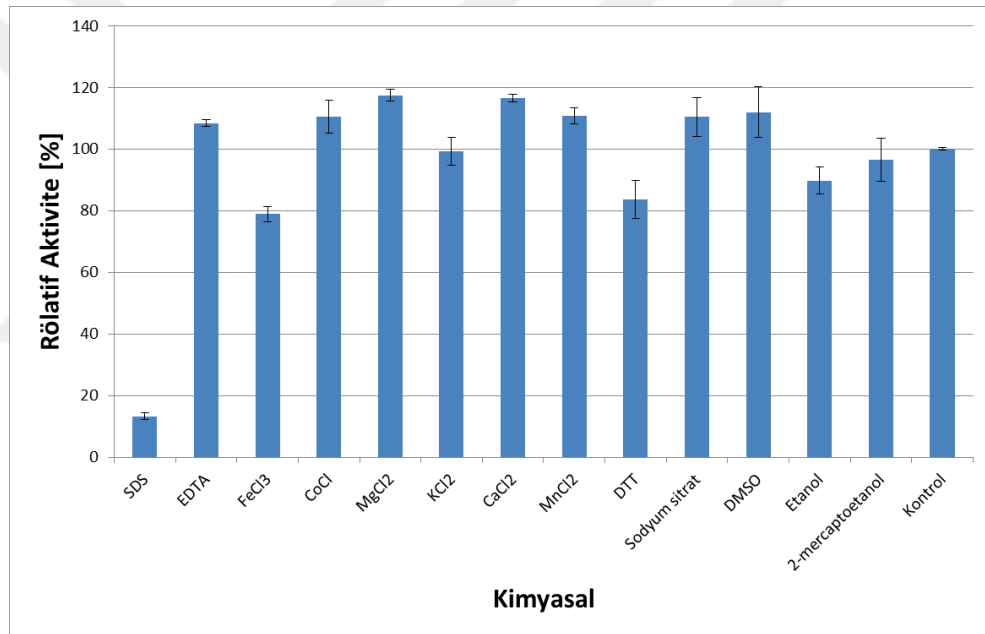
Şekil 3. 13: α - glukuronidaz enziminin optimum pH ve tamponunun belirlenmesi



Şekil 3. 14: α - glukuronidaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi.

α - glukuronidaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı, pH değeri ve tamponu belirlendikten sonra son olarak enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda SDS, EDTA, FeCl_3 , CoCl_2 , MgCl_2 , KCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , DTT, Sodyum sitrat, DMSO, etanol ve 2-merkaptetanol 0,1 mM

konsantrasyonda olacak şekilde reaksiyon ortamına eklenmiş ve optimum koşullarda enzimatik reaksiyon gerçekleştirilmiştir ve sonrasında 405 nm’de açığa çıkan pNP miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Reaksiyon sonunda kontrol reaksiyonu (herhangi bir kimyasal içermeyen) %100 olarak alınmış ve farklı kimyasalları içeren reaksiyonlardan elde edilen sonuçlar kontrol reaksiyonuna oranlanmıştır ve elde edilen sonuçlar şekil 3.15 'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre $MgCl_2$ ve $CaCl_2$ ’nin enzim aktivitesini en fazla arttırdığı (yaklaşık % 20) görülmüştür. $FeCl_3$, DTT ve etanolün enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği SDS’in ise enzim aktivitesini yaklaşık %85 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Bunlar dışındaki kimyasalların ise enzim aktivitesine kayda değer bir etkisi olmamıştır.



Şekil 3. 15:α- glukuronidaz enzimine çeşitli kimyasalların etkisi

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Dünya üzerindeki nüfus artışı ve ekonomik büyüme fosil yakıtlara olan ihtiyacı artırmaktadır. Artan ihtiyaçtan dolayı fosil yakıt tüketimi artmaktadır ve bu durum beraberinde çevre sorunlarını getirmektedir. Bu soruna alternatif çözüm yenilenebilir enerji kaynağı lignosellülozik biyokütledir (Lee ve ark., 2012; Sindhu ve ark., 2016).

Lignosellülozik biyokütle bitkilerden elde edilmesinden dolayı kolaylıkla bulunan bir yapıdır. Genelde yumuşak ağaçtan ve tarım ürünlerinden elde edilen lignosellülozik biyokütle, biyoyakıt üretimi için değerli bir kaynaktır. Ayrıca biyoetanol üretiminde başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanılmakla birlikte enzim, gıda katkıları, farmasötik ve kozmetik kimyasallar gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Jaramillo ve ark., 2015; Maitan-Alfenas ve ark., 2015; Arevalo-Gallegos ve ark., 2017).

