

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Jiangella aurantiaca ENKAPSÜLİN SİSTEMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Miray ŞAHİNKAYA

KASIM 2023
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Jiangella aurantiaca* ENKAPSÜLİN SİSTEMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Miray ŞAHİNKAYA

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTORA (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27 / 09 / 2023

Tezin Savunma Tarihi : 02 / 11 / 2023

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
ORCID : - - -

Trabzon 2023

ÖNSÖZ

“*Jiangella aurantiaca* enkapsülin sisteminin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu” başlıklı doktora tezi, 120Z860 numaralı 1002 TÜBİTAK projesiyle desteklenmiştir.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını ve her türlü desteği benden esirgemeyen ve tez süresi boyunca tecrübe, fikir ve bilgilerinden her an yararlandığım, sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, biyoinformatik alanda edindiğim bilgi birikimini borçlu olduğum Doç. Dr. Halil İbrahim Güler’e ve tezimin kritik anında manevi desteği ile çalışmalarımın ilerlemesine katkı sağlayan Prof. Dr. Kadriye İNAN’a teşekkür ederim.

Doktora tezim süresince, danışmanımdan sonra bana en büyük desteği veren, bilgi, fikir ve tecrübelerini benimle her zaman paylaşan, tezimin ilerlemesinde çok büyük katkıları olan ve manevi olarak bana her zaman cesaret veren sayın Dr. Öğretim Üyesi Fulya AY ŞAL’a, özel olarak teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, doktora dönemi boyunca, yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan başta Dr. Öğretim Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK olmak üzere, Arife KAÇIRAN’a ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç verip yanımda olan ve her konuda bana yardımcı olan değerli aileme ve sıkıntılı anlarımda varlığını hissettiren arkadaşlarıma minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Miray ŞAHİNKAYA

Trabzon 2023

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Jiangella aurantiaca* enkapsülün sisteminin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 02/11/2023

Miray ŞAHİNKAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	XI
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Enkapsülinler.....	1
1.1.1. Enkapsülin Yapısı	2
1.1.2. Enkapsülin ile Yapılan Çalışmalar.....	5
1.2. Dyp (Boya Giderici Peroksidaz)	11
1.2.1. Dyp'nin Katalitik Mekanizması	13
1.2.2. Dyp'lerin Kullanım Alanları	17
1.3. Oligo-1,6- α -glukosidaz	20
1.3.1. Oligo-1,6- α -glukosidazın Katalitik Mekanizması.....	20
1.3.2. Oligo-1,6- α -glukosidazın Kullanım Alanları	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1. Malzemeler.....	24
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler.....	24
2.1.2. Kullanılan Bakteri ve Vektörler	25
2.1.3. Kullanılan Besiyerileri	26

2.2. Biyoinformatik Araçlar ve Veritabanları	26
2.3. Klonlama Çalışmaları.....	27
2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	27
2.3.2. JauEnc ve JauDyp Genlerinin Klonlanması.....	28
2.3.3. Oligo-1,6- α -glukosidaz Geninin (AaySuc) Klonlanması	31
2.3.4. Oligo-1,6- α -glukosidaz Genine CLP (Kargo Yükleme Peptiti) Kodlayıcı Dizisinin Eklenerek (AaySucCLP) Klonlanması.....	32
2.4. Ekspresyon ve Saflaştırma Çalışmaları.....	34
2.4.1. JauEnc, JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP Genlerinin Ekspresyonu	34
2.4.2. JauEnc, JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP Proteinlerinin Saflaştırılması.....	34
2.4.3. JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP Enzimlerinin Aktivite Reaksiyonları.....	35
2.4.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	36
2.4.5. SDS PAGE Jel Elektrofrezisi ile Proteinlerin Görüntülenmesi.....	36
2.4.6. Diyaliz	37
2.5. Kapsülasyon Çalışmaları.....	37
2.5.1. <i>In vitro</i> 'da pH Aracılı Kapsülasyon	37
2.5.2. Native PAGE.....	38
2.5.3. JauDyp Zimogram Analizi.....	39
2.5.4. AaySuc ve AaySucCLP Zimogram Analizi	39
2.5.5. JauEnc'in DLS ile Analizi	39
2.5.6. JauEnc'in Elektron Mikroskobu ile Analizi.....	40
2.6. Karakterizasyon Çalışmaları	40
2.6.1. JauEnc'in Karakterizasyonu.....	40
2.6.2. JauDyp, AaySuc, AaySucCLP, Enkapsülinlenen JauDyp ve Enkapsülinlenen AaySucCLP Enzimlerinin Karakterizasyonları.....	41
3. BULGULAR.....	46

3.1. Biyoinformatik Çalışmalar	46
3.1.1. JauEnc ile İlgili Yapılan Biyoinformatik Çalışmalar	46
3.1.2. JauDyp ile İlgili Yapılan Biyoinformatik Çalışmalar	48
3.1.3. AaySuc ile İlgili Yapılan Biyoinformatik Çalışmalar	50
3.2. Klonlama Çalışmaları	54
3.2.1. <i>JauEnc</i> 'in Klonlanması	54
3.2.2. <i>JauDyp</i> 'nin Klonlanması	55
3.2.3. <i>AaySuc</i> ve <i>AaySucCLP</i> 'nin Klonlanması	55
3.3. Ekspresyon ve Saflaştırma Çalışmaları	56
3.3.1. JauEnc ve JauDyp'nin SDS PAGE Görüntüleri	56
3.3.2. JauDyp'nin ABTS Substratıyla Yapılan Aktivite Testi	57
3.3.3. AaySuc ve AaySucCLP SDS PAGE Görüntüsü	57
3.3.4. AaySuc ve AaySucCLP'nin α -pNPG Substratıyla Yapılan Aktivite Testi	58
3.4. Kapsülasyon Çalışmaları	59
3.4.1. JauDyp Kapsülasyonunun Zimogram ve Native PAGE Karşılaştırması	59
3.4.1. AaySucCLP Kapsülasyonunun Zimogram ve Native PAGE Analizlerinin Karşılaştırması	59
3.4.2. JauEnc'in DLS ile Analizi	60
3.4.3. JauEnc'in Elektron Mikroskobu ile Analizi	61
3.5. Karakterizasyon Çalışmaları	61
3.5.1. JauEnc'in Karakterizasyonu	61
3.5.2. JauEnc ile Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin Karakterizasyonları	65
3.5.3. AaySuc, JauEnc ile Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin Karakterizasyonları	74
4. TARTIŞMA	85
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	102

6. KAYNAKLAR	106
7. EKLER.....	118
ÖZGEÇMİŞ	



Doktora Tezi

ÖZET

Jiangella aurantiaca ENKAPSÜLİN SİSTEMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU

Miray ŞAHİNKAYA

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2023, 129 Sayfa

Enkapsülinler, kendilerine özgü kargo proteinleri bulunan, doğal, bakteri kaynaklı ve protein yapılı kapsüllerdir. Bu çalışmada, *Jiangella aurantiaca* 8K307'nin peroksidaz- enkapsülin sistemi karakterize edildi. Ayrıca, enkapsülinle ilişkisiz *Anoxybacillus ayderensis* A9'in oligo-1,6- α -glukosidazına, Dyp'ye ait olan kargo yükleme peptidi (CLP) eklenerek, enkapsülinin oligo-1,6- α -glukosidaz üzerindeki etkileri araştırıldı.

Enkapsülin, Dyp, oligo-1,6- α -glukosidaz ve CLP etiketli oligo-1,6- α -glukosidaz genleri, rekombinant olarak üretildiler ve gen ekspresyonlarının ardından saf olarak elde edildiler.

Enkapsülinin TEM ve DLS analizleri ile 24 nm'lik kapsül yapısı belirlendi. Kapsül formun stabil olduğu fizyolojik koşullar belirlendi. Enkapsülinin, Dyp ve CLP etiketli oligo-1,6- α -glukosidaz ile *in vitro* kapsülasyonları sağlandı. Zimogram ve Native PAGE analizleri ile kapsülasyonlar tespit edildi.

Enkapsülinlenen ve serbest Dyp, enkapsülinlenen ve serbest oligo-1,6- α -glukosidaz ve CLP etiketi bulunmayan oligo-1,6- α -glukosidazın, optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametreleri belirlendi. Sürfaktanlar, metal şelatörler, indirgeyici ajanlar, organik çözücüler ve metallerin Dyp, oligo-1,6- α -glukosidaz ve CLP etiketi bulunan oligo-1,6- α -glukosidaz üzerindeki etkileri test edildi.

Sonuçta, enkapsülinin özel kargo proteini olan Dyp ve ilişkisiz kargo proteini olan oligo-1,6- α -glukosidaz üzerindeki koruyucu etkileri ayrıntılı olarak karakterize edildi.

Anahtar Kelimeler: Enkapsülin, Dyp, oligo-1,6- α -glukosidaz

PhD. Thesis

SUMMARY

CLONING, EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF THE *Jiangella aurantiaca* ENCAPSULIN SYSTEM

Miray ŞAHİNKAYA

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2023, 129 Pages

Encapsulins are natural, bacterial-derived, protein-structured capsules with specific cargo proteins. In this study, the peroxidase-encapsulin system of *Jiangella aurantiaca* 8K307 was characterized. In addition, the effects of encapsulin on oligo-1,6- α -glucosidase were investigated by adding the cargo loading peptide (CLP) belonging to Dyp to the oligo-1,6- α -glucosidase of *Anoxybacillus ayderensis* A9, which is unrelated to encapsulin.

Encapsulin, Dyp, oligo-1,6- α -glucosidase and CLP-labeled oligo-1,6- α -glucosidase genes were produced recombinantly and obtained in pure form after gene expression. The 24 nm capsule structure of encapsulin was determined by TEM and DLS analyses.

Physiological conditions under which the capsule form was stable were determined. In vitro encapsulation of encapsulin was achieved with Dyp and CLP labeled oligo-1,6- α -glucosidase. Encapsulations were detected by zymogram and Native PAGE analyses.

Optimum pH, optimum temperature and kinetic parameters of encapsulated and free Dyp, encapsulated and free oligo-1,6- α -glucosidase, and oligo-1,6- α -glucosidase without CLP label were determined. The effects of surfactants, metal chelators, reducing agents, organic solvents, and metals on Dyp, oligo-1,6- α -glucosidase, and CLP-tagged oligo-1,6- α -glucosidase were tested.

As a result, the protective effects of encapsulin on the specific cargo protein Dyp and the unrelated cargo protein oligo-1,6- α -glucosidase were characterized in detail.

Key Words: Encapsulin, Dyp, oligo-1,6- α -glucosidase

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Enkapsülin ve kargo proteinin genomdaki konumu	2
Şekil 2. Enkapsülinin yapısı	3
Şekil 3. Enkapsülin por tipleri.....	4
Şekil 4. Kargo yükleme peptidinin (E) korunmuş amino asit dizisi	5
Şekil 5. Enkapsülin sistemlerinin sınıfları	7
Şekil 6. Enkapsülin ve kargo proteinlerin dağılımı	8
Şekil 12. Ferrodoksin katlanması	12
Şekil 13. DypB'nin yapısı ve katalitik bölgesi	14
Şekil 14. Distal aspartatın ıslak ve kuru durumundaki katalitik mekanizma	15
Şekil 15. Dyp'nin katalitik mekanizması	16
Şekil 16. Maltozun hidrolizi	20
Şekil 17. Oligo-1,6- α -glukosidazın yapısı ve katalitik bölgesi	21
Şekil 18. <i>AaySuc</i> genine kargo yükleme peptidinin (CLP) eklenmesi.....	33
Şekil 19. JauEnc klonunun NCBI Blast analizi sonucu	46
Şekil 20. JauEnc'in InterPro analizi sonucu.....	46
Şekil 21. JauEnc'in Crysol programı ile temsili yarıçapının belirlenmesi.....	47
Şekil 22. JauEnc'in temsili üç boyutlu yapısı.....	47
Şekil 23. JauDyp klonunun NCBI BLAST analizi	48
Şekil 24. JauDyp'nin InterPro analizi	48
Şekil 25. JauDyp'nin temsili 3 boyutlu yapısı	49
Şekil 26. Uniprotta belirlenmiş P sınıfı Dyp'lerle yapılan Clustal Omega sonucu	50
Şekil 27. <i>AaySuc</i> klonunun NCBI BLAST analizi sonucu.....	51
Şekil 28. <i>AaySuc</i> 'in InterPro analizi sonucu	51

Şekil 29. Swiss-Model'de oluşturulan AaySuc'in üç boyutlu yapısı	52
Şekil 30. AaySuc'in Clustal Omega ile hizalaması	53
Şekil 31. AaySuc ve AaySuc CLP gen dizilerinin hizalaması	54
Şekil 32. <i>JauEnc</i> , <i>JauDyp</i> ve <i>AaySucCLP</i> klonlamalarından elde edilen DNA fragmentleri	55
Şekil 33. AaySuc ve AaySucCLP'nin klonlanması	56
Şekil 34. <i>JauDyp</i> ve <i>JauEnc</i> proteinlerinin SDS PAGE analizi	56
Şekil 35. <i>JauDyp</i> 'nin ABTS substratına karşı aktivite testi.....	57
Şekil 36. AaySucCLP ve AaySuc proteinlerinin SDS PAGE analizi	58
Şekil 37. AaySuc ve AaySucCLP'nin α -pNPG substratına karşı aktiviteleri	58
Şekil 38. <i>JauDyp</i> zimogramı ve native jel görüntüleri.....	59
Şekil 39. oligo-1,6- α -glukosidaz zimogram ve native jel görüntüleri	60
Şekil 40. Enkapsülin DLS analizi	60
Şekil 41. <i>JauEnc</i> 'in TEM görüntüsü	61
Şekil 42. <i>JauEnc</i> 'in kapsül oluşturma özelliği üzerine pH'nın etkisi	62
Şekil 43. <i>JauEnc</i> 'in kapsül oluşturma özelliği üzerinde sıcaklık etkisi	63
Şekil 44. Enkapsülinin kapsül oluşturma özelliği üzerine indirgeyici ajanların etkisi	63
Şekil 45. Tripsinin Enkapsülin ve kargo protein üzerindeki etkisi	64
Şekil 46. 1 ve 5 mM'lik metal iyonlarının <i>JauEnc</i> üzerindeki etkisi.....	65
Şekil 47. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen <i>JauDyp</i> 'nin optimum pH'sı.....	65
Şekil 48. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen <i>JauDyp</i> 'nin optimum sıcaklığı.....	66
Şekil 49. ABTS konsantrasyon-absorbansının doğrusal grafiği	67
Şekil 50. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen <i>JauDyp</i> 'nin ABTS substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri.....	67
Şekil 51. Kimyasalların <i>JauDyp</i> aktivitesine etkileri	68
Şekil 52. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen <i>JauDyp</i> 'nin kimyasal etkilerinin karşılaştırılması.....	69
Şekil 53. Metallerin <i>JauDyp</i> aktivitesi üzerindeki etkisi	69

Şekil 54. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp üzerindeki metal etkilerinin karşılaştırılması.....	70
Şekil 55. %5 oranındaki organik çözücülerin JauDyp aktivitesi üzerindeki etkisi.....	71
Şekil 56. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin organik çözücü etkilerinin karşılaştırılması.....	71
Şekil 57. JauDyp' nin termal kararlılığı.....	72
Şekil 58. JauDyp'nin pH kararlılığı.....	73
Şekil 59. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin kararlılıklarının karşılaştırılması.....	73
Şekil 60. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP ve AaySuc'ın optimum pH'sı.....	74
Şekil 61. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin ve AaySuc'ın optimum sıcaklığı.....	75
Şekil 62. α -pNPG sönme katsayısının elde edildiği doğrusal grafik	75
Şekil 63. AaySuc, AaySucCLP ve AaySucCLP-JauEnc'in α -pNPG'ye karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri	76
Şekil 64. Sürfaktanların, şelatlayıcı ve indirgeyici ajanların AaySuc ve AaySucCLP aktiviteleri üzerindeki etkileri	77
Şekil 65. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP üzerinde sürfaktanların, indirgeyici ve şelatlayıcı ajanların etkilerinin karşılaştırılması	78
Şekil 66. Metallerin AaySuc ve AaySucCLP'nin aktiviteleri üzerindeki etkisi	79
Şekil 67. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin karşılaştırmalı metal etkisi	80
Şekil 68. %5 oranındaki organik çözücülerin AaySuc ve AaySucCLP aktiviteleri üzerindeki etkileri	81
Şekil 69. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin karşılaştırmalı organik çözücü etkisi.....	82
Şekil 70. AaySuc ve AaySucCLP'nin pH kararlılığı	82
Şekil 71. AaySuc ve AaySucCLP'nin Termal Kararlılığı.....	83
Şekil 72. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin kararlılıklarının karşılaştırılması.....	84