Lignosellülozik biyokütle selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır. Yapısında en fazla selüloz ikinci olarak da hemiselüloz bulunur (Çöpür ve ark., 2011). Lignosellülozik yapının biyoetanol ya da diğer katma değerli ürünlerin üretiminde kullanılabilmesi için yapısında yer alan basit şekerlerin ayrışması gerekmektedir (Ezeilo ve ark., 2017). Lignosellülozik biyokütleden yakıt ya da diğer ürünlerin üretimi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır: ön işlem, hidroliz ve fermantasyon. Basit şekerlerin açığa çıkması enzimatik hidroliz basamağında gerçekleşmektedir. (Madadi ve ark., 2017).

Lignosellülozun tam anlamda enzimatik hidrolizinin gerçekleşebilmesi için birçok selüloolitik ve hemiselüloolitik enzime ihtiyaç duyulmaktadır. Hemiselüloz yapının parçalanmasında temel olarak endoksilenaz ve β -ksilosidaz enzimi görev almakla birlikte hemiselüloz yapının tamamen parçalanması için yardımcı enzimler olarak adlandırılan α -L-arabinofuranozidaz, α -glukuronidaz, α -galaktozidaz, asetilksilan estera ve β -mannanaz gibi enzimler de rol almaktadır (Xu ve ark., 2007; Suwannarangsee ve ark., 2012; Van Dyk ve ark., 2012; Hong ve ark., 2007).

Glukuronik asit yada metil esteri lignoselülozik yapıda ksilana bağlı olarak bulunmaktadır (Wang ve ark., 2016). Ksilanların hidrolizinde α -glukuronidazlar birçok enzimle birlikte rol almaktadır (Mohapatra ve ark., 2019). α -glukuronidaz enzimi birçok farklı endüstriyel ve biyoteknolojik süreçte kullanılmaktadır. Bu enzim lignoselülozların parçalanmasının yanı sıra hastalıkların teşhisinde ve gıda endüstrisinde uygulama alanları bulmaktadır (Feng ve ark., 2016).

Endüstriyel ve biyoteknolojik süreçlerin genel olarak sert koşullarda gerçekleştiği düşünüldüğünde yüksek sıcaklık, düşük pH, yüksek basınç gibi uç koşullarda yaşayan ekstremofilik mikroorganizmalar bu tip süreçlerde kullanılabilecek yeni enzimler için oldukça büyük ve çalışılması gereken bir kaynak teşkil etmektedir (Demirjian ve ark., 2001; van den Burg ve ark., 2003). Endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler sert koşullara dayanıklılığın yanında, çoğunlukla maliyeti düşük olan mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun sebebi ise hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere göre ucuz bir şekilde daha çok miktarda elde edilmeleridir. (Güven, 2011). α -glukuronidaz enzimi günümüzde *Bacillus* ve *Geobacillus* gibi çok sayıda bakteri türünde etkinliğini göstermiştir. Rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak üretilmesi kolay hale gelmiştir. Rekombinant protein ekspresyonu ile kısa sürede hedeflenen proteinin üretilmesi ve maliyetinin düşük olması gibi avantajları vardır (Karataş, 2015).

Yukarıdaki bilgiler ışında bu tez çalışmasında termofilik bir bakteri olan *Geobacillus kaustaphilus* genomunda kodlanan α -glukuronidaz enzimini kodlayan genin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *E.coli*'ye aktarılması, rekombinant protein olarak ifadesi ve elde edilmiş olan enzimin biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda ilk olarak, *E.coli*'de rekombinant ifade için kodon optimizasyonu yapılmış α -glukuronidaz sentetik geni PZR ile amplifiye edilmiş ve restriksiyon temelli klonlama ile pQE-30 vektörüne aktarılmıştır. Başarılı bir şekilde klonlamanın gerçekleştirildiği DNA dizi analizi ile teyit edildikten sonra *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enziminin heterolog ifadesi *E. coli* BL21 suşunda gerçekleştirilmiş ve üretilen rekombinant enzim nikel afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır.

Geobacillus kaustophilus α -glukuronidaz enziminin aktivite analizleri 4-nitrofenol (pNP) temelli kolorimetrik aktivite tayini ile gerçekleştirilmiştir. Enzimin biyokimyasal karakterizasyonunun önce ilk olarak uygun reaksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla enzimatik reaksiyon 40 °C’de 20, 30 ve 40 dk olacak şekilde inkübe edilmiştir. Buna ek olarak ayrıca reaksiyon için fosfat ve HEPES tamponları olmak üzere iki farklı tampon test edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 405 nm’de spektroskopik ölçüm gerçekleştirilmiş ve açığa çıkan pNP miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun koşulların fosfat tamponunda 30 dk olduğu belirlenmiştir. Fosfat tamponu içerisinde 30 dk inkübasyon sonucunda elde edilen verilerin diğer zaman dilimlerine ve HEPES tamponuna göre en tutarlı sonuçlar olduğu görülmüştür. Diğer elde edilen sonuçlarda standart sapma fosfat tamponunda 30 dk inkübasyon ile elde edilenden daha fazla olduğu için optimum reaksiyon süresi olarak fosfat tamponunda 30 dk inkübasyon seçilmiş ve sonraki biyokimyasal karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Geobacillus kaustophilus α -glukuronidaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmek için öncelikle enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiş ardından optimum pH değeri ve tampon çözelti tespit edilmiştir. Son olarak çeşitli kimyasal bileşiklerin enzim aktivitesine olan etkisi incelenmiştir.

Geobacillus kaustophilus α -glukuronidaz enziminin optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi için fosfat tamponunda 40 °C ile 90 °C arasında farklı sıcaklıklarda 30 dk reaksiyon gerçekleştirilmiş ve reaksiyon sonucunda açığa çıkan pNP spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Şekil 3.12). Elde edilen bulgular *Geobacillus kaustophilus* α -glukuronidaz enziminin optimum sıcaklığının 75 °C olduğunu göstermiştir. Enzim aktivitesi 45 °C’den itibaren giderek artmıştır ve 75 °C’den sonra ise az miktarda azalmıştır. 75 °C’de gözlenen aktivite %100 olarak değerlendirildiğinde enzim 70 °C’de %66 ve 65 °C’de ise %40 aktivite sergilemiştir. Buna ek olarak ılımlı sıcaklıklarda (40-50 °C arasında) enzim aktivitesi %10 civarında kalmıştır. Diğer yandan daha yüksek sıcaklıklardaki aktivite incelendiğinde 80 °C’de enzim aktivitesinin %93’ ünü 85 °C’de ise %90’ını korurken 90 °C’de ise yaklaşık %80 oranında aktivite sergilemiştir. Elde edilen bulgular enzimin beklenildiği gibi termofilik karakterde olduğunu ve mezofilik

değerlerde pek aktif olmadığını göstermiştir. Suresh ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada hipertermofilik bakteri türü olan *Thermotoga maritima* bakterisinden elde edilen α -glukuronidaz enziminin 60 °C de en yüksek aktivitesini gösterdiğini belirlemişlerdir (Suresh ve ark., 2002). Benzer şekilde Shao ve arkadaşları *Thermoanaerobacterium* sp.'den elde edilen α -glukuronidaz enzimi ile yaptıkları çalışmada enzimin optimal sıcaklığını 60 °C olarak belirlemişler (Shao ve ark., 1995). Zaide ve arkadaşları yaptığı çalışmada ise *Bacillus stearothermophilus* α -glukuronidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 75°C olduğunu belirlemişlerdir (Zaide ve ark.2001). Bir diğer benzer çalışmada ise Dalia Shallom ve arkadaşları ise *Geobacillus stearothermophilus* α -glukuronidaz geninin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 65 °C olarak bulmuşlardır (Shallom ve ark., 2004). Bu çalışmada rekombinant olarak üretilen *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enziminin diğer termofilik *Bacillus* türlerinden elde edilenler ile benzer bir karakteristiğe sahip olduğu görülmüştür. Buna ek olarak literatürde tanımlanan diğer termofilik organizmalar olan *Thermotoga* ve *Thermoanaerobacter* türlerinden ise daha yüksek bir çalışma sıcaklığına sahip olduğu görülmüştür. Bunlara ek olarak literatürde mezofilik bakterilerden de tanımlanmış α -glukuronidaz enzimleri de mevcuttur. Örneğin karışık bir kültürden elde edilen α -glukuronidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 45 °C aralığında olduğu saptanmıştır (Lee ve ark., 2012). Ayrıca *Aspergillus fumigatus*'tan elde edilen α -glukuronidaz enziminin ise optimum çalışma sıcaklığının 37 °C olduğu belirlenmiştir (Rosa ve ark., 2013).