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Enkapsülin ailelerinin dağılımı	6
Tablo 2. Ligninin yapısında bulunan bağ çeşitleri	17
Tablo 3. Dyp'nin deşrede edebildiğı boyalar ve deşredasyon oranları	19
Tablo 4. JauEnc ve JauDyp için tasarlanan primerler	28
Tablo 5. JauEnc ve JauDyp için oluşturulan PCR Şartları.....	29
Tablo 6. Oligo-1,6- α -glukosidaz (AaySuc) için oluşturulan PCR Şartları	32
Tablo 7. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin kinetik verileri	68
Tablo 8. AaySuc, enkapsülinli ve enkapsülinli AaySucCLP'nin kinetik verileri	76
Tablo 9. Literatürde bulunan Dyp'lerin ABTS'ye karşı kinetik verileri.....	87
Tablo 10. Oligo-1,6- α -glukozidazın α -pNPG'ye karşı kinetik verileri.....	92
Tablo 11. Dyp ve oligo-1,6- α -glukosidaz substratları ve kofaktörler	97

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
ε	: Epsilon/ Sönme katsayısı
μg	: Mikrogram
mg	: Miligram
g	: Gram
μL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
L	: Litre
nmol	: Nanomol
μmol	: Mikromol
mmol	: Milimol
nM	: Nanomolar
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
M	: Molar
nm	: Nanometre
μm	: Mikrometre
sn.	: Saniye
dk.	: Dakika
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
U	: Ünite
bp	: Baz çifti
kb	: Kilo baz
Da	: Dalton
kDa	: Kilo Dalton
KCl	: Potasyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
MgCl_2	: Magnezyum klorür
CaCl_2	: Kalsiyum klorür

CoCl ₂	: Kobalt (II) klorür
MnCl ₂	: Mangan (II) klorür
HgCl ₂	: Cıva (II) klorür
NiCl ₂	: Nikel (II) klorür
CoCl ₂	: Kobalt (II) klorür
FeSO ₄	: Demir (II) sülfat
CuSO ₄	: Bakır (II) sülfat
GuHCl	: Guanidyum klorit
HCl	: Hidrojen klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
Tween-20	: Polioksietilen (20) sorbitan monolaurat
Triton X-100	: 2-[4-(2,4,4-trimetilpentan-2-yl)fenoksi]etanol
EGTA	: Etilen glikol-bis(β-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
DTT	: Dithiothreitol
β-me	: β-merkaptetanol
DMSO	: Dimetil sülfoksit
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum fosfat
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
ddH ₂ O	: Çift distile su
LB	: Luria Bertani Sıvı Besiyeri
amp	: Ampisilin
kan	: Kanamisin
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
T _m	: Erime Sıcaklığı
<i>lacZα</i>	: Beta- galaktosidazın α domaininin geni
OD	: Optik Yoğunluk
UV	: Ultraviyole
IPTG	: Isopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid

BSA	: Sığır serum albumini
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
rpm	: Dk.daki devir sayısı
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid
ABTS	: Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfonik Asit)
α -pNPG	: 4-Nitrofenil α -D-glukopiranosit
α -pNP	: 4-Nitrofenil
k_{cat}	: Turnover katsayısı
VP	: Versatil Peroksidaz
LiP	: Lignin Peroksidaz
MnP	: Mangan Peroksidaz
CLP	: Kargo yükleme peptidi
Dyp	: Boya giderici Peroksidaz
TEM	: Geçirimli (transmisyon) elektron mikroskobu
NCBI	: National Centre for Biotechnology Information
His, H	: Histidin
Cys, C	: Sistein
Tyr, Y	: Trozin
Trp, W	: Triptofan
Asp, D	: Aspartik asit
Glu, E	: Glutamik asit
Arg, R	: Arjinin
Phe, F	: Fenilalanin

1. GENEL BİLGİLER

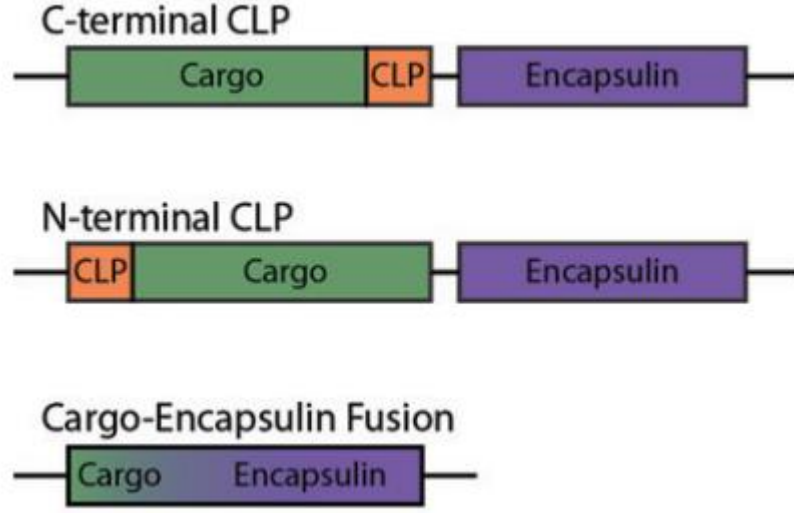
1.1. Enkapsülinler

Enkapsülinler, ilk olarak, 1994 yılında, hücre filtratından büyük agregat formunda elde edilmişlerdir. TEM görüntülerinde büyük bir protein yığını olarak görülen bu yapı, patolojik etkisi olduğu düşünülerek bakteriyosin olarak adlandırılmıştır (Valdes-Stauber, 1994). 2007 yılında, *Pyrococcus furiosus* kaynaklı enkapsülin, yaklaşık 7 MDa ağırlığındaki virüs benzeri PfV olarak tanımlanmıştır (Akita vd., 2007). 2008 yılında ise, Sutter vd. tarafından, *Thermotoga maritima*'ya ait termofilik enkapsülin yapı ilk kez rapor edilmiş ve biyoinformatik analizlere dayanarak *Brevibacterium linens*'deki bakteriyosine homolojik olarak benzer olan bu yapının, proteolitik aktivitesinin olmadığını doğrulanmıştır. Aynı zamanda, *B. linens*'e ait protein agregatının, sanıldığı gibi bir bakteriyosin olmadığını, 21-32 nm büyüklüğünde bir nanokompartman olduğunu ortaya koymuşlardır.

Enkapsülinler, bakterilerin doğal olarak ürettikleri protein yapıları nanokompartmanlardır. Yapısal olarak, ikozahedral virüslere çok benzeyen, kendi kendilerine altbirimlerine dağılıp tekrar bir araya gelebilen esnek bir yapıya sahiptirler (Akita vd., 2007; McHugh vd., 2014; Putri vd., 2015). Ekstrem koşullarda yaşayan belli soylarda bulunurlar (Giessen ve Silver, 2017).

Enkapsülinler, spesifik fonksiyona sahip enzimlerin kapsülasyonunu sağlarlar. Kapsülledikleri bu spesifik enzimler, kargo protein olarak adlandırılırlar. Kargo protein geni, enkapsülin geninin “upstream” bölgesinde, enkapsülin geni ile genellikle 4 baz ‘overlap’ oluşturacak şekilde konumlanmıştır. Ancak, bu durum bazı enkapsülin sistemlerinde farklılık gösterebilmektedir. Enkapsülin kargo proteinin N-terminal bölgesinde bulunmakla birlikte bazen genomda kargo proteinden çok daha uzak bölgelerde yer alabilmektedir (Şekil 1). Kargo proteinlerin C- terminal bölgesinde enkapsülin tarafından kapsüllenmeyi sağlayan CLP (Kargo Yükleme Peptidi) bölgesi bulunur (Cassidy-Amstutz vd, 2016). Bazı suşlarda, kargo protein enkapsülinin “downstream” bölgesinde yer alabilmektedir. CLP, bazen N-terminalde bulunabilir. Farklı afinitelere sahip CLP'lerin enkapsülinlerin fonksiyonel mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda aynı anda birden fazla proteinin de kapsüllenebildiği

gösterilmiştir. Fakat enkapsülinlerinden uzak bölgelerde bulunan bu kargo proteinlerinin gen ifadelerinin nasıl kontrol edildiği belirsizdir (Nichols vd, 2017).



Şekil 1. Enkapsülin ve kargo proteinin genomdaki konumu (Nichols vd., 2017)

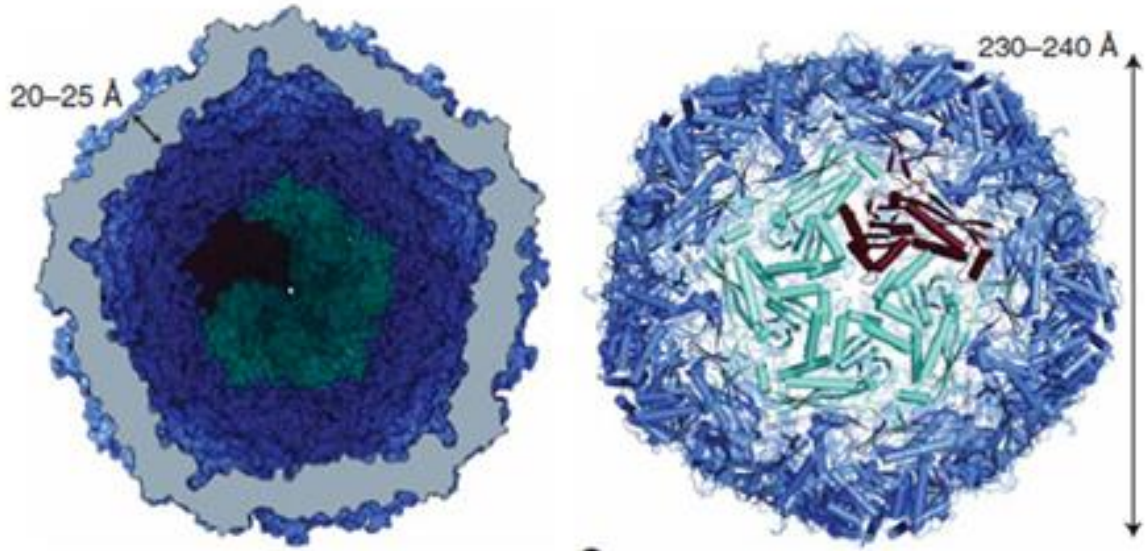
Enkapsülinlerin fizyolojik rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, enkapsülinlerin, enzimlerin stabilizasyonunu ve aktivitesini arttırdığı, hücreyi strese karşı koruduğu ve mineral depoladığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, *M. xhantus*'un enkapsülin geni delesyona uğratılmış ve enkapsülin içeren ve içermeyen *M. xhantus* hücreleri H_2O_2 'ye maruz bırakılmıştır. Sonuçta enkapsülin içeren hücrelerin hayatta kaldığı gözlenmiştir. Aşka bir çalışmada ise, enkapsülini delesyona uğratılan *M. xhantus* petrilerinde sporlanma öncesi gözlenen meyve oluşum formunun gözlenmediği ve hücrenin sporlanmaya geçemediği gözlenmiştir. Literatürde, ökaryotik ferritinin 2000-4000 demir atomu depolama kapasitesi bulunurken, T4 tip enkapsülinin 83000 demir atomu depolayabildiği bildirilmiştir. Rahmanpour ve Bugg ise enkapsülinin lignin aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (Rahmanpour ve Bugg, 2013; Tamura vd., 2015; Giessen ve Silver, 2017; Nichols vd., 2017; Putri vd., 2017).

1.1.1. Enkapsülin Yapısı

Enkapsülinler, 24-42 nm çapında protein yapıları bakteriyel nanokopartmanlardır (Corchero ve Cedano, 2011; Giessen ve Silver, 2019). Enkapsülin geni, 60, 180 ya da 240 protomerli tek tip altbirimi kodlar (Giessen, 2016; Giessen ve Silver, 2019). Bir araya

gelen altbirimler ikozahedral yapı oluştururken, enkapsülin altbirimleri pentamer ya da hekzamerdir (Şekil 2).

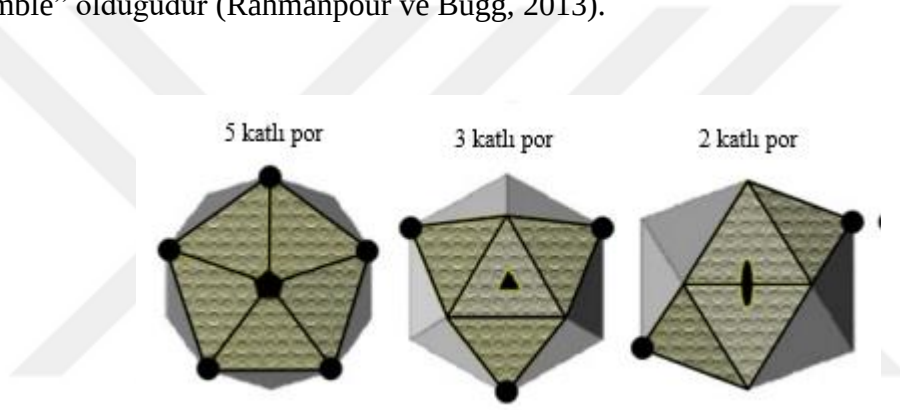
Enkapsülinlerde korunmuş 3 domain görülmektedir; Periferik domain (P), Aksial domain (A), “Elongated” domain (E). Sadece E bölgesi enkapsülin tiplerinde farklılık göstermektedir. T1 enkapsülinlerde E bölgesi daha kısa ve döndürülmüştür. Bu rotasyon komşu birimin E bölgesi ile β -tabaka oluşturmasını sağlar. Bu da daha sıkı bir etkileşimle sonuçlanır. T3 enkapsülinlerinde ise bir ek T3 motifi bulunmaktadır. Bu da T3 kabuğunun daha büyük oluşunu açıklar. *Pyrococcus furiosus* and *Myxococcus xanthus* gibi T3 enkapsülinleri HK96 virüs kapsidiyle uyumludur. *Quasibacillus thermotolerans* ise T4 tipi kabuğa sahiptir (Gabashvili vd., 2020). T1 tip *T. maritima* enkapsülinin E bölgesi, T3 ve T4 tip enkapsülinlere göre daha kısadır (Gabashvili vd., 2020).



Şekil 2. Enkapsülinin yapısı (Sutter vd., 2008)

Yapısal analizler enkapsülinin molekül giriş çıkışını kontrol eden çoklu gözeneklere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Pentamerler arasında, 2 simetrik birim, 3 simetrik birim ve 5 simetrik birim arasında kalan üç tip açıklık bulunmaktadır (Şekil 3). 2 simetrik birim arasındaki açıklık “2 katlı gözenek”, 3 simetrik birim arasındaki açıklık “3 katlı gözenek” ve 5 simetrik birim arasında kalan açıklık “5 katlı gözenek” olarak isimlendirilmiştir. 2 katlı gözenekler, çoklu negatif yükle kaplıdır, 5 katlı gözenekler yüksüzdür ve genellikle sitozol yüzeyine doğru histidin halkası bulundurur. Bu histidin halkalarının metal iyonlarını koordine ettikleri ve por geçirgenliğini değiştirerek Flp aktivitesini etkileyebileceği

gösterilmiştir. 3 katlı gözeneğin yapısı türler arasında korunmamış olmakla birlikte pozitif yüklü kalıntılarla kaplıdır. Gözeneklerin hepsi 5-6 Å olmakla beraber esnektir, kimyasal ortama göre genişleyip daralabilmektedir (Sutter vd, 2008; Snijder vd, 2016; Nichols vd, 2017). Literatürde, mutasyon ile enkapsülin porlarının 11 Å'a kadar genişletildiği bir çalışma da bulunmaktadır (Williams, 2018). Yapılan çalışmalar doğrultusunda bu açıklıklar büyük moleküller için bariyer oluştururken küçük moleküllerin geçişine izin verir. Ara boyların geçip geçmediği ise henüz belirlenmedi. Örnek olarak *Rhodococcus jostii* enkapsülininin gözeneklerinden ciddi derecede büyük olduğu bilinen (1-2 kDa) nitratlı ligninin nasıl geçtiği bilinmemektedir. Bir teori, zincir uçlarının gözeneklerden geçtiğidir. Test edilmemiş olan alternatif hipotez ise enkapsülinin lignini tanıdığına "disassemble" olduğudur (Rahmanpour ve Bugg, 2013).