Geobacillus kaustaphilus α -glukuronidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 75 °C olarak belirlendikten sonra enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerini ve tampon sistemini belirlemek amacıyla pH 4 ile 6 aralığında sodyum asetat, pH 6 ile 7,5 aralığında fosfat tamponu, pH 7,5 ile 9 aralığında tris tamponu ve son olarak pH 9 ile 10 aralığında ise glisin tamponu kullanılarak enzim aktivitesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen aktivite sonuçlarından (Şekil 3.13 ve 3.14) α -glukuronidaz enziminin en yüksek aktiviteyi pH 5.0 değerinde sodyum asetat tamponunda gösterdiği görülmektedir. Enzim aktivitesi pH 4 ile 5 değerleri arasında artarken, pH 5' den sonraki değerlerde aktivitenin azalmaya başladığı görülmüştür. *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enzimi en yüksek aktivitesini (%80'den fazla)

ılımlı asidik koşullarda sergilerken nötr pH değerlerinde ise yaklaşık %50 oranında aktivite sergilemiştir. Bazik koşullarda ise α -glukuronidaz enzimi aktivitesinin büyük bölümünü kaybetmiş ve yaklaşık %10 civarında bir aktivite sergilemiştir. Elde edilen bu bulgular *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enziminin termofilik özelliğinin yanında asidofilik bir enzim olduğunu da göstermiştir. *Aspergillus fumigatus* α -glukuronidaz enziminin optimum pH değerinin 5.0 olduğu belirlenmiştir (Rosa ve ark., 2013). Yine yapılan bir diğer çalışmada Suresh ve arkadaşları hipertermofilik bakteri türü olan *Thermotoga maritima* α -glukuronidaz enziminin optimal pH değerinin 7.5 olduğunu rapor etmişlerdir (Suresh ve ark., 2002). Shao ve arkadaşları ise *Thermoanaerobacterium* sp.'den elde edilen α -glukuronidaz enziminin pH değerini 7.5 olarak belirlemişlerdir (Shao ve ark.,1995). Termofilik *Bacillus stearothermophilus* α -glukuronidaz enziminin optimum aktivitesinin ise pH 7.0 değerindeki fosfat tamponunda elde edildiği rapor edilmiştir (Zaide ve ark., 2001). Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular literatürde tanımlanan diğer α -glukuronidaz enzimleri ile karşılaştırıldığında, literatürde termofilik olarak tanımlanan enzimlerin nötr pH değerlerinde aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmada rekombinant olarak üretilen *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enzimi asidotermofilik özelliktedir ve bu özelliği ile literatürdeki diğer termofilik akrabalarından ayrılmaktadır. Endüstriyel birçok sürecin ekstrem koşullarda gerçekleştiği düşünüldüğünde termofilik özelliğinin yanı sıra asidofilik özelliğın *Geobacillus kaustaphilus* α -glukuronidaz enzimini diğer rakiplerinden bir adım öne çıkarmaktadır.

Geobacillus kaustaphilus α -glukuronidaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu amacıyla son olarak enzim aktivitesine çeşitli kimyasal bileşiklerin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 0.1 M SDS, EDTA, FeCl₃, CoCl₂, MgCl₂, KCl₂, CaCl₂, MnCl₂, DTT, Sodyum sitrat, DMSO, etanol ve 2-merkaptetanöl reaksiyon ortamına eklenmiş ve optimum koşullarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular incelendiğinde (Şekil 3.14) EDTA, CoCl₂, MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, Sodyum sitrat ve DMSO'nun α -glukuronidaz aktivitesine olumlu yönde etki ettiği gözlenmiştir. En yüksek aktivite artışı yaklaşık % 117 ile MgCl₂ ve CaCl₂ ile elde edilirken diğer olumlu etki gösterne kimyasalların artışı % 110 civarında kalmıştır. Test edilen bileşikler arasında KCl₂ ve 2-merkaptetanöl herhangi bir etki göstermemiştir. Reaksiyon ortamına etanol

eklendiğinde % 90, DTT eklenince % 83 ve FeCl₃ eklendiğinde ise % 79 oranında bir aktivite ölçülmüştür. Test edilen kimyasal bileşikler arasında en dramatik düşüş SDS ile elde edilmiştir. 0.1 M SDS içeren reaksiyon ortamında enzim aktivitesinin sadece %13'ünü sergilemiştir. Test edilen toplam 13 farklı kimyasaldan sadece SDS'in inhibitör özellikte olduğu görülmüş diğer kimyasalların ise kaydadeğer bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir. Zaide ve arkadaşları yaptığı çalışmada *Bacillus stearothermophilus* α - glukuronidaz enziminin aktivitesine FeCl₃, CoCl₂, MgCl₂, KCl, CaCl₂, BaCl₂, NiCl₂, HgCl₂, ZnCl₂, AgNO₃, CuSO₄ bileşiklerinin etkisi test edilmiştir. HgCl₂, ZnCl₂, AgNO₃, CuSO₄ 'un enzim aktivitesini yüksek oranda inhibe ettiği görülürken sadece FeCl₃ enzim aktivitesini ılımlı oranda arttırmıştır. Diğer kimyasalların etkisi kayde değer değildir (Zaide ve ark., 2001).