Şekil 3. Enkapsülin por tipleri (Luque, 2011)

Kargo proteinlerin C-terminalinde yaklaşık 10 aa'lık, hidrofobik bir peptit enkapsülin tanıma dizisi bulunmaktadır (Şekil 4). Bu dizi, yaklaşık 10 amino asitlik, hidrofobik bir peptit oluşturmaktadır ve bu peptit, enkapsülinin her bir alt biriminin iç yüzeyindeki hidrofobik cebe bağlanma özelliğindedir (Sutter vd, 2008). Yapılan çalışmalarda, CLP (Cargo Loading Peptit) kargo proteininden silindiğinde, proteinin kapsüllenemediği ve yabancı proteinlerin C-terminaline eklendiğinde ise kapsüllenebildiği gösterilmiştir (Contreras vd, 2014; Rurup vd, 2014; Tamura vd, 2015; Cassidy-Amstutz vd, 2016; Giessen ve Silver, 2017).

1.1.2. Enkapsülin ile Yapılan Çalışmalar

1.1.2.1. Biyoinformatik Çalışmalar

Radford, 2015 yılında, biyoinformatik analizlerle nanokompartmanları ayrıntılı olarak ele aldığı bir tez yazmıştır. Bu analizlere göre, 8 enkapsülin ailesi tespit edildi (Tablo 1). İlişkili proteinlerden yola çıkarak, enkapsülinlerin, demir-sülfür formasyonunda, siyanid dayanıklılığında, tiol üretiminde bir rolü olduğu düşünülmektedir. Aile 1, başlangıçta, Licolin- M18 ailesi içerisinde yer almaktaydı. Bakteriyosin olduğu sanılıyordu, daha sonra yapılan çalışmalarla, bakteriyi oksidatif strese karşı koruyan virüs benzeri bir nanokompartman olduğu ortaya çıktı. Aile 1, literatürde en çok çalışılan sınıftır. Aile 2, C-terminal siklik nükleotit (cNMP) içerip içermemesine göre iki kategoriye ayrılır. Aile 2A, majör membran proteini I (MMPI) olarak rapor edilmişti. Diğer yandan, cNMP domainine sahip Aile 2B, antibiyotik üretiminde fonksiyona sahip bir enzim olarak önerilmişti. Daha sonra, kükürt metabolizması ve doğal ürün sentezinde rol alan kargo-yükümlü nanokompartmanlar olduğu anlaşıldı (Nichols vd., 2020; Andreas ve Giessen, 2021). Aile 3 ve 4, deneysel olarak karakterize edilmemişlerdir, biyoinformatik analizlere dayalı olarak sınıflandırılmıştır (Giessen, 2022). Reaktif doğal ürün biyosentezi ile ilgili fonksiyona sahip olan Aile 3 sınıfının, daha önce, faj majör kapsit proteini olduğu

düşünülmekteydi. Aile 4, diğer enkapsülinlerden çok daha farklıdır. Hipertermofilik arkelere bulunur (Giessen 2022; Wiryaman ve Tour, 2022).

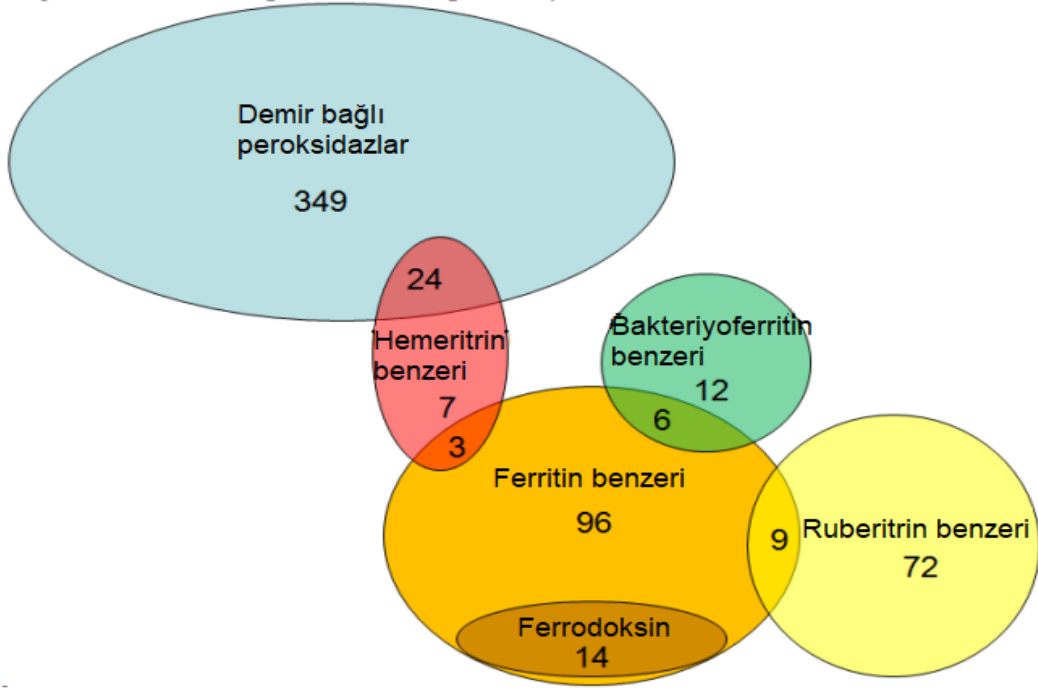
Tablo 1. Enkapsülin ailelerinin dağılımı (Radford, 2015)

Enkapsülin Aileleri	İlişkili Olduğu Tahmin Edilen Kargo Proteinleri	Protein sayısı	Tür sayısı
Aile 1: Licolin benzeri	peroksidaz, ferritin, hemeritritin, rubreritritin, bakteriyoferritin, ferredoksin (CutA1-benzeri, radikal SAM oksidoredüktaz, metaloproteaz)	590	577
Aile 2.1: Büyük membran proteini I benzeri	Sistein disülfüras (Ser-O-asetiltransferaz, rodanez)	644	576
Aile 2.2: FNR bağlanma domaini füzyonları	fumarat/nitrat/küçük oksidantlar (rodanez)	342	171
Aile 3: Lambda kapsit benzeri	Hem bağlı sitokrom P450 benzeri, Monooksijenaz hidrolazlar, undekaprenil-pirofosfat bağlanma proteinleri	22	22
Aile 4: Enterobacteria fajı phiP27 kapsit benzeri	Alfa keto glutarat, dekarboksilaz/2-okzoglutarat dehidrojenazlar	11	10
Aile 5	Anorganik pirofosfatazlar	11	11
Aile 6: Clostridium'a özgü metal tepki kompartmanları	Metal düzenleyici kompartmanlar	6	2
Aile 7: F10 kapsit benzeri	proteaz/enkapsülin füzyonları	8	6
Aile 8: A118 kapsit benzeri	Divalent katyon bağlı hidrolazlar	5	5
Belirlenmemiş		11	11

Likolin benzeri enkapsülinler (Aile 1), 6 sınıf kargo proteini kodlamaktadır ve kodladıkları kargo proteinine göre 6 sınıf enkapsülin sistemi bulunmaktadır. Şekil 5' de gösterilen Venn şemasında kesişim bölgeleri, bazı enkapsüllerin iki aileye ait kargo proteinini aynı anda kargolayabildiğini ifade etmektedir.

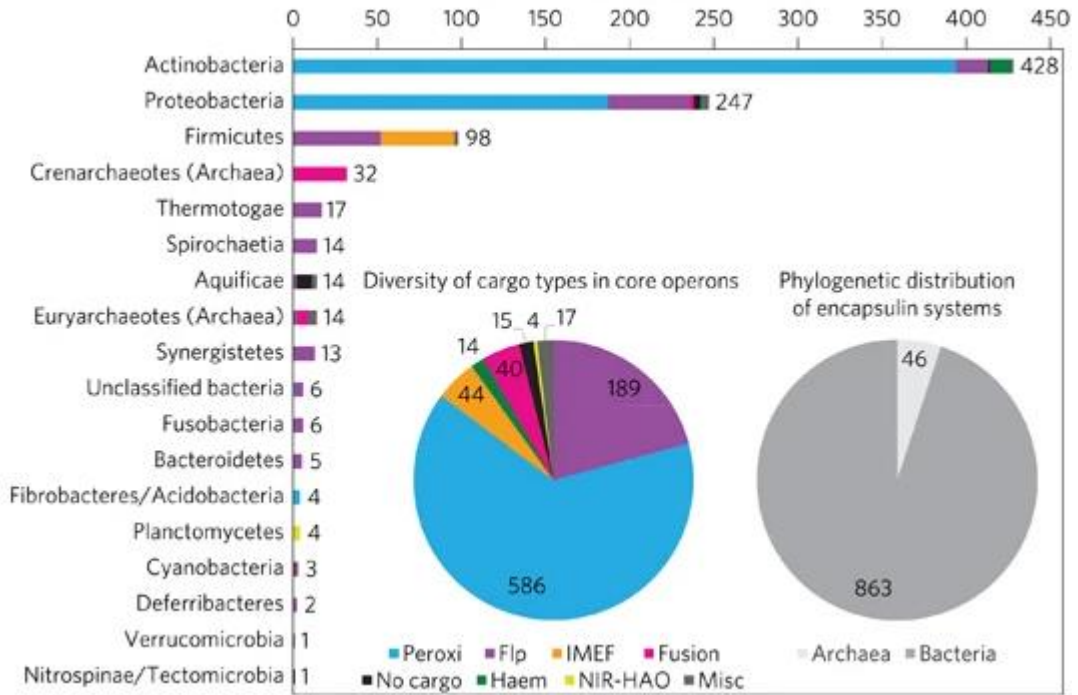
Giessen ve Silver (2017)'ın yaptığı biyoinformatik analizlere göre enkapsülinler, geometrik şekilleri baz alınarak, Flp-füzyon tipi, T1, T3 ve T3 benzeri enkapsülinler olarak 4 sınıfa ayrılmıştır. T1 tipi enkapsülinler, 23-24 nm çapında, 60-merli enkapsülinler olup

altbirimleri sadece pentamerdir. Flp, Peroksi, Hem sistemleri, T1 tipi enkapsülinler içinde yer alır. T3 tipi enkapsülinler, 32-38 nm çapında, 180-merli enkapsülinlerdir. Altbirimler hem pentamer hem hekzamerdir. Örnek olarak, *Pyrococcus furiosus* PfV enkapsülininde 12 pentamer varken, 20 hekzamer vardır. IMEF, Flp, Misc, NIR-HAO sistemleri T3 tipi enkapsülin içermektedir (Giessen, 2016, Giessen ve Silver, 2017).



Şekil 5. Enkapsülin sistemlerinin sınıfları (Radford, 2015)

15 bakteriyal, 2 arkeal enkapsülin sistemi belirlendi. Aktinobakteriler ve Proteo bakteriler ağırlıklı olmak üzere, Firmikülitler de yüksek sayıda enkapsülin tespit edildi. Ayrıca tespit edilen enkapsülinlerden en yaygını peroksidaz kargolayanlardır. Diğerleriyle karşılaştırıldığında, Flp kargolayan enkapsülin sayısı da dikkat çekici seviyededir (Giessen ve Silver, 2017) (Şekil 6).



Şekil 6. Enkapsülin ve kargo proteinlerin dağılımı (Giessen ve Silver, 2017)

1.1.2.2. Fizyolojik Çalışmalar

Enkapsülinin altbirimlerinin in vitro da ayrılıp tekrar bir araya gelerek Dyp'yi paketleyebildikleri gösterilmiştir. pH 3,0'de ve 100 mM NaCl' de enkapsülinin dağılıp, artırılan pH ve seyreltilen alanda tekrar bir araya gelebilmiştir. Enkapsülin pH 4-12 de stabil iken, pH 2,0 ve 13 de dağılan ve dağılmayan kapsüller pH 1,0 ve 14 de ise tamamen dağılmış enkapsülinler gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda enkapsülinin 12 M ürede kısmen açılmışken 7 M GuHCl de tamamen açılmış olduğu görülmüştür (Rahmanpour ve Bugg, 2013; Cassidy-Amstutz 2016).

Herbir altbirim (N-terminalde) CLP bağlanma domainine sahip olmakla beraber, hacimsel kısıtlamalardan dolayı her birime bağlanma mümkün olmamaktadır. *B. linens*' enkapsülin sistemi ile yapılan çalışmada, kapsid başına bir hekzamer Dyp molekülünün kapsüllendiği kütle spektrofotometresiyle gösterilmiştir ve bu çalışmaya göre kapsülasyonun enkapsülin dimerlerinin bir Dyp monomerine bağlanarak gerçekleştiği belirlenmiştir (Snijder vd, 2016; Putri vd, 2016). Literatürde, enkapsülinlerin, enkapsülin başına 12 Flp, 20 hemeritrin, 10 ferrodoksin içerdiğini gösteren kaynaklar mevcuttur. Bu kaynaklara göre, kargo yükleme miktarının iç hacimle sınırlı olmadığı, kapasitenin, kargo proteinin şekline

ve yüklenmesine göre değiştiği anlaşılmaktadır (He vd, 2016; Giessen ve Silver, 2017; Nichols vd, 2017).

Snijder ve arkadaşları (2016), *B. linens*'e ait enkapsülin altbirimlerinin bir araya gelme ve hekzamer Dyp kargo protein yükleme mekanizmasını ayrıntılı olarak incelemişlerdir. Çalışmadaki native kütle spektrofotometre sonuçlarına göre, enkapsülin altbirimleri dimerler oluşturmakta, daha sonra dimerler bir araya gelerek ikozahedral yapıyı oluşturmaktadır. Dyp'nin kapsülasyonu ise 60-mer tamamıyla bir araya gelmeden önce meydana gelmektedir. Dyp'nin yüklenme aşaması kararlı değildir. Bununla birlikte, 58-merli enkapsülinin dahi Dyp kargoladığı gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan bu çalışma, kargo proteinlerinin kapsüllenme zorunluluğu olmadığını da kanıtlamıştır.

Kapsüllemenin kargo proteinlerin stabilizasyonunu artırdığı düşünülmektedir. Enkapsülinlerin mezofilik bakterilerde termostabil olmadığı, ancak pH stabil olduğu ve mekanik fiziksel biyolojik etkilere karşı çok dirençli olduğu, termofiller de sıcaklığa da dirençli olduğu gösterilmiştir. Proteazlara karşı direnç, lusiferaz ve EFGP proteinlerinin tripsinden *Rhodococcus erythropolis* N771 enkapsülini içinde korunmasıyla gösterilmiştir (Tamura vd., 2015).

Flp enkapsülin sistemlerinin-ferritinler gibi-demir depolamada ve oksidatif strese karşı korumada rolü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca oksidatif strese maruz bırakılan enkapsülin mutantlarında hücre gelişimi gözlenmedi. Bu durum da sporulasyona geçiş için enkapsülinlerin gerekli olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, *M. xanthus* da sporulasyondan 48 saat sonra enkapsülin ciddi derecede azalması ve 96 saat sonra tamamen yok olması enkapsülin degradasyonu için özel mekanizmaların olabileceğini düşündürmektedir. Diğer bir teori ise, turnover hızının hücre büyüme hızına göre yavaş olabileceği böylece artan hücre bölünmeleri ile enkapsülin seviyelerinin seyreltildiğidir (McHugh vd, 2014; Nichols vd, 2017).

R. jostii de yapılan çalışmalarda, enkapsülinli Dyp'nin aktivitesinin nitratlı lignin substratına karşı 8 kat arttığı gösterilmiştir. Sebebi açık olmamakla birlikte, enkapsülinin ya enzimin stabilizasyonunu ya da lokal substrat konsantrasyonunu artırmakta olduğu yönünde iki teori öne sürülmüştür (Rahmanpour ve Bugg, 2013).

1.1.2.3. Nanoteknolojik Çalışmalar

Lau ve arkadaşları (2018), split-venüs sistemini kullanarak enkapsülünün kargo proteini kapsüllediğinde memeli hücrelerinde florasan ışıma ile takip edilebileceği bir sistem önermişlerdir.

Bae ve arkadaşları, 2018’de, enkapsülün yüzeyine küçük protein tutucuları (SpyTag (ST)/SpyCatcher (SC) sistemi) eklemişlerdir. SpyTag (ST)/SpyCatcher (SC) sistemi, nanopartikül yüzeyine bağlanan fonksiyonel proteinlerin yanlış katlanmasını önlemek için geliştirilmiştir.

Başka bir çalışmada, Klem ve arkadaşları (2018) tarafından, sistein-knot adı verilen tripsine dirençli küçüp proteini enkapsülünün yüzeyine bağlayarak tripsine dirençli kapsül yapı geliştirilmiştir. Bunun için CLP yerine, sistein-knotu bağlayıcı sülfö-EMCS (N-ε-maleimidocaproyl-sulfosuccinimide ester, Thermo Fisher) kullanarak *in vitro* da bağlanma gerçekleştirmişlerdir.