5. KAYNAKÇA

- Aalbers, F., Turkenburg, J. P., Davies, G. J., Dijkhuizen, L., & Lammerts van Bueren, A. (2015). Structural and Functional Characterization of a Novel Family GH115 4-O-Methyl- α -Glucuronidase with Specificity for Decorated Arabinogalactans. *Journal of Molecular Biology*, 427(24), 3935–3946.
- Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Ma, H., & Wang, Q. (2019). Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Reviews on Environmental Health*, 34(1), 57–68.
- Adıgüzel A.O. 2013 “Biyoeanolün Genel Özellikleri ve Üretimi İçin Gerekli Hammadde Kaynakları”, BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 2:2, 204-220.
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., & Pillai, S. (2021). Enhanced xylanase and endoglucanase production from *Beauveria bassiana* SAN01, an entomopathogenic fungal endophyte. *Fungal Biology*, 125(1), 39–48.
- Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H. M.N. 2017 “Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 99, , Pages 308-318
- Ariaeenejad, S., Sheykh Abdollahzadeh Mamaghani, A., Maleki, M., Kavousi, K., Foroozandeh Shahraki, M., & Hosseini Salekdeh, G. (2020). A novel high performance in-silico screened metagenome-derived alkali-thermostable endo- β -1,4-glucanase for lignocellulosic biomass hydrolysis in the harsh conditions. *BMC Biotechnology*, 20(1), 56.
- Berlin, A. 2013 ” No Barriers to Cellulose Breakdown”, *Science*, 342, Issue 6165, 1454-1456.
- Brown, T. A. (2020). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. John Wiley & Sons, 8,90,220.
- Chimphango, A. F. A., Görgens, J. F., & van Zyl, W. H. (2016). In situ enzyme aided adsorption of soluble xylan biopolymers onto cellulosic material. *Carbohydrate Polymers*, 143, 172–178.
- Chong, S.-L., Derba-Maceluch, M., Koutaniemi, S., Gómez, L. D., McQueen-Mason, S. J., Tenkanen, M., & Mellerowicz, E. J. (2015). Active fungal GH115 α -glucuronidase produced in *Arabidopsis thaliana* affects only the UX1-reactive glucuronate decorations on native glucuronoxylans. *BMC Biotechnology*, 15(1), 56.
- Coconi Linares, N., Dilokpimol, A., Stålbrand, H., Mäkelä, M. R., & de Vries, R. P. (2020). Recombinant production and characterization of six novel GH27 and GH36 α -galactosidases from *Penicillium subrubescens* and their synergism with

- a commercial mannanase during the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 295, 122258.
- Çöpür, Y., Tozluoğlu, A., Özyürek, Ö. 2011 "Selülozik Biyoetanol Üretim Teknolojisi". *Düzce Üniversitesi Ormancılık Dergisi* 7: 10-37
- Dawood A and Ma K (2020) Applications of Microbial β -Mannanases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:598630. doi: 10.3389/fbioe.2020.598630
- Demirjian, D C., Morís-Varas F., Cassidy C S. 2001 "Enzymes from extremophiles," *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 144–151
- Deveci, E. Ü., Gönen, Ç., & Çetin, G. (2019). Mısır Koçanında Sülfürik Asit, Hidrojen Peroksit Ve Ultrases Dalga Ön İşlemleri İle Çözünmüş Şeker Üretiminin Optimizasyonu, 16.
- Devi B., R., 2015, Recombinant DNA Technology And Bio-Informatics, *Paramount Publishing House*, 144-148.
- Dong, Z., Li, N., Dong, A., Ma, B., Yu, C., Chu, T., & Liu, Q. (2020). Enhancement of Interface between Lignocellulosic Fibers and Polypropylene Matrix via the Structure Alteration of Lignin at Elevated Temperatures. *Materials*, 13(23), 5428.
- Ezeilo U.R., Zakaria I.I., Wahab F.H. & R.A. 2017 "Enzymatic Breakdown of Lignocellulosic Biomass: The Role of Glycosyl Hydrolases and Lytic Polysaccharide Monooxygenases", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:4, 647-662.
- Feng, X., Tang, H., Han, B., Lv, B., Li C. 2016 "Enhancing the Thermostability of β -Glucuronidase by Rationally Redesigning the Catalytic Domain Based on Sequence Alignment Strategy" *Industrial & Engineering Chemistry Research* 55 (19), 5474-5483
- Firidin, Ş. (2010). Rekombinant DNA Teknolojisi, Yunus Araştırma Bülteni Yıl 10 Sayı 3 Eylül 2010.
- Gülnaz, O., Matyar F., Akgül ., Benli P.P., Beşoluk, Ş., Birhanlı, A., Atlı, E., Yologlu, E., Özdemir, F. A., Şahin, M., Göçmençelebi Ş., Koç, Y., Özel Ç. A., (2017). *Genetik Ve Biyoteknoloji*, 1. Baskı Lisans Yayıncılık, İstanbul ,244.248.
- Güven, R.G, (2011). Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR
- Griffiths, A. J., Gelbart, W. M., Miller, J. H., & Lewontin, R. C. (1999a). Making Recombinant DNA. *Modern Genetic Analysis*. W. H. Freeman. Retrieved August 19, 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21407/>

- Hettiarachchi, S. A., Kwon, Y.-K., Lee, Y., Jo, E., Eom, T.-Y., Kang, Y.-H., Kang, D.-H., et al. (2019). Characterization of an acetyl xylan esterase from the marine bacterium *Ochrovirga pacifica* and its synergism with xylanase on beechwood xylan. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 122.
- Hong S-Y., Lee J-S., Cho K-M., Math R. K., Kim Y-H., Hong S-j., Cho Y-U., Cho S-J., Kim H., Yun H-D. 2007 Construction of the bifunctional enzyme cellulase- β -glucosidase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*", *Biotechnology letters*, 29, 931-936
- Hu, X., Cui, Y., Lu, X., Song, W., Lei, L., Zhu, J., Lai, J., et al. (2020). Maize WI5 encodes an endo-1,4- β -xylanase required for secondary cell wall synthesis and water transport in xylem. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(10), 1607–1624.
- Huang, D., Liu, J., Qi, Y., Yang, K., Xu, Y., & Feng, L. (2017). Synergistic hydrolysis of xylan using novel xylanases, β -xylosidases, and an α -l-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 6023–6037.
- Huda, H., & Öner, F. (1997). Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretilen Peptid-Protein İlaçlar, 12.
- Jaramillo, P. M., Gomes, H. A., Monclaro, A. V., Silva, C. O. and Filho, E. X. (2015). Lignocellulose-degrading enzymes. In *Fungal Biomolecules* (eds V. K. Gupta, R. L. Mach and S. Sreenivasaprasad).
- Jiang, Y., Xin, F., Lu, J., Dong, W., Zhang, W., Zhang, M., Wu, H., et al. (2017). State of the art review of biofuels production from lignocellulose by thermophilic bacteria. *Bioresource Technology*, 245, 1498–1506.
- Var, G., (2019) Termofilik bir aktinomiset olan *thermobifida fusca* efts 7a suşundan selüloz geninin klonlanması ve rekombinant proteininin üretilmesi, 142.
- Karataş, E., (2015) Oksalat Dekarboksilaz Enziminin Rekombinant DNA Teknolojisi İle Üretimi Ve Karakterizasyonu
- Karataş M., (2014) Moleküler Biyoloji. 2. Baskı, Ankara, 291, 296, 305.
- Kolören, Z., Çil , E., Ayaz, E. Ve Karaman, Ü. (2017). RFLP Yönteminin Parazitolojide Uygulama Alanları. *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.*, 2017; 7(2): 215-225 *Ordu Univ. J. Sci. Tech.*, 2017; 7(2): 215-225 e-ISSN: 2146-6459
- Kuk, S., ve Erensoy, A. (2008.). Gen Klonlama, Plazmit Seçimi ve *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Uygulamaları, 7.