Enkapsülün, yapılan başka bir çalışmada, sıralı enzim reaksiyonunu hızlandıran bir biyoreaktör olarak kullanıldı (Jenkins vd., 2021).

Moon ve arkadaşları (2014) toksisite göstermeden serbest ilaçlarla benzer etkinlik gösteren hedeflenmiş enkapsülinlenmiş ilaç platformu oluşturmuşlardır. Çalışmada, bir antikanser ön ilacı olan Aldoxorubicin (AlDox) enkapsülinle kargolanmıştır. Aynı zamanda, enkapsülünün C-terminal bölgesine -yani dış yüzeyine- Hepatoselüler karsinom (HCC) hücre bağlanma peptidi (SP94-peptid, SFSIIHTPILPL) bir hedefleme dizisi eklenmiştir. SP94-peptit’in HepG2 hücrelerine etkin ve seçici hedefli verilmesi, floresan mikroskop görüntüleme ile doğrulanmıştır. Ayrıca yapılan MTT analizine göre, enkapsülünün sitotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Enkapsülinler, kapsül formunun, fizyolojik ortama bağlı olarak açılıp kapanabilme özelliğine dayalı olarak, enkapsülün porlarından büyük yapılı inorganik madde birikiminde kullanılmıştır. 2016’da Giessen ve Silver, *Thermotoga maritima*’ya ait enkapsülünü, antimikrobiyal bir gümüş nanopartiküle dönüştürmüşlerdir. Çalışmada, Flp operondan kaldırılmış, enkapsülünün N-terminaline AG4 (NPSSLFRYLPSD) gümüş tanıma peptidi eklenmiştir. Kapsüllenen AgNP’nin *Escherichia coli* CDC B170, *Salmonella typhimurium* CDC 6516–60, *Shigella flexneri* CDC 3591–52, *Pseudomonas aeruginosa* 1C ve *Bacillus subtilis* 168’ a karşı antimikrobiyal aktiviteyi artırdığı test edilmiştir. Künzle ve arkadaşları (2018) altını *T. maritima*’nın enkapsülünü ile kapsüllediler. Zhang ve arkadaşları, kansere

karşı, manyetik hipertermi tedavisinde kullanmışlardır. Bu çalışmada, manyetik demir oksit nanoparçacıkları, tümör hücrelerinin ölümünü tetikleyen H_2O_2 birikmesini sağlamıştır (Zhang vd., 2020).

Wang ve arkadaşları (2022) ise, metal iyonlarını tutma yeteneğine sahip enkapsülinlerin, su arıtma çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir. Xing ve arkadaşları (2020) ise, annamox bakterinden enkapsülini gümüş ile muamele ederek atık suda bulunan gümüşün sudan arındırılması için enkapsülin kullanımını önerdiler.

Genetik rekombinasyonla enkapsülin yüzeyine lizin rezidüsü eklenmiş, PEG türevi olan metoksi-PEG-SCM ile muamele edilerek PEGilasyon gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, kontrol edilebilir bir “disassembly” ve “reassembly” sağlanmış, ayrıca enkapsülinin iç boşluğuna hidrofilik biyopolimerleri dâhil etme potansiyeli kazandırılmıştır (Sonotaki, 2017).

Kanser immünoterapisinde, enkapsülinin dış yüzeyi spesifik bir epitopla kaplanarak CD8 T hücrelerine spesifik sitotoksik T hücresi özelliği kazandırılmıştır (Choi vd., 2016).

Aşı geliştirme çalışmalarında, influenza A virüsünün M2 epitopu, *T. maritima*'nın kapsül yapısının dış yüzeyine eklenmiştir (Lagutte vd., 2018).

Enkapsülinler, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) tekniğinin geliştirilmesinde de kullanılmışlardır. Metal yüklü enkapsülinlerin gen reportörleri olarak hücre takibinde kullanılması denenmiştir (Kim vd., 2011; Sigmund vd., 2019; Gabashvili vd. 2021). Başka bir çalışmada enkapsülin, SCC-7 hücresine spesifik optikal bir prop olarak getirtilmiştir. Enkapsülinin dış yüzeyi, IgG'nin Fc bağlanma epitopu ile kaplanmış, fluorescein-5-maleimide ile muamele edilmiş, daha sonra enkapsülin, SCC-7 hücrelerine hedeflenip, kanser hücreleri floresan mikroskop altında takip edilmiştir (Moon vd. 2014.2). Enkapsülin, ayrıca, süper çözünürlüklü mikroskopide kullanılan floroforların etiketlenmesinde kullanılmıştır. *B. linensis*'e ait enkapsülin, görünür ışıktaki ışın yaymazken, UV altında ışın yayan spyropiranla kaplanmıştır (Putri vd., 2016).

Enkapsülin, hücre içi ortamı taklit yeteneği ile, enzimlerin katalitik araştırmaları için nanoreaktör olarak kullanılmıştır (Maity vd., 2015).

1.2. Dyp (Boya Giderici Peroksidaz)

Dyp (EC: 1.11.1.19), oksidoredüktaz grubuna ait bir hem peroksidazdır. Buna göre, bir elektron alıcısı olarak H_2O_2 kullanarak substratlarını okside eder (Colpa, 2018). Ayrıca,

Dyp, yüksek derecede antrokinon boya parçalama kabiliyetine sahip boya parçalayıcı peroksidaz olarak tanımlanmıştır (Kim ve Shoda, 1999). İlk olarak, 1999'da yüksek boya ağartma ve lignin parçalama kapasitesine sahip *Thanatephorus cucumeris* Dec 1'den elde edilmiştir (Sugano 2009). Dyp, başlangıçta, substrat seçimi ve katalitik aktivite benzerliğinden dolayı bitkisel peroksidazlara (Lip, MnP ve VP) benzetilmiştir. Ancak, daha sonra, Dyp sekansının, bitkisel peroksidazlara karşı zayıf homolojik benzerlik göstermesi, klasik peroksidazlarda bulunan korunmuş distal arjinin rezidüsünden ve zengin α -heliks yapısından mahrum olması sebebiyle bitkisel peroksidazlardan ayrılmıştır (Sugano ve Yoshida, 2021). RedOxiBase Dyp üyelerini, sıradışı üçüncül yapılarından ötürü, hem peroksidazlar içinde münferid bir grupta toplamıştır. Dyp, güncel olarak, hem peroksidazların peroksidaz-klorit-dismutaz ailesi içinde yer alır (Chen ve Li, 2016). Dyp, klorit dismutazlar gibi dimerik α -heliks ve β -tabaka içeren ferrodoksin benzeri katlanmaya sahiptir (Şekil 7). Diğer klorit-dismutazlardan farklı olarak ökaryotik hücrelerde de bulunmaktadır (Hofbauer, 2014). Ayrıca, hücre içi, hücre dışı ve periplazmik boşlukta bulunan Dyp'ler vardır. Literatürde şimdiye kadar monomerik, dimerik ve hekzamerik tipte Dyp'ler rapor edilmiştir (Colpa, 2018). Dyp'ler bakteriler dışında mantarlarlarda da bulunur ancak, hayvan ve bitkilerde bulunmamaktadır (Singh vd., 2015). Lignindeki fenolik ve fenolik olmayan bağları, azo boyaları, antrakinon ve hidroksil içermeyen antrakinon boyaları (Sugano vd., 2007; Brissos vd., 2017), aromatik sülfidler, fenolik bileşikler içine alan geniş substrat aralığına sahiptirler (Sugano vd., 2007; Hofbauer, 2014).



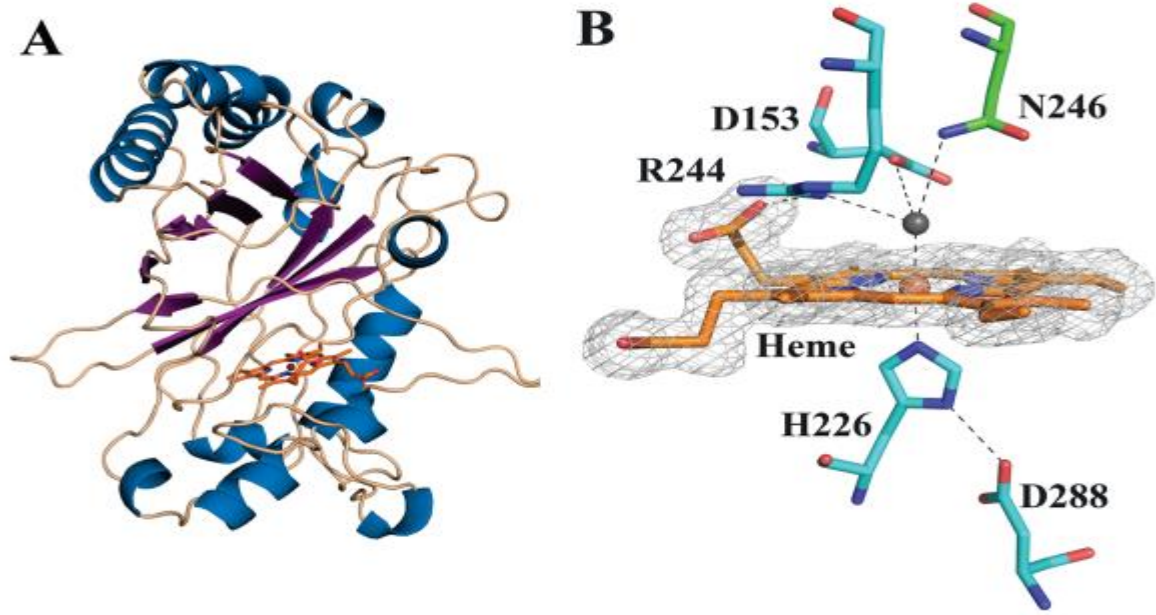
Şekil 7. Ferrodoksin katlanması (Sarı: β -sheet, Mavi: α -helikal)

RedOxiBase, Dyp'yi A, B, C ve D olmak üzere 4 sınıfta toplamaktadır. Bu sınıflandırma, Dyp'nin birincil yapısı baz alınarak yapılmıştır. Daha sonra Sugano ve Yoshida (2015), Dyp sınıflandırmasında amino asit dizilerindeki homolojik benzerliklerin güvenilir olmadığını savunmuş ve Dyp'nin üçüncül yapısını baz alarak, P (Primitive), I (Intermediate) ve V (Advanced) gruplarını içeren yeni bir sınıflandırma yapmıştır. Sınıflar arasındaki en temel farklılık, amino asit uzunluklarıdır. P sınıfı, Dyp'lerin en küçük sınıfını temsil eder ve daha önce B sınıfında bulunan ~300 aa uzunluğundaki Dyp'leri içerir. Bu gruptaki Dyp üyeleri genellikle kargo yükleme peptidi (CLP) içermektedirler (Sutter 2008; Contreras vd., 2014; Rahmanpour ve Bugg, 2013). I tip Dyp, daha önce A sınıfında bulunan 300-400 aa uzunluğunda Dyp'leri içerir. Ekstra domain içerir ve bu domain bakterinin hayat döngüsünde önemli role sahip deferroşelataz aktivitesine sahiptir. I tip Dyp'nin diğer önemli karakteristik özelliği N-terminalde TAT sinyali içermesidir. V sınıf Dyp, C ve D sınıflarının birleşimidir ve fungal Dyp'leri kapsamaktadır. >400'ün üzerinde amino asit uzunluğuna sahip en büyük Dyp sınıfıdır. Ekstra domain içerir ve N-terminalinde signal peptit bulundurur. Ayrıca yüksek, katalitik etkinliğe sahip olan sınıftır (Yoshida ve Sugano, 2015). Dyp sınıfları arasında katalitik özellikleri bakımından da çok ciddi farklılıklar bulunmaktadır (Lucic vd., 2022).

1.2.1. Dyp'nin Katalitik Mekanizması

Dyp, katalitik bölgesinde, porfirin halkasının ortasında bir ferrik (Fe^{3+}) içeren inorganik bir hem (protohem IX) yapısı bulundurmaktadır. Bu yapı proteine proksimal histidin ve distal aspartat ile kovalent olmayan biçimde bağlı bulunmaktadır (Singh vd., 2015; Colpa, 2018) (Şekil 8). Dyp, aktif bölgede arjinin, aspartat ve 2 hidrofobik korunmuş dizi içermektedir. Distal histidin pozisyonunda, aspartatın bulunması, Dyp'leri diğer peroksidazlardan ayırır (Singh vd., 2015). Korunmuş bir GXXDG- motifi içinde bulunan aspartat (D), düşük pH ortamında (pH ~3), asit-baz katalisti olarak işlev görür (Sugano vd., 2007). Katalitik reaksiyonun düşük pH ortamında gerçekleşmesinin aspartik asitin düşük pKa değerine sahip olmasından ileri geldiği düşünülmektedir (Brissos vd., 2017). Diğer yandan, katalitik aktivite için aspartatın şart olmadığı gösterilmiştir (Singh vd. 2012). Bunun yerine, arjininin asit-baz katalisti olarak işlev görebileceği öne sürülmüştür. Distal arjinin aynı zamanda, kofaktör H_2O_2 'nin uygun koordinasyonu ve birinci ara bileşik olan Bileşik I'in stabilitesi için zorunlu bir amino asittir (Brissos vd., 2017). H_2O_2 redüksiyonu

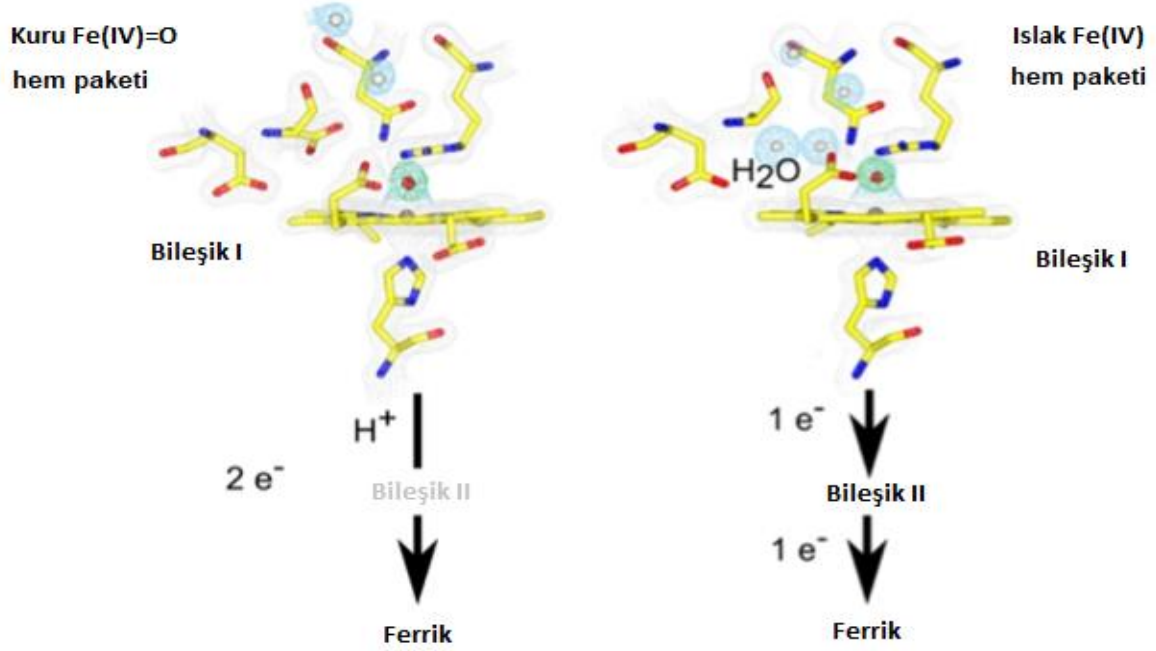
için asit baz katalisti, Dyp sınıfları arasında farklılık göstermektedir (Lucic vd., 2020). Genellikle, PpDyp ve DypB gibi P sınıfı Dyp'lerde, arjininin bileşik I formasyonunda direkt rol oynadığı, buna karşın, DtpA, Dyp, TcDyp ElDyp ve KpDyp gibi I tip Dyplerde, aspartatın proton alıcısı olarak görev aldığı bildirilmiştir (Sugano 2007; Singh vd., 2012; Mendes vd., 2015; Chen vd., 2015; Shestra vd., 2017; Pfanzagl vd., 2018; Lucic vd., 2021). İstisnai olarak, *E. coli*'nin P tip YfeX ve I tip YcdB enzimlerinde, tersi durum bildirilmiştir (Liu vd., 2011; Liu vd., 2017).



Şekil 8. DypB'nin yapısı ve katalitik bölgesi (Roberts vd., 2011)

Dyp üyeleri arasında var olan katalitik mekanizmalarındaki tutarsızlıklara 2022'de Lucic ve arkadaşlarının yaptığı biyoinformatik çalışmalarla açıklama getirilmiştir (Şekil 9). Buna göre, P-tipi Dyp, kuru distal hem bölgesiyle uyumlu bir iki elektron transfer mekanizması sergilerken, I ve V-tipi Dyp, ıslak distal hem bölgesinde sıralı bir tek elektron transfer mekanizmasını göstermektedir. Lucic ve arkadaşlarına göre, P-tipi Dyp, kuru distal hem bölgesiyle uyumlu bir iki elektron transfer mekanizması sergilerken, I ve V-tipi Dyp, ıslak distal hem bölgesinde sıralı bir tek elektron transfer mekanizmasını göstermektedir. Islak hem bölgesi; hemin 6. Ligandında su molekülü olduğunu ifade eder. Kuru hem bölgesinde bu ligand boştur ve en az iki H_2O_2 varlığında, H_2O_2 ile kompleks oluşturur (Sugano 2007; Liu vd., 2017; Lucic vd., 2020). Yani mekanizma hemin altıncı

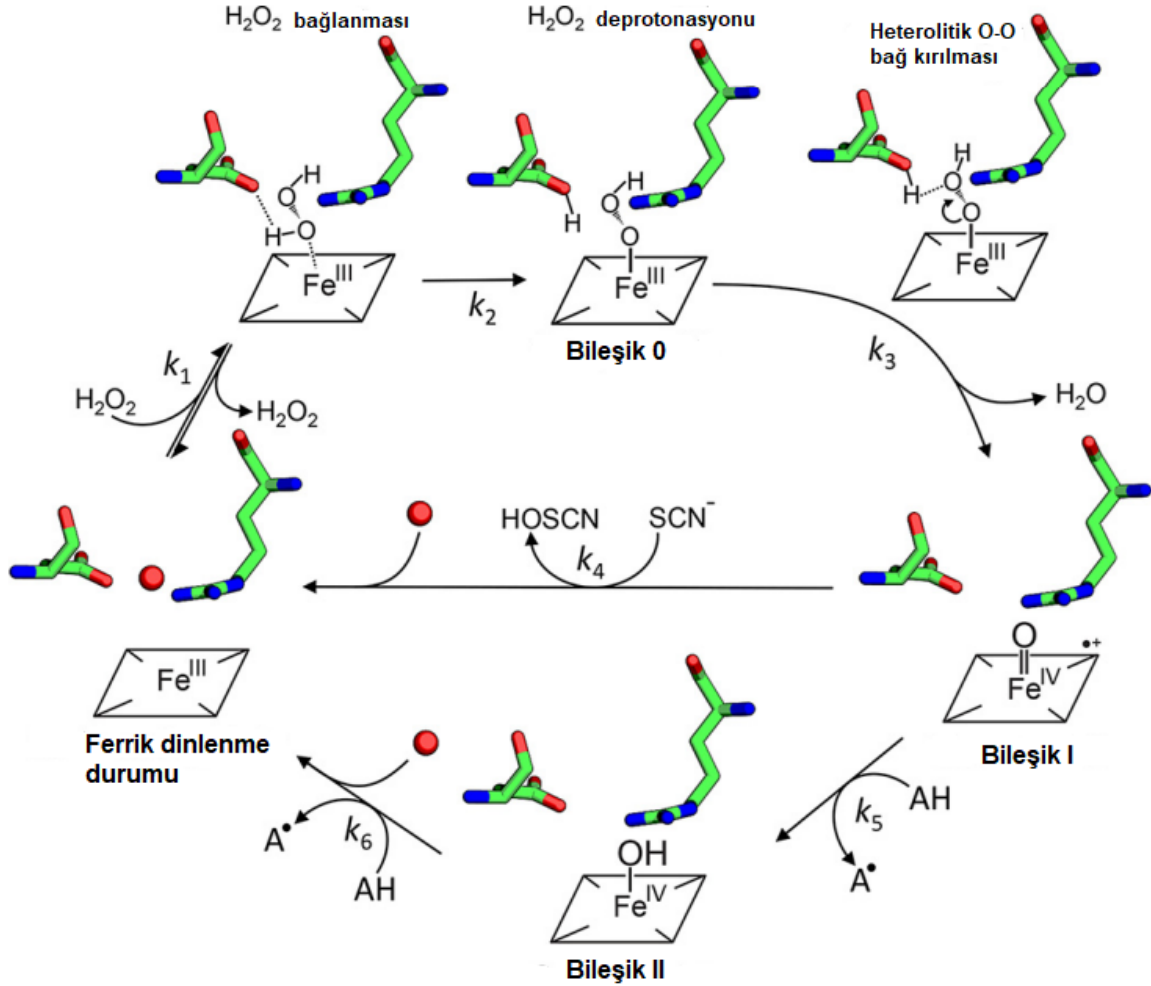
ligandında su molekülünün bulunup bulunmamasına göre ıslak ve kuru hem paketi olarak adlandırılmıştır.



Şekil 9. Distal aspartatın ıslak ve kuru durumundaki katalitik mekanizma

Mekanizmaya göre, dinlenme durumunda Dyp hem bölgesindeki demir, oksoferrik ($\text{Fe}^{+3}=\text{O}$) formdadır. Oksoferrik demire, H_2O_2 bağlandığında, distal cepteki proton alıcısı (aspartat ya da arjinin olabilir), H_2O_2 'nin deprotonasyonu ile bileşik 0 ($\text{Fe}^{+3}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$) bileşiğini oluşturur. Ardından, bileşik 0, H_2O_2 'in heterolitik parçalanması ile porfirin π -kasyon radikali [$\text{Fe}^{+4}=\text{O}$]por $^{+}$] içeren oksoferril bileşik I'e dönüşür. Bu aşamadan sonra, distal cepte su molekülünün bulunup bulunmamasına göre iki ayrı reaksiyon gerçekleşir. Eğer distal cepte su molekülü varsa sıralı bir elektron transfer mekanizması çalışır. Bu mekanizma klasik peroksidazlarla benzerdir. Bileşik I, bir elektron redüksiyonu ile protonlanmamış bileşik II ($\text{Fe}^{+4}-\text{OH}$)'ye dönüşür, ardından bir elektron redüksiyonu ile daha protonlanır ($\text{Fe}^{+4}=\text{O}$) ve hızlı bir şekilde ferrik forma geri döner (Şekil 10). Sitokrom P450 ve katalazda rastlanan iki elektron transfer mekanizmasında, Dyp'nin distal cebinde su olmaması durumunda, bileşik I, iki elektron redüksiyonu ile ferrik forma döner (Borges vd., 2022; Lucic vd., 2022). Spektrofotometrik analizlerle yapılan çalışmalarda, bileşik II tesbit edilemediği için, bu mekanizmasında, bileşik II oluşumunun gözlenmediği bildirilmektedir (Ahmad vd., 2011; Lucic vd., 2020). Ancak Lucic ve arkadaşlarının yaptığı ayrıntılı çalışma, bileşik I'in çok az miktarda da olsa protonlu bir bileşik II

oluşturduğunu desteklemektedir. Lucic ve arkadaşları ayrıca, P tip Dyp'lerde kuru cep oluşumunun aspartat (D146), arjinin (R243) ve asparajin (N245) üçlüsü ile mümkün olabileceğini rapor etmişlerdir.



Şekil 10. Dyp'nin katalitik mekanizması (Pfanzagl vd., 2018)

Dyp, yapısında, hem'den 4.2 Å uzaklıkta bir bölgede, mangan bağlanma bölgesi içermektedir. Dyp, mangani okside ederek, lignini daha etkili olarak degrade etmektedir (Ahmad vd., 2011; Chen ve Li, 2016). Bütün Dyp'lerde ortak olarak, daha küçük substratların girişine olanak sağlayan, katalitik bölgeden dışarı açılan kanallar karakterize edilmiştir. Ancak, küçük substratlar ya da büyük substratların oksidasyonunda bu kanalların kullanıldığı farklı mekanizmalar henüz bilinmemektedir (Chen ve Li, 2016). Dyp'ler, ayrıca, diğer peroksidazlardan farklı olarak, küçük aromatik substratlara bağlanma imkânı sağlayan esnek bir hem boşluğu içerir. Bu yapısal özellik, Dyp'nin daha geniş substrat spektrumuna sahip olma sebeplerinden bir tanesidir (Brissos vd., 2017). Bununla

birlikte, Dyp substratlarının aktif bölgeye girme zorunluluğu yoktur. Dyp'nin, antrokinon boyalar, lignin ve ABTS gibi, aktif bölgeye giremeyecek büyüklükteki substratları okside ettiği de bilinmektedir. Aktif bölgeye ulaşamayacak büyüklükteki substratlar, uzun menzilli elektron transfer (LRET) yolları kullanarak enzim yüzeyinden tirozil ve triptofanil radikallerinden elektron alışverişi yaptığı gösterilmiştir (Nys vd., 2021).

1.2.2. Dyp'lerin Kullanım Alanları

1.2.2.1. Lignin Biyodegradasyonu

Lignin, bitki hücre çeperi bileşenidir. Bitki hücrelerini, fibrillerini ve damarlarını bir arada tutar. Hemiselülozla birlikte selüloz mikrofibrillerini çevreleyerek bitkinin dayanıklılığını artırır. Hücre çeperine hidrofobik özellik kazandırarak besin ve su geçişine katkı sağlar ve bitkiyi mikrobiyal degradasyona karşı korur (Noberg, 2012). Odunsu yapının %20-30'u lignindir. Moleküler yapısı amorf ve son derece kompleks bir polimer olan lignin, bozunması çok zor olan çok çeşitli aromatik ve fenolik bileşikler içerir. Tablo 2, lignin içeriğindeki yapılar arasındaki bağları ve bu yapılara göre ağacın kazandığı yumuşaklık derecesini ifade etmektedir (Kirk ve Farrel, 1987; Kirk ve Cullen, 1998; Palonen, 2004; Sahinkaya, 2016).

Tablo 2. Ligninin yapısında bulunan bağ çeşitleri (Sahinkaya, 2016)

İsim	Bağ	Yumuşak odun (%)	Sert odun (%)
β -aril eter	β -O-4'	35-60	50-70
Diaril eter	4-O-5'	<4	7
Fenil kumaran	β -5'	11-12	4-9
Dihidroksibifenol	5-5'	10	$\approx$ 5
Diarilpropan 1,3-diol	β -1'	1-2	1
Pinorezinol	β - β '	2-3	3-4
Dibenzodioksin	5-5'-O4	4-5	Eser miktarda
Sipirodienol	β -1' α -O- α	1-3	2-3

Lignin, kağıt üretiminde, kağıt hamuru üretimi ve ağartma işlemleri sırasında uzaklaştırılmaya çalışılır. Bu uzaklaştırma işlemi sırasında, genel olarak klor ve hipoklorit (klor dioksit) gibi kimyasal maddeler kullanılır. Ancak, klorlü bileşiklerin kullanımı ile, yan ürün olarak, toksik, mutajenik ve karsinojenik tehlikeleri olan klorlü organik bileşikler açığa çıkmaktadır. Enzimlerin, kağıt endüstrisinde kullanımı ile klor kullanımı azalmaktadır (Beg ve ark., 2001). Enzimler, endüstriyel alanlarda 1980'in ortalarında kullanılmaya başlanmıştır (Aehle, 2007). Kağıt hamurundan ligninin uzaklaştırılma işleminde kullanılan enzimlere lignolitik enzim adı verilmektedir. Lignolitik enzimler; lignin peroksidazlar (LiP), Mangan peroksidazlar (MnP), Versatil peroksidazlar (VP), lakkazlar ve Boya giderici peroksidazları (Dyp) kapsamaktadır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda kullanılan ve ticarileşen lignolitik enzimler fungus kaynaklı olmakla birlikte, son yıllarda bakteriyel Dyp'lerin lignin bozunmasında funguslarla eşdeğer potansiyele sahip olduğunu gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir (Sugano ve Yoshida, 2021). DypA (*Pseudomonas fluorescens* pf-5), TfuDyp (*Thermobifida fusca*), SviDyp (*Saccharomonospora viridis* DSM43017), DypB (*Rhodococcus jostii*), PpDyp (*Pseudomonas putida* MET94) (Brissos vd., 2017), BsDyp (*Bacillus subtilis*), T1Dyp (*Rhodococcus* sp. T1) lignini degrades ettiği rapor edilen bakteriyel Dyp'lerdir. Peroksidazlar, fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalize eder ve bunun sonucunda fenolik radikaller, C-C ve β -aril eter bağlantılarının bozulmasını tetikler ve ayrıca H₂O₂ tarafından indirgenir ve aromatik bileşikleri bozarlar (Sahinkaya vd., 2019; Sugano ve Yoshida, 2021).

1.2.2.2. Atık Su Arıtımı

Sentetik boyalar, tekstil, kozmetik, gıda ve ilaç üretiminde kullanılan kimyasal olarak kararlı xenobiyotiklerdir. Bu endüstriyel ürünlerin üretiminin yapıldığı fabrikalarda boya ile kirlenen atık sular, çevreye salınmadan önce arıtılmalıdır. Her yıl, fabrikalardan salınan atık sularla, çoğunlukla azo ve antrakinon boyaları içeren 105 tondan fazla boya doğaya salınmaktadır (Chen ve Li, 2016). Atık suyun arıtılmasında kullanılan fiziksel yöntemler ve ozonla muamele dışında enzimatik degradasyonu kapsayan biyolojik yöntemler de kullanılmaktadır. Lakkazlar, azoredüktazlar, lignin peroksidazlar (LiP), mangan peroksidazlar (MnP), mangan bağlı peroksidazlar (MIP), versatil peroksidazlar (VP), horseradish peroksidazlar (HRP), polifenol peroksidazlar (PPO), bitki kaynaklı

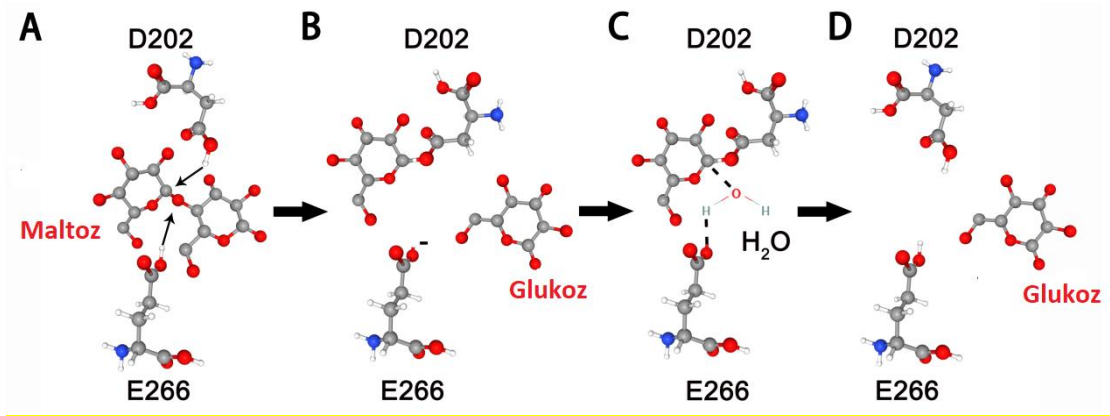
peroksidazlar ve boya giderici peroksidazlar (Dyp) atık suların arıtılmasında kullanılan etkili enzimlerdir (Singh vd., 2015). Özellikle lakkazın %100' varan boya degradasyonu ile sonuçlanan birçok immobilizasyon çalışması literatürde mevcuttur (Morsy vd., 2020). Bununla birlikte, Dyp'lerin lakkaz, azoredüktaz gibi etkili boya giderici enzimler dâhil diğer boya giderici enzimlere kıyasla çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Dyp'lerin, lakkaza göre 40, azoredüktaza göre 2 kat fazla aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Santos vd., 2014). DypDec1 ise Versatil peroksidazla birlikte kullanıldığında Reactive Blue 5'i tamamen renksiz hale getirmiştir (Sugano vd., 2006). Başka bir çalışmada ise DypT1'in tek başına Reactive Blue 19'u %73 oranında degrade ettiği gösterilmiştir (Sahinkaya vd., 2019). Dyp'lerin etki ettiği boya tipleri ve degradasyon kapasiteleri Tablo 3' de gösterilmiştir (Loncar vd., 2016).

Tablo 3. Dyp'nin degrade edebildiği boyalar ve degradasyon oranları (Loncar vd., 2016)

Boya Tipleri	Boya Adı	Degradasyon oranı (%)
Antrokinon boyalar	Disperse Blue 1	48
	Carminic acid	41
	Acid Blue 129	82
	Acid Blue 80	34
	Reactive Blue 19	22
	Reactive Blue 4	12
	Cibacron Blue 3G-A	4,5
Di/Tri-aril Metan Boyalar	Basic Yellow 2	16
	Crystal Violet	15
	Acid Green 50	48
	Acid Blue 9	35
	Acid Blue 93	5,4
İndigoid Boyalar	Indigo carmine	31
	Indigotetrasulfonate	8,2
Ftalosiyaninler	Copper phthalocyanine 3,4',4'',4'''-tetrasulfonic acid	64
Azo Boyalar	Acid Orange 7	16
	Reactive Red 2	2,1
	Acid Red 18	15
	Acid Red 14	19
	Reactive Black 5	7,7
	Reactive Red 120	3,2
	Direct Red 80	4,1
Ksanten boyalar	Rhodamine B	12
	Fluorescein	12
	Eosin Y	92
Karotenoitler	Crocin	72
	Curcumin	37

1.3. Oligo-1,6- α -glukosidaz

Oligo-1,6- α -glukosidazlar (EC: 3.2.1.10), glukozil hidrolaz ailesine ait enzimlerdir. Oligo-1,6- α -glukosidazlar, GH13 ailesi ve GH31 alt ailesi içinde yer alır (Stam vd., 2006). Glikozil hidrolaz 13 ailesi, kısa substratların (1 $\rightarrow$ 4)- α -D bağınyı kırabilen α -amilazları, GH31 ailesi ise oligo (1 $\rightarrow$ 6)- α -D- glukosit bağlarını kırabilen oligo-1,6- α -glukosidazları içerirler. G13 ailesi maltoz, izomaltoz gibi disakkaritleri, GH31 ise dekstrin gibi α -1,6 glukosidik bağ içeren oligosakkaritleri ve sukroz gibi indirgeyici olmayan şekerleri hidroliz ederler (Şekil 11). Oligo-1,6- α -glukosidaz, maltotriozdan maltohekzoza kadar daha uzun maltodekstrinleri de hidroliz edebilir (Schönert ve Dahl, 1999). Kabul edilen ismi Oligo-1,6- α -glukosidaz olan sukrazlar için, 1,4-1,6- α glukosidaz, sukraz-izomaltaz, izomaltaz, maltaz, sukraz-maltaz-izomaltaz gibi isimler de kullanılmaktadır. İnsanda eksikliğinde glukoz intoleransa sebep olan sukraz, GH13-31 tip oligo-1,6- α -glukosidazdır ve sukraz-izomeraz olarak adlandırılır (SI) (Alfalah vd., 2009).



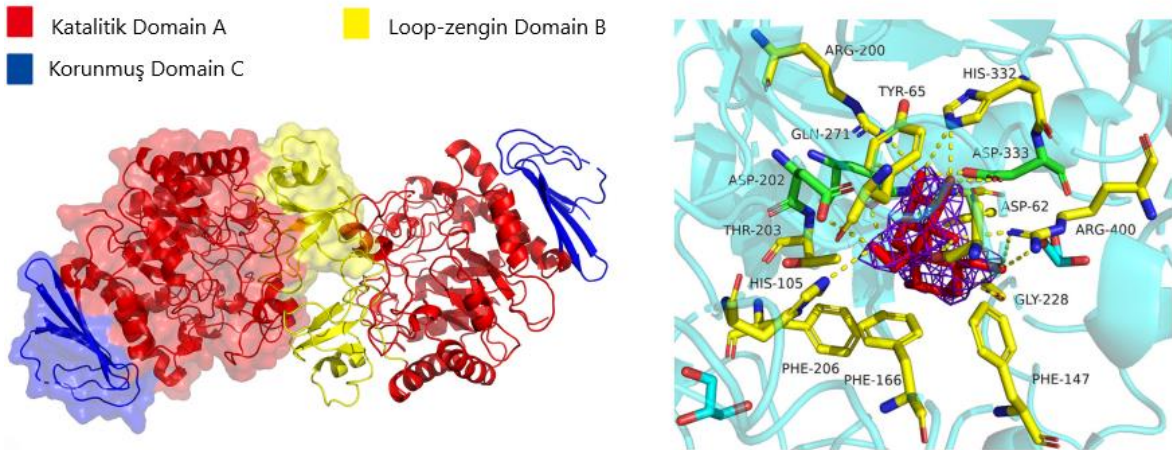
Şekil 11. Maltozun hidrolizi (Zhai vd., 2022)

1.3.1. Oligo-1,6- α -glukosidazın Katalitik Mekanizması

GH13 ailesine ait oligo-1,6- α -glukosidazlar, (β/α)₈-barrel yapılu katalitik domain A, loop zengin B ve korunmuş bir C domaini içerir (Şekil 12). B domaini substrat spesifitesi

ile ilişkilidir. Katalitik domain A, hidroliz aktivitesinden sorumlu, tüm GH13 ailesinde korunmuş, bir glutamik asit ve iki aspartik asit içerir. Hidrofilik amino asitler dışında, aktif bölgede triptofan, lösin, glisin, fenil alanin, valin gibi hidrofobik amino asitler de bulunmaktadır (Sim vd., 2010). Oligo-1,6- α -glukosidaz, N-terminal bölgesinde D20, N22, D24, F26 ve D28 olan, dört Ca^{+2} bağlanma bölgesi içerir (Hobbs vd., 2013).

Oligo-1,6- α -glukosidazın katalitik aktivitesi için, öncelikle loop domain substratı tanır ve aktif cebe girişe izin verir. Daha sonra, glukozidik oksijen Glu255 asit katalisti tarafından yükseltgenir. Glukozun birinci karbonu enzimin nükleofil bölgesindeki Asp199'a bağlanır, bu esnada enzime kovalent bağlı glikozil-enzim ara ürünü oluşur. Son olarak, Asp329'un üçüncü karboksilik grubu, glukonun birinci karbonunu hidroksiller. Böylece, glikozil hidroliz reaksiyonu gerçekleşmiş olur. Katalitik bölgede bulunan His103 ve His328 substrat bağlanma bölgeleridir (Watanabe vd., 2001; Dong vd., 2020). GH13-31 tipi oligo-1,6- α -glukosidaz, çok fonksiyonludur. Sukraz ve izomaltaz/maltaz aktivitesi, bir monomerde yer alan aynı aktif bölgede gerçekleşir. Aktif bölgede, +1 ve -1 bölgelerini içeren bir bağlanma cebi bulunmaktadır. İndirgeyici olmayan şekerler (sukroz) gömülü olan -1 bölgesine, indirgeyici şekerler (izomaltaz, maltoz), cebin yüzeyinde kalan +1 bölgesine bağlanır (Sim 2010).



Şekil 12. Oligo-1,6- α -glukosidazın yapısı ve katalitik bölgesi (Zhai vd., 2022)

1.3.2. Oligo-1,6- α -glukosidazın Kullanım Alanları

Nişasta, koruyucu madde, kaplama maddesi, şeker şurubu ve biyoetanol gibi çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılan endüstriyel öneme sahip hammaddelerden biridir. Oligo- α -

1,6-glukosidazlar, nişastadaki amilopektin yapıları ya da sukrozu parçalayarak şeker şurubu üretiminde kullanılırlar. Oligo- α -1,6-glukosidazlar, α -amilazlarla beraber, etanol ya da gıda endüstrisinde dirençli nişasta, izomaltooligosakkarit ve panoz üretiminde kullanılırlar. Glukoz ve fruktoz şurubu üretimi ve besinlerin bayatlamasının geciktirilmesi gibi amaçlarla gıda endüstrisinde, geniş bir kullanım alanına sahiptir (Dong vd., 2019).

Nişasta, bitkilerin fotosentez yoluyla ürettikleri besin maddesidir. Nişasta yapısı çok sayıda glukozun α -glikozidik bağlarla bir arada bulunduğu polimer yapılı karbohidrattır. Bu polimer, düz zincirli ise amiloz ve dallanmış amilopektin yapıları içermektedir. Nişasta, birbirine α -(1-4) glikozidik bağı ile bağlı glukozlar bulunduğu düz zincirli amiloz ve düz zincirdeki glukozun 6. karbonuna bağlı α -(1-6) glikozidik bağı ile oluşan amilopektin adlı dallanmış yapıları içermektedir. Nişasta, insanlar için de önemli bir besin kaynağı olduğu için endüstriyel alanda, çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır.

Nişasta, dirençli nişasta, hızlı ve yavaş sindirilen nişasta olarak 3 sınıfa ayrılır. Nemli ısıda pişirilen ekmek ve patates gibi amorf yapılı nişastalar hızlı nişastadır. Hububat nişastaları gibi pişmiş gıdalarda granüler ya da retrograde halde bulunan nişastalar yavaş nişastalardır. Dirençli nişasta ise ince bağırsakta sindirimi ve emilimi mümkün olmayan, ancak kolondaki mikroflora ile fermente edilen edilen yüksek amiloz içeriğine sahip nişastalardır. Dirençli nişastalar, oligosakkaritler, lignin, pektin, sakız, müsilaaj, hemiselüloz, lignin ve β -glukanlardan meydana gelmektedir (Türker ve Savlak, 2015; Samantha, 2021). Dirençli nişastalar, DN1, DN2, DN3 ve DN4 olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. DN1, sindirilmemiş dirençli nişastaları içermektedir. DN2 tip kristal, granül yapılı dirençli nişastalardır ve jelatinize olmamışlardır. DN3, gıdaların ısıtma-soğutma işleminden sonra ya da oligo 1,6- α glukosidaz enzimlerinin aktivitesi ile oluşan retrograde yapılı dirençli nişastalarını içermektedir. DN4 ise kimyasal yapısında değişiklik yapılarak işlenen gıda katkı maddelerini kapsamaktadır (Dündar, 2014).

Dirençli nişasta, kalsiyum ve magnezyum emilimini artırır, diyabeti önler, kolesterol ve safra asitlerinin salgılanmasını sağlar, kalın bağırsak kanserini, obeziteyi ve kardiyovasküler hastalıkları önler ve probiyotik bakterilerin büyümesini teşvik eder. Gıda endüstrisinde, besinlerin gevrekliğini artırma özelliği ve düşük su tutma kapasitesinden dolayı koruyucu olarak da kullanılmaktadır (Türker ve Savlak, 2015; Samantha, 2021).

Dirençli nişasta üretiminde glikozil hidrolaz enzimleri kullanılmaktadır. Bunların içinde en yaygın olarak kullanılan 1,4- α -amiloz bağlarını kıran α -amilaz ve amilopektinin amiloz zincirine bağlı olduğu noktadaki 1,6- α -pullulan bağlarını kıran pullulanazdır

(Dünder, 2014). Bunun dışında α -glukosidaz, glukoamilaz, β -amilaz, $\text{exo1,4-}\alpha$ -glukanaz, izoamilaz ve siklomaltadekstrin glukotransferaz gibi çeşitli glukozidi enzimler kullanılmaktadır (El-Fallal, 2012; Eleazu vd., 2016; Liu 2020).

Oligo1,6-glukosidaz, maltooligosakkaritleri, izomaltooligosakkaritleri (IMO), panoz, izopanoz ve dirençli nişastayı oluştururlar (Samantha 2021; Tiangpook vd., 2023). Bu besinler, sağlıklı diyet için fonksiyonel besin olarak kullanılmaktadırlar. IMO, düşük kalorili, yüksek fibril içeriğine sahip, obeziteyi önleyici ve doğal tatlandırıcı olarak gıda endüstrisinde kullanılır. IMO ve panoz, probiyotiktir. Kalın bağırsakta bifidobakteri ve laktobasillusların büyümesini etkiler. Yararlı bakterilerin üremesini teşvik ettikleri gibi, amin gibi toksik madde üreten zararlı bakterilerin üremelerini inhibe ederler (Samanta, 2021).

Enkapsülinler, doğal bakteri kaynaklı kapsül yapılarıdır. Protein yapılı oldukları için manipülasyona açık olmaları, kendi kendine katlanabilme kapasitesi ve toksik olmaması gibi özelliklerinden dolayı, çeşitli amaçlarla, endüstriyel alanlarda kullanılabilir bir araç olma potansiyeli mevcuttur. Ayrıca, enkapsülin yeni bir keşif olduğundan literatürde bulunan bilgiler sınırlıdır. Bu sebeple, bu çalışmadaki asıl amaç, bakteriyel kaynaklı doğal bir enkapsülini karakterize etmek ve endüstriyel Dyp ve oligo-1,6- α -glukosidazın immobilizasyonunda kullanılabilirliğini araştırmaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Malzemeler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Trypton (Multicell 800-158-CG), NaCl (BBI Life Sciences A610476), Yeast Ekstrakt (BBI Life Sciences A505245-0500), Agar (Sigma 05039), Malt Ekstrakt (MERCK VM264491 106), D-Glukoz monohidrat (TEKKİM TK090271.01002), D-Sukroz (MERCK 107651), Maltoz (Sigma Aldrich M8896), Ampisilin sodyum sülfat (AppliChem A0839.0100), Kanamisin sülfat (Ambresco 0408), Tripsin (Ambresco O458), Lizozim (Amresco 0663), X-Gal (GBT X4281C10,10 G), Etidyum Bromid (Sigma Aldrich E-7637-1G), Agaroz (Isolab 9.020.120.500), Bromophenol blue (Gerbu 080702), IPTG (Gold Biotechnology 36793-1), Hem (Sigma Aldrich H9039), Commassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich 27815-25G-F), Q-Sepharose (Sigma), Commassie Brilliant Blue R-250 (Fischer Scientific BP101), 2-Propanol (BDH 296796L), Metanol (MERCK 106.007), Akrilamid (Sigma-Aldrich A8887), Glisin (Biomatik A2716), Bromofenol blue sodyum salt (Gerbu 080702), Amonyum peroksi sülfat (MERCK K19415400), Bis-akrilamid (Sigma Aldrich 128910), TEMED (SERVA 35925.01), Asetik Asit (ISOLAB 901.013.2500), ABTS (Sigma A9941-50Tab), α -pNPG (Sigma aldrich N1377), α -pNP (MERCK S22269 749), o-dianizidin (Sigma Aldrich D3252), H₂O₂ (MERCK K50671809838), %96 Etanol (Nilkim), Gliserol (Fisher Scientific BP229-1), Bütanol (MERCK 703988), GuHCl (Acros organics 120232500), Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (Isolab 969.053), Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (MERCK 106.580), fosforik asit (MERCK K17936363), Sodyum Asetat (Isolab 969.176.1000), Sodyum sitrat tribazik dihidrat (Sigma Aldrich S4641), Sitrik asit (AFG Bioscience 127443), Amonyum Asetat (Isolab 9.030.261.000), Trizma Baz (Sigma Aldrich T1503), NaOH (Isolab 964969.113.1000), HCl (Sigma Aldrich 30721), RNaz A (Appllichem A2760), β -merkaptetoetanol (Sigma Aldrich M6250), DTT (Appllichem 3700852), SDS (Fischer scientific BP166), Tween-20 (MERCK 655204), Triton-X (MERCK K50616303908), EDTA (Fisher Scientific BP118-500), İmidazol (Sigma Aldrich 56750), DMSO (Carlo Erba 445103), EGTA (Biobasic Canada ED0077), Magnezyum klorür heksahidrat (Carlo

Erba 459337), NiCl (Ataman Kimya 7718-54-9), Kalsiyum klorit dihidrat (MERCK 137923), Potasyum klorit (MERCK K23759135 709), ZnCl₂ (Ataman Kimya 7646-85-7), Kobalt klorit heptahidrat (Sigma Aldrich 25,559-9), MnCl₂ (Sigma Aldrich 48795), Demir (II) sülfat heptahidrat (MERCK A0127565 009), Cıva (II) klorit (Alfa Aesar P28A004), Bakır sülfat (MERCK A0356491 219), *EcoRI* (NEB R3101S, Promega R6011), *HindIII* (Promega R6041), *NcoI* (Promega R6513), *NdeI* (NEB R0111L, Promega R6801), BSA (NEB B9200), dNTP Seti (Promega), pGEMT Easy Vector System I (Promega A1360), Go Taq® DNA polimeraz kiti (Promega M3001), DNA ladder (NEB N3232L), Protein ladder (NEB P7712S, Promega V849A), Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti Manuel (Promega A1120), GeneJET plazmit miniprep kit (Thermo Scientific K0502), QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen 27106), Complete Histidine Purification Resin (Roche 5893801001).

2.1.2. Kullanılan Bakteri ve Vektörler

Proje kapsamında çalışılacak olan *Dyp* ve enkapsülinin gen kaynağı olarak *Jiangella aurantiaca* 8K307 ve oligo-1,6- α -glukosidaz kaynağı olarak *Anoxybacillus ayderensis* A9 kullanıldı.

Jiangella aurantiaca 8K307, 19 Mayıs Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden Dr. Öğr. Üyesi Hayrettin SAYGIN tarafından temin edilmiştir (Saygin vd., 2020).

Laboratuvarımızın yürütücülerinden olan Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI tarafından 2004’de izole edilen *Anoxybacillus ayderensis* A9 ve tüm *E. coli* suşları (JM101, BL21 (DE3) ve BL21 (DE3) star) laboratuvar stoklarımızdan temin edilmiştir.

Promega’dan satın alınan pGEM-T Easy I vektörü (Promega, A1360), *JauDyp* ve *JauEnc* genlerinin klonlanması için kullanıldı. pGEM-T Easy I vektörü, yüksek kopyalıdır ve ampsilin direnç geni içerir. Plazmit, T7 RNA polimeraz promotorunu ve mavi-beyaz koloni seçimi için promotorun downstreamine bitişik, MCS (çoklu kesim bölgesi) içeren bir *lacZa* geni bulundurur.

Laboratuvar stoklarımızda bulunan pET28a(+), *JauDyp*, oligo-1,6- α -glukosidaz (*AaySucCLP*) ve *JauEnc* genlerinin aşırı ekspresyonları için kullanıldı. pET28a(+), düşük kopyalı bir ekspresyon vektörüdür. T7 RNA polimeraz promotoruna sahiptir, tercihen

genin N- veya C-terminaline eklenebilecek polihistidin etiketi ve kanamisinine direnç geni içermektedir.

2.1.3. Kullanılan Besiyerileri

LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri, *Anoxybacillus ayderensis* A9 ve tüm *E. coli* suşlarının (JM101, BL21 (DE3) ve BL21 (DE3) Star) gelişiminde kullanıldı. 1 L LB için; 10 g tripton, 5 g yeast ekstrakt ve 5 g NaCl 1 L distile suda çözündürüldü. pH 7,4'ye ayarlandı ve hazırlanan besiyeri 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edildi (Macwilliams, 2006).

LB (Luria-Bertani) katı besiyeri, *Anoxybacillus ayderensis* A9 ve tüm *E. coli* suşlarının (JM101, BL21 (DE3) ve BL21 (DE3) Star) stoklarında kullanıldı: LB sıvı besiyeriye ek olarak 12 g agar eklendi, pH kontrol edildi ve hazırlanan besiyeri 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edildi (Macwilliams, 2006).

ISP2 *Jiangella aurantiaca* 8K307 gelişiminde kullanıldı. 1 L ISP2 için, 10 g malt ekstrakt, 4 g yeast ekstrakt, 4 g glukoz 1 L distile suda çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı ve hazırlanan besiyeri 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edildi (Saygın, 2020).

ISP2 katı besiyeri *Jiangella aurantiaca* 8K307 stoklarında kullanıldı. ISP2 sıvı besiyerisine 15 g/L agar eklendi ve hazırlanan besiyeri 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edildi (Saygın, 2020).

2.2. Biyoinformatik Araçlar ve Veritabanları

NCBI GenBank veritabanı ile T1 tip enkapsülin sistemi içeren bakteri kaynakları araştırıldı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Mizrachi, 2007).

NCBI Blast ile klonlanan gen dizilerinin doğruluğu tespit edildi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul vd., 1990).

Online biyoinformatik araç, Clustal Omega ile gen dizilerinin hizalaması yapıldı (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; McWilliam vd., 2013).

Online Swiss-modelling aracıyla proteinlerin temsili 3D yapıları oluşturuldu (<https://swissmodel.expasy.org/>; Schwede vd., 2003).

Klonlama çalışmalarında kullanılan primerler, Snapgene ve Fast PCR programı ile tasarlandı ve özellikleri analiz edildi (Kalendar vd, 2009).

Expasy Protparam online programı ile proteinlerin fizyolojik verileri belirlendi (<https://web.expasy.org/protparam/>; Artimo vd., 2012).

InterPro ile JauEnc, JauDyp ve AaySuc'ın hangi ailelere mensup oldukları belirlendi (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Appweiler vd., 2000).

Crysol biyoinformatik aracıyla JauEnc'in tahmini yarıçapı ve polimer olduğu belirlendi (<https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/crysol.html>; Svergun vd., 1995).

Uniprot kodlarıyla literatürde çalışılmış olan P tipi Dyp amino asit dizileri Clustal Omega ile hizalandı. AaySuc, Uniprotta aktif bölge ve 3 boyutlu yapısına ait verileri bulunan *Bacillus subtilis* 168 kaynaklı malL (O06994) ile hizalandı. AaySuc ve AaySucCLP kendi aralarında Clustal Omega ile hizalandı (Sievers vd., 2014).

2.3. Klonlama Çalışmaları

2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Jiangella aurantiaca 8K307, ISP2 besiyeri ortamında 28 °C'de gece boyu inkübe edildi. Ardından, 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Besiyeri içeren süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler, 1 mg/ml lizozim ile gece boyu inkübe edildi ve tekrar 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Daha sonra, Promega Wizard genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı.

Anoxybacillus ayderensis A9, LB besiyeri ortamında 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. 13.000 rpm'de 2 dk'lık santrifügasyon ile hücreler çöktürüldü. Ardından pelletten, Promega Wizard genomik DNA izolasyonu ile genomik DNA izolasyonu yapıldı. Kitin prosedürüne göre; Çöktürülen hücreler, 480 µl EDTA (50 mM) ile çözüldü. Gram pozitif olan her iki bakterinin de hücre duvarlarının zayıflatılması için, çöktürülmüş hücreler, 120 µl lizozim (10 mg/ml) ile 37 °C'de 60 dk. inkübe edildi. Ardından 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Ortama, 600 µl *Nuclei lysis* solüsyonu eklenerek 80 °C'de 5 dk'lık inkübasyon ile hücreler patlatıldı. Hücre içinde bulunan RNA'ların degradasyonu için

solüsyona, 2 µl *RNase* eklenerek, 37 °C’de 60 dk daha inkübe edildi. Örnek, oda sıcaklığında biraz soğutulduktan sonra, solüsyona 200 µl *Protein Precipitation* solüsyonu eklendi. 20 sn vorteksleme yapıp buz üzerinde 5 dk inkübasyon ile hücre içi proteinler degrede edildi ve 13.000 rpm’de 5 dk’lık santrifüstasyonla çöktürüldü. Süpernatantta kalan DNA 600 µl izopropanol ile pellet oluşumu gözlenene kadar konsantre edildi ve oluşan pellet 13.000 rpm’de 2 dk santrifüstasyon ile çöktürüldü. Pelletin iyice kurduğundan emin olunduktan sonra, %70’lik etanol ilavesiyle DNA’lar yıkandı ve 13.000 rpm’de 2 dk. daha santrifüj edildi. Etanolü tamamen uçurmak amacıyla 37 °C’de 15 dk. inkübasyon yapıldı. Son olarak, genomik DNA’lar, 100 µl DNA Rehydration solüsyonu’nda 1 saatlik inkübasyona tabi tutuldu.

Genomik DNA’ların miktarları nanodropta ölçüldü, ayrıca elektroforezde yürütülerek *Biorad Gel Analyzer* (ChemiDoc MP 731BR01164) ile analiz edildi.

Kullanıma hazır olan *Jiangella aurantiaca* 8K307 ve *Anoxybacillus ayderensis* A9 gDNA’ları, 4 °C’de muhafaza edildi.

2.3.2. JauEnc ve JauDyp Genlerinin Klonlanması

Enkapsülin (Lokus: NZ_SMLB01000017.1:103589-104389) ve Dyp (NZ_SMLB01000017.1:102597-103592) gen dizileri, GenBank’ta mevcut olan *J. aurantiaca* 8K307 genomundan (GCA_004349105.1) elde edildi. Snapgene programı üzerinde genlere uygun primerler tasarlandı (Tablo 4).

Tablo 4. JauEnc ve JauDyp için tasarlanan primerler

JauEnc_Forward	5’- CCC ATA TgA ACA ACC TgC AC -3’
JauEnc_Reverse	5’- AAg cTT ggC gCC gAg CgC gAC g -3’
JauDyp_Forward	5’- CCA TAT gAC CgA TCC CgT g -3’
JauDyp_Reverse	5’- AAg CTT gAg TCg TCg CTC C -3’

Tablo 4’de belirtilen *JauEnc* ve *JauDyp* ileri ve geri primerlerinde altı çizili olan nükleotitler, klonlama çalışmaları için gerekli olan, *NdeI* (N-terminal) ve *HindIII* (C-terminal) restriksiyon endonükleaz enzim tanıma bölgelerini temsil etmektedir. Primerler,

pGEM-T ve pET28(+) vektörlerine uyumlu olarak, His-Tag etiketi içerecek şekilde tasarlandı. Ardından, primerlerin kalitesi ve uyumluluğu Fast PCR programında kontrol edildi. Üretime hazır olan primerler, Sentebiolab, Ankara firmasına gönderildi.

Yüksek GC içeriğine sahip olan *JauEnc*'nin çoğaltılması için, hedef olmayan DNA fragmentlerinin elimine edilmesi amacıyla, *J. aurantiaca* 8K307 gDNA'sı, enkapsülün geninin içermediği *HindIII* ile kesildi ve PCR reaksiyonunda %5 DMSO kullanıldı. PCR reaksiyonu için kullanılan şartlar, Tablo 6'de verilmiştir. *JauDyp*'nin çoğaltılması için ise, direkt olarak, Tablo 5'de belirtilen PCR şartları yerine getirilmiştir.

Tablo 5. *JauEnc* ve *JauDyp* için oluşturulan PCR Şartları

PCR reaksiyonu için kullanılan kimyasallar	PCR reaksiyon şartları
1X buffer 0,5 ug <i>J. aurantiaca</i> 8K307 gDNA 0,1 µM <i>JauEnc_F</i> orward 0,1 µM <i>JauEnc_R</i> everse 3 mM MgCl ₂ 0.2 mM dNTP 1,25 U DNA polimeraz	1. 95 °C 3 dk 2. 95 °C 1 dk denatürasyon 3. 55 °C 1 dk bağlanma 4. 72 °C 1 dk uzama 5. 72 °C' de 5 dk son uzama 6. 4 °C soğutma
	2-4 36 döngü

PCR reaksiyonu ile elde edilen *JauEnc* ve *JauDyp* DNA fragmentlerinin, pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyonları gerçekleştirildi. Ligasyon şartları, Firmanın önerdiği şekilde uygulandı. 1X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µL PCR ürünü, 3 µL pGEM-T Easy klonlama vektörü (25 ng/µL), 1 µL T4 DNA ligaz (1U), 4 µL ddH₂O içeren reaksiyon hazırlandı. Inkübasyon, gece boyu 16 °C'de gerçekleştirildi.

Ligasyon ürünlerinin *E. coli* JM101 suşuna aktarılması için, *E. coli* JM101 kompetent hücreleri hazırlandı. Kompetent hücre hazırlama metoduna göre öncelikle, *E. coli* suşu 37 °C'de, LB besiyeri ortamında gece boyu inkübe edildi. Gece kültüründen, optik yoğunluk 0,1 olacak şekilde LB besiyerine inokülasyon yapıldı. Ardından optik yoğunluk 0,5'e ulaşana kadar 37 °C'de inkübasyon yapıldı. Hücreler, 4.400 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Besiyeri içeren süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 0,1 M CaCl₂ eklenerek yarım saat buzda inkübasyon yapıldı. Hücreler tekrar 4.400 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve pellet üzerine tekrar 0.1 M CaCl₂ eklendi. Son olarak, 4 °C'de 2 saatlik inkübasyona bırakıldı.

CaCl₂ transformasyon metodu ile hazırlanan kompetent hücrelere DNA transformasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü, 200 µl *E.coli* JM101 kompetent hücresiyle karıştırıldı. Yarım saat buzda inkübe edildi. Karışım, 42 °C'de 2 dk.lık ısı şokuna maruz bırakıldı. 200 µl LB ilavesiyle 37 °C'de, 1 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler antibiyotik içeren LB besiyerine yayıldı. Bir gece 37 °C'de inkübe edildi (Sambrook vd., 1989).

pGEM-T Easy vektörüyle uygulanacak transformasyonlar için, hazırlanan LB katı besiyerleri, 50 mg/ml ampicilin içermektedir. pGEM-T Easy vektör sisteminde bulunan mavi-beyaz koloni ayrımının yapılabilmesi için, transformasyon prosedürünün son basamağında, hücrelerin pertiye yayılmasından önce, petrilere 40'ar µl IPTG (stok 100 mM) ve X-Gal (stok 40 mg/ml) yayıldı. Daha sonra bir gecelik inkübasyonun ardından oluşan beyaz kolonilere, alkalın lizis plazmit izolasyonu metodu uygulandı. Alkalın lizis prosedürüne göre öncelikle, gece kültürleri 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Pellet, solüsyon I (50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCl, ve 10 mM EDTA) ile çözündürüldü, vortexlendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Lizis için, solüsyon II (0,2 N NaOH, %1 SDS) eklendi, alt üst yapıldıktan sonra, 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. Protein presipitasyonu için, 2.25 M amonyum asetat eklendi, alt üst yapıldıktan sonra, 15 dk buzda inkübe edildi. Protein ve hücre atıklarını uzaklaştırmak için 12.000 rpm'de 15 dk santrifügasyon yapıldı. Plazmit DNA'yı içeren süpernatant pelletten ayrıştırıldı ve üzerine 600 µl izopropanol eklendi. 10 dk.lık inkübasyonun ardından 13.000 rpm'de 10 dk santrifügasyon yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet %70 lik soğuk EtOH ile yıkandı. 5 dk.lık muamelenin ardından 13.000 rpm'de 5 dk. santrifügasyon yapıldı. Süpernatant tekrar uzaklaştırıldı ve EtOH'u uçurmak amacı ile 37 °C'de 15 dk inkübasyon yapıldı. Son olarak, 100 µg/ml RNaz içeren TE (Tris-HCl, EDTA) tamponu ile pellet çözündürüldü. Plazmitler, 4 °C'de muhafaza edildi.

İzole edilen plazmitlerin, *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi tarafından kontrol kesimi yapıldı ve istenen genleri içeren koloniler tespit edildi. Üretilen pGEM-T-JauEnc ve pGEM-T-JauDyp plazmitleri, nükleotit dizilerinin belirlenmesi amacıyla MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

MacroGen firmasından gelen sekanslar, yapılan biyoinformatik analizlerle doğrulandıktan sonra, *JauEnc* ve *JauDyp* genlerinin, pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlamaları yapıldı. Klonlama işlemi için öncelikle, *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleriyle, pGEM-T-JauEnc, pGEM-T-JauDyp ve pET28a(+)

plazmitlerine, NEB firmasının önerdiği koşullar altında çift enzim kesimi uygulandı. Ardından kesilen DNA'lar, %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. pGEM-T'den ayrılan *JauEnc* ve *JauDyp* genleri, Qiagen Jelden Çıkarma kiti ile firmanın öngördüğü koşullar altında jelden ayrıştırıldı. Kesilen pET28a(+) vektörüne ise, enzim ve nükleotit atıklarından arındırmak üzere etanol presipitasyonu uygulandı. Etanol presipitasyonu için, DNA, hacminin 1/10'u kadar sodyum asetat (3 M, pH 5,2) ve hacminin üç katı kadar %96'lık etanol ile karıştırıldı. İki saat -20 °C de bekletildikten sonra 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 500 µl %96'lık etanol ilave edildi ve alt üst edildikten sonra 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant tekrar atıldı ve pelletin üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edildi. Alt üst edildikten sonra 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 37°C'lik etüvde 15 dk bekletildi ve sonra ddH₂O'da çözüldü.

NdeI ve *HindIII* yapışkan uçlarına sahip *JauEnc* ve *JauDyp* genleri, aynı uçlara sahip pET28a(+) vektörü ile T4 DNA ligaz tarafından birleştirildi. Ligasyonlar, 1/3 insert/vektör oranı ile, 1 U T4 DNA ligaz ve 1 X tampon içeren ortamda gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, 16 °C'de gece boyu inkübe edildi.

Ligasyon ürünlerinin transformasyonu için, yukarıda belirtilen kompetent hazırlama yöntemiyle, kompetent *E. coli* BL21 (DE3) Star hücreleri hazırlandı. Ardından yukarıda belirtilen transformasyon metodu ile ligasyon ürünlerinin *E. coli* BL21 (DE3) Star hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. 50 mg/ml kanamisin içeren LB agar petrilerinde üreyen kanamisine dirençli kolonilerle, önce plazmit izolasyonu, yukarıda tarif edilen alkalın lizis prosedürü ile gerçekleştirildi. Elde edilen plazmitlerin *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kontrol kesimi yapıldı. Kesim ürünleri, DNA ladder ile agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve BioRad Gel Analyzer ile görüntülendi.

Rekombinant DNA'ları içeren kolonilerden, 50 mg/ml kanamisin içeren LB katı besiyerine ekim yapıldı. pET28a-His-*JauEnc* ve pET28a-His-*JauDyp* klonlarını içeren petriler, daha sonradan yapılacak olan ekspresyon işlemi için 4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.3. Oligo-1,6- α -glukosidaz Geninin (*AaySuc*) Klonlanması

Anoxybacillus ayderensis Ay9 suşuna ait genom sekansı belirlenmiş olup NCBI, GenBank'ta, (GCF_000833605.1) bulunmaktadır. Bu genom sekansından, α -glukosidaz (*AaySuc*) geni (Lokus: NZ_JXTG01000005.1:c71127-69511) elde edildi. Snapgene

üzerinde gene uygun AaySuc_Forward: 5'-CCCATGGAACGGACATGGTGGAAAG -3' ileri ve AaySuc_Reverse: 5'- CGAATTCTTATTGTAATGCATACATTCTTGC -3' geri primerleri tasarlandı. Primerler, pGEM-T ve pET28a(+) vektörlerine uyumlu olarak tasarlandı. Primerlere, klonlama için gerekli olan, *NcoI* (N-terminal) ve *EcoRI* (C-terminal) restriksiyon endonükleaz tanıma bölgeleri eklendi. Ardından, primerlerin kalitesi ve uyumluluğu Fast PCR programında kontrol edildi ve Sentebiolab, Ankara firmasına sentezletirildi. Son olarak AaySuc genini çoğaltmak için Tablo 6'da belirtilen şartlar altında PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 6. Oligo-1,6- α -glukosidaz (AaySuc) için oluşturulan PCR Şartları

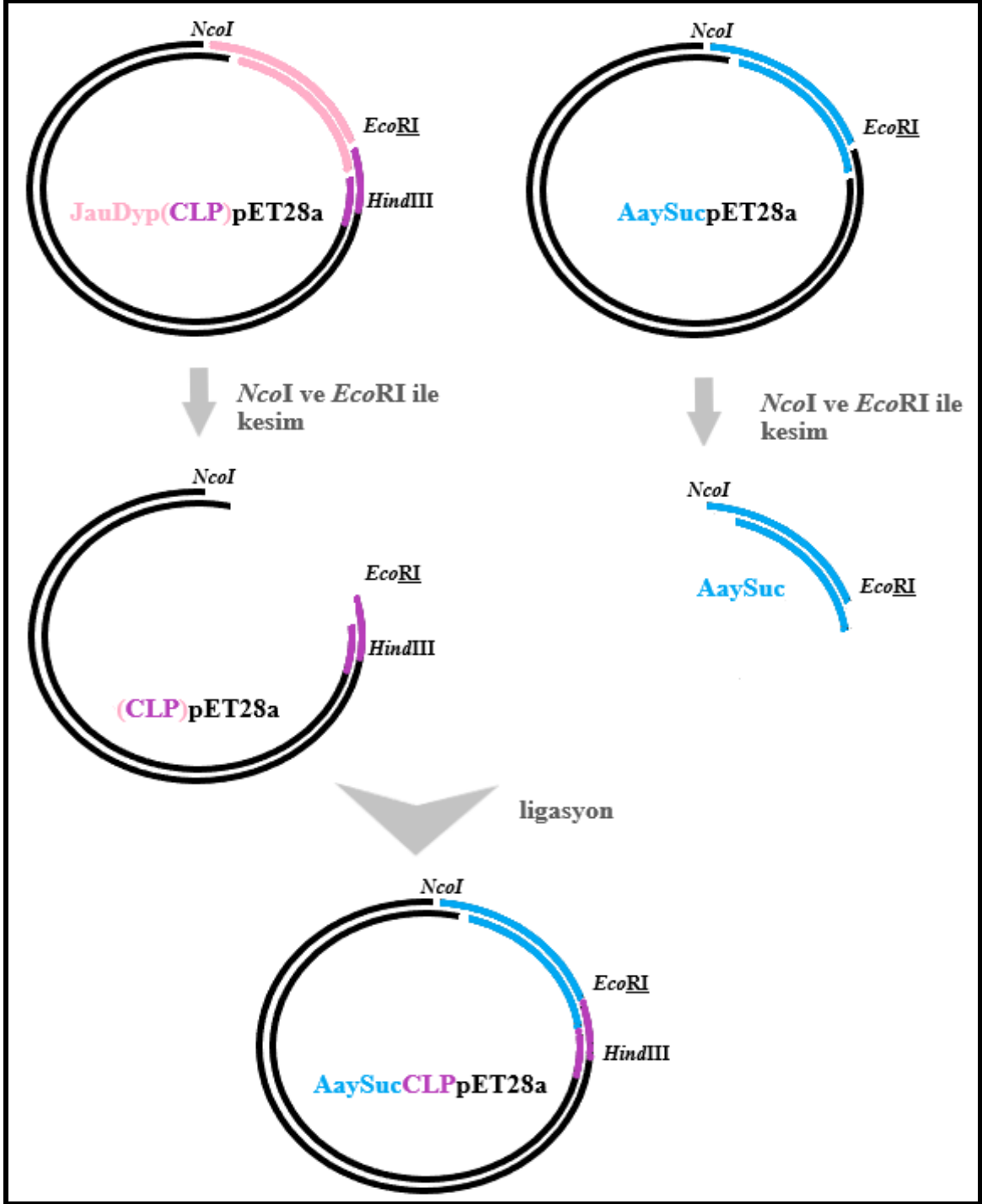
PCR reaksiyonu içeriği	PCR reaksiyon şartları
1X buffer 0,5 ug <i>J. aurantiaca</i> 8K307 gDNA 0,1 μ M JauEnc_Foward 0,1 μ M Jau Enc_Reverse 3 mM MgCl ₂ 0.2 mM dNTP 1,25 U T4 DNA polimeraz	1. 95 °C 3 dk 2. 95 °C 1 dk denatürasyon 3. 53 °C 1 dk bağlanma 4. 72 °C 1 dk uzama 5. 72 °C' de 5 dk son uzama 6. 4 °C soğutma
	2-4 36 döngü

AaySuc PCR fragmentinin elde edilmesinden, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edilmesine kadar olan tüm süreç, ‘‘2.3.2. *JauEnc* ve *JauDyp* genlerinin klonlanması’’ başlığı altında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Üretilen pET28aAaySuc klonu içeren bakteri, 50 mg/ml kanamisin içeren LB katı besiyerine ekildi ve daha sonra kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edildi.

2.3.4. Oligo-1,6- α -glukosidaz Genine CLP (Kargo Yükleme Peptidi) Kodlayıcı Dizisinin Eklenerek (AaySucCLP) Klonlanması

AaySuc geninin C-terminaline, CLP (Kargo yükleme peptidi)’nin kodlayıcı dizisinin eklenmesi için, 2.2.2’de elde edilen pET28a-His-JauDyp ve pET28aAaySuc klonları kalıp olarak kullanıldı. Her iki klon da, *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Ardından kesilen DNA’lar jel elektroforezinde yürütüldü. CLP içeren pET28a(+) vektörü ve sonlanma kodonu içermeyen AaySuc geni, Qiagen Jelden DNA elde etme kiti

yardımla firmanın öngördüğü şartlar altında jelden çıkarıldı. Daha sonra, 1/3 insert/vektör oranı ile 1 U T4 DNA ligaz ve 1 X T4 DNA ligaz tamponu kullanılarak ligasyon işlemi yapıldı. Enzim reaksiyonu için, inkübasyon 16 °C’de, gece boyu inkübe edildi (Şekil 13).



Şekil 13. *AaySuc* genine kargo yükleme peptidinin (CLP) eklenmesi

Ligasyon ürününün *E.coli* BL21 (DE3) suşuna transformasyonu Şekil 13’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Üretilen pET28aAaySucCLP klonu LB katı besiyerine ekildi ve daha sonra ekspresyon aşamasında kullanılmak üzere petri, 4 °C’de muhafaza edildi.

2.4. Ekspresyon ve Saflaştırma Çalışmaları

2.4.1. JauEnc, JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP Genlerinin Ekspresyonu

pET28a-His-JauEnc, pET28a-His-JauDyp, pET28a-AaySuc ve pET28a-AaySucCLP içeren *E. coli* suşlarından gece kültürleri yapıldı. Herbir gece kültüründen, 50 µg/mL kanamisin içeren LB’de, 37 °C’de, OD₆₀₀ 0,1 olacak şekilde inokülasyonlar yapıldı.

JauDyp ve *JauEnc* ekspresyonları için, OD₆₀₀=0,3-0,4 eriştiğinde, son konsantrasyon 0,5 mM IPTG eklenerek 18 °C’ de gece boyunca indükleme yapıldı (Cassidy-Amstutz vd., 2016). Ayrıca, *JauDyp* için 0,5 mM IPTG ile birlikte 1 µg/µl **hem** ilavesi yapıldı.

AaySuc ve *AaySucCLP* için, OD₆₀₀ 0,6-0,8 arasındayken, 1 mM IPTG eklendi ve 4 saat 37 °C’de inoküle edildi.

Ekspresyon sonrasında tüm örnekler, 11.000 rpm’de 5 dk. santrifuj edildi. Örneklerin tümünde süpernatantlar atılarak, pelletler, 20 mM imidazol içeren TBS tamponunda (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,4) çözündürüldü. 5 dk. Sartorius Labsonic marka sonikatör kullanılarak %70 güçte 1 döngü aralığında hücreler patlatıldı. Lizatlar, 14.800 rpm de 15 dk santrifuj edildi. Son olarak, tüm pelletler uzaklaştırıldı ve süpernatantlar - kısa süre için- 4 °C’ de muhafaza edildi.

2.4.2. JauEnc, JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP Proteinlerinin Saflaştırılması

JauEnc ve JauDyp proteinlerinin saflaştırılması için, Ni-afinite kromatografi yöntemi kullanıldı. Ni-afinite kromatografisinde; öncelikle, proteinlerin kararlı olduğu buffer A solüsyonu hazırlandı (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol pH 7,4). Bu solüsyonla kolon, dengeye getirildi. Buffer A ile, 1:1 oranında seyreltilmiş proteinler, kolona yüklendi. Ardından, Buffer B (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 500 mM imidazol,

pH 7,4) gradiyent olarak seyreltilmiş oranlarda kolondan geçirilerek, hedef proteinler fraksiyonlar halinde toplandı.

AaySuc ve AaySucCLP anyon değişim kromatografisi ile saflaştırıldı. Bunun için, öncelikle, Expasy Protparam'da, AaySuc ve AaySucCLP'nin amino asit dizilerinden yararlanılarak izoelektrik noktaları, sırasıyla 5,10 ve 4,99 olarak tespit edildi. Ardından, proteinin negatif yüklü olduğu (20 mM) pH 7 fosfat tamponu hazırlandı. Anyon değişim kromatografisi için, kuvvetli anyon değiştirici Q-Sefaroz ve 50 x 1,5 cm'lik kolon kullanıldı. Kolon, pH 7,0, 20 mM sodyum fosfat tamponu ile dengelendikten sonra, enzim, kolona akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde emdirildi. Farklı pI değerine sahip, kolona tutunmayan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için, 0-500 mM NaCl tuz köprüsü aracılığıyla tuz kademeli olarak kolondan geçirildi. Kolondan çıkan eluat, (elusyon), 3,0 ml olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirildi.

2.4.3. JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP Enzimlerinin Aktivite Reaksiyonları

Saflaştırma işlemlerinin ardından, JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP içeren fraksiyonların tespiti için, enzim aktivite testleri yapıldı.

JauDyp'nin ABTS substratına karşı aktivite testi için; 500 µl sodyum sitrat tamponu (Son hacim 100 mM, pH 3,0), 88 µl ABTS (Son hacim 0,2 mM), 0,000245 mg enzim, 44 µl H₂O₂ (Son hacim 0,4 mM) son hacim 1000 µl olacak şekilde dH₂O ile tamamlandı. 30 °C'de 20 dk.'lık inkübasyonun ardından spektrofotometrede 420 nm'de ölçüm yapıldı.

AaySuc ve AaySucCLP'nin α -pNPG'ye karşı aktivite testi için; 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,1 mM α -pNPG, 0,0006 mg enzim son hacim 500 µl olacak şekilde dH₂O ile tamamlandı. 40 °C'de 30 dk.'lık inkübasyonun ardından 500 µl Na₂CO₃ (son hacim 0,5 M) ile reaksiyon durduruldu ve 405 nm'de spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirildi.

Her iki aktivite testinde, enzim içermeyen reaksiyonlar kontrol olarak kullanıldı. Enzim yerine, gereken enzim miktarı kadar dH₂O bu reaksiyonlara ilave edildi.

2.4.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

JauEnc proteinin enzim aktivitesi bulunmadığından, saflaştırma sonrası, JauEnc içeren fraksiyonların belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanıldı. Yoğun mavi renk dönüşümü olan JauEnc fraksiyonları, SDS PAGE analizi için 4 °C’de muhafaza edildi.

Bradford yöntemi, aynı zamanda, JauEnc, JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP proteinlerinin miktar tayin analizlerinde kullanıldı (Bradford, 1976).

Analiz için öncelikle boya solüsyonu hazırlandı. 1000 mL boya solüsyonu için, 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası, 50 mL %95’lik etanol içinde iyice çözündürüldü, ardından, üzerine 100 mL %85’lik fosforik asit eklendi. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 1000 mL’ye tamamlandı ve son olarak hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı kullanılarak filtre edildi.

Hazırlanan boya ile BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda, protein konsantrasyonu standartı grafiği oluşturuldu. Standart grafiği için 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 90 µg BSA içeren çözeltiler, 0,15 M NaCl ile 100 µl’ye tamamlanıp her bir örneğin üzerine 3 mL hazırlanan boyadan eklendi. Protein ve boya karışımları vortekslenip oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.

Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlarda örnek 0,15 mM NaCl ile 100 µl’ye tamamlanarak 3 mL boya ilavesi yapıldı. Yine aynı prosedür uygulandıktan sonra standart grafiğin yüklendiği BioRad Gel Analyzer UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak, 595 nm’de ölçümler yapıldı. Tüm protein konsantrasyonları, µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.4.5. SDS PAGE Jel Elektroföresi ile Proteinlerin Görüntülenmesi

Saflaştırmanın ardından yapılan JauEnc, JauDyp, AacSuc ve AacSucCLP tespit analizleri ile renk oluşumu gözlenen fraksiyonların saflık derecelerinin kontrolü için, SDS PAGE jel elektroföresi yapıldı.

Protein özütlerinden uygun miktarlarda alınarak, bu özütlere eşit miktarda 2X muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl (pH 6,8), %4 SDS, %20 gliserol, %6 β-merkaptoetanol) ilave edildi ve sonrasında 95°C’de 5 dk. inkübe edilerek denatürasyonu sağlandı. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %12’lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için

15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi. Proteinler, elektroforezde ayrıldıktan sonra jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasıyla 45 dk. muamele edildi. Ardından, bağlanmayan boyadan jelin arındırılması için solüsyon I (%50 metanol, %10 asetik asit)'e aktarıldı ve 1 saat bekletildikten sonra proteinlerin sabitlenmesi için solüsyon II (%5 metanol, %7 asetik asit)'ye aktarıldı.

2.4.6. Diyaliz

SDS-PAGE'de analiz edilen her bir saf protein fraksiyon grubu, kendi aralarında birleştirilerek imidazol ve fazla tuzun uzaklaştırılması için kararlı oldukları tamponlara karşı diyaliz edildi.

JauDyp ve JauEnc, TBS (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,4) tamponuna karşı, gece boyu, buzda muhafaza edilerek diyaliz edildi. Proteinlerden imidazolün uzaklaştığından emin olmak için, örnekler, yeni bir TBS tamponu ile birkaç saat daha diyalize tabi tutuldu.

AaySuc ve AaySucCLP diyalizi, 20 mM sodyum fosfat (pH 7,4) tamponuna karşı, gece boyu buzda muhafaza edilerek yapıldı. Fazla tuzun uzaklaştığından emin olmak için yeni bir sodyum fosfat tamponu ile birkaç saat daha diyaliz yapıldı.

Diyalizin ardından, degrade olan proteinlerin eliminasyonu için en yüksek hızda 15 dk. santrifüjasyon yapıldı. JauDyp, JauEnc, AaySuc ve AaySucCLP içeren her bir süpernatant