- Kulyashov, M., Peltek, S. E., & Akberdin, I. R. (2020). A Genome-Scale Metabolic Model of 2,3-Butanediol Production by Thermophilic Bacteria *Geobacillus icigianus*. *Microorganisms*, 8(7), 1002.
- Lee, C. C., Kibblewhite, R. E., Wagschal, K., Li, R., Robertson, G. H., & Orts, W. J. (2012). Isolation and characterization of a novel GH67 α -glucuronidase from a mixed culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(8), 1245–1251.
- Liu, J., Basit, A., Miao, T., Zheng, F., Yu, H., Wang, Y., Jiang, W., et al. (2018). Secretory expression of β -mannanase in *Saccharomyces cerevisiae* and its high efficiency for hydrolysis of mannans to manno oligosaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 10027–10041.
- Madadi M., Tu Y., Abbas A. 2017 “Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production”, *Electronic Journal of Biology*, 13:2, 135-143.
- Maitan-Alfenas G.P., Visser E.M., Guimaraes V.M. 2015 “Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Converting Food Waste in Valuable Products”, *Current Opinion in Food Science*, 1:44-49.
- Malgas, S., Mafa, M. S., Mkabayi, L., & Pletschke, B. I. (2019). A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 187.
- Martínez, P. M., Appeldoorn, M. M., Gruppen, H., & Kabel, M. A. (2016). The two *Rasamsonia emersonii* α -glucuronidases, ReGH67 and ReGH115, show a different mode-of-action towards glucuronoxylan and glucuronoxyloligosaccharides. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 105.
- Martins, M., Dinamarco, T. M., & Goldbeck, R. (2020). Recombinant chimeric enzymes for lignocellulosic biomass hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 140, 109647.
- Mierzwa, M., Tokarzewska-Zadora, J., Deptuła, T., Rogalski, J., Szczodrak, J.,. (2005). Purification and Characterization of an Extracellular α -D-Glucuronidase from *Phlebia radiata*. *Preparative biochemistry & biotechnology*.
- Mohapatra, S. B., & Manoj, N. (2019). Structure of an α -glucuronidase in complex with Co^{2+} and citrate provides insights into the mechanism and substrate recognition in the family 4 glycosyl hydrolases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 518(2), 197–203.
- Mohapatra, S., Mishra, S. S., Bhalla, P., & Thatoi, H. (2019). Engineering grass biomass for sustainable and enhanced bioethanol production. *Planta*, 250(2), 395–412.

- Morais S., Heyman A., Barak Y., Caspi J., Wilson D.B., Lamed R., Shoseyov O., Bayer E.A. 2010 “Enhanced Lignocellulose Conversion to Biofuels with Thermophilic Bacteria and Thermostable Enzymes”, *Journal of Biotechnology*, 147, 205-11.
- Østby, H., Hansen, L. D., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., & Várnai, A. (2020). Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: Principles, recent advances and perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9–10), 623–657.
- Puchart, V., Gjermansen, M., Mastihubová, M., Mørkeberg Krogh, K. B. R., & Biely, P. (2020). Positional specificity of *Flavobacterium johnsoniae* acetylxylnan esterase and acetyl group migration on xylan main chain. *Carbohydrate Polymers*, 232, 115783.
- Rogowski, A., Baslé, A., Farinas, C. S., Solovyova, A., Mortimer, J. C., Dupree, P., Gilbert, H. J., et al. (2014). Evidence That GH115 α -Glucuronidase Activity, Which Is Required to Degrade Plant Biomass, Is Dependent on Conformational Flexibility. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1), 53–64.
- Rosa, L., Ravanal, M. C., Mardones, W., & Eyzaguirre, J. (2013). Characterization of a recombinant α -glucuronidase from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Biology*, 117(5), 380–387.
- Seemakram, W., Boonrung, S., Aimi, T., Ekprasert, J., Lumyong, S., & Boonlue, S. (2020). Purification, characterization and partial amino acid sequences of thermo-alkali-stable and mercury ion-tolerant xylanase from *Thermomyces dupontii* KKU-CLD-E2-3. *Scientific Reports*, 10, 21663.
- Septiningrum, K., Ohi, H., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., Sermsathanaswadi, J., et al. (2015). The GH67 α -glucuronidase of *Paenibacillus curdianolyticus* B-6 removes hexenuronic acid groups and facilitates biodegradation of the model xylooligosaccharide hexenuronosyl xylotriase. *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 28–35.
- Shallom, D., Golan, G., Shoham, G., & Shoham, Y. (2004). Effect of Dimer Dissociation on Activity and Thermostability of the α -Glucuronidase from *Geobacillus stearothermophilus*: Dissecting the Different Oligomeric Forms of Family 67 Glycoside Hydrolases. *Journal of Bacteriology*, 186(20), 6928–6937.
- Shao, W., Obi, S.K.C. Puls, J Wiegell, J.,. (1995). Purification and Characterization of the (alpha)-Glucuronidase from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485, an Important Enzyme for the Utilization of Substituted Xylans. *Applied and environmental microbiology*. 61.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. 2016 “Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview”, *Bioresource Technology*, 199, 76–82.

- Suresh, C.; Kitaoka, M.; Hayashi, K. 2003 “A Thermostable Non-xylanolytic α - Glucuronidase of *Thermotoga maritima* MSB8”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67:11, 2359-2364.
- Suwannarangsee, S., Bunterngsook, B., Arnthong, J., Paemanee, A., Thamchaipenet, A., Eurwilaichitr, L., Laosiripojana, N., Champreda, V. 2012 “Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design”, *Bioresource Technology* 119, 252–261
- Soydemir, E., ve Aksoy, Z.B. 2017 “Rekombinant DNA teknolojisi ve günümüzdeki kullanımı” *Güncel Gastroenteroloji* 21/1.
- Sun, R. (2020). Lignin Source and Structural Characterization. *ChemSusChem*, 13(17), 4385–4393.
- Squillaci, G., Esposito, A., Cara, F., Morana, A., (2017). Free and immobilized thermophilic alpha-L-arabinofuranosidase for arabinose production.. *Archives of Industrial Biotechnology*.
- Şahin, O., (2013) Rekombinant Dna Teknolojisinin Eczacılıktaki Uygulamaları
- Taylor, S., 2019, The Past, Present, and Future of Recombinant DNA Technology, *Capstone Papers*, 23.
- Toor, M., Kumar, S. S., Malyan, S. K., Bishnoi, N. R., Mathimani, T., Rajendran, K., & Pugazhendhi, A. (2020). An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*, 242, 125080.
- Turner P., Mamo G., Karlsson E.N. 2007 “Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining”, *Microbial cell factories*, 6.
- Van den Burg, B. 2003 “Extremophiles as a source for novel enzymes”, *Current Opinion in Microbiology*, 6, 213–218.
- Van Dyk J.S., Pletschke B. I. 2012 “A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy”, *Biotechnology Advances*
- Wang, F., Ouyang, D., Zhou, Z., Page, S. J., Liu, D., & Zhao, X. (2021). Lignocellulosic biomass as sustainable feedstock and materials for power generation and energy storage. *Journal of Energy Chemistry*, 57, 247–280.
- Wang, W., Yan, R., Nocek, B. P., Vuong, T. V., Di Leo, R., Xu, X., Cui, H., et al. (2016). Biochemical and Structural Characterization of a Five-domain GH115 α -Glucuronidase from the Marine Bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40T. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(27), 14120–14133.
- Wang, Y., Sakka, M., Yagi, H., Kaneko, S., Katsuzaki, H., Kunitake, E., Kimura, T., et al. (2018). *Ruminiclostridium josui* Abf62A-Axe6A: A tri-functional xylanolytic

enzyme exhibiting α -l-arabinofuranosidase, endoxylanase, and acetylxyloesterase activities. *Enzyme and Microbial Technology*, 117, 1–8.

Wu, X., Zhang, S., Zhang, Q., Zhao, Y., Chen, G., Guo, W., & Wang, L. (2020). The contribution of specific subsites to catalytic activities in active site architecture of a GH11 xylanase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8735–8745.

Xing, H., Zou, G., Liu, C., Chai, S., Yan, X., Li, X., Liu, R., et al. (2021). Improving the thermostability of a GH11 xylanase by directed evolution and rational design guided by B-factor analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109720.

Xu Q., Adney W.S., Ding S-Y., Micheal H.E. 2007 “Cellulases For Biomass Conversion”, Industrial Enzymes, Poliana J., MacCabe A. P., Springer, Dordrecht

Yan, R., Vuong, T. V., Wang, W., & Master, E. R. (2017). Action of a GH115 α -glucuronidase from *Amphibacillus xylanus* at alkaline condition promotes release of 4- O -methylglucopyranosyluronic acid from glucuronoxylan and arabinoglucuronoxylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 104, 22–28.

Zaide, G., Shezifi, D., Shulami, S., Zolotnitsky, G., Golan, G., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y.,. (2001). Biochemical characterization and identification of catalytic residues in alpha-glucuronidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *European journal of biochemistry*

Zhu, M., Zhang, L., Yang, F., Cha, Y., Li, S., Zhuo, M., Huang, S., et al. (2020). A Recombinant β -Mannanase from *Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27: Biochemical Characterization and Its Thermostability Improvement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(3), 818–825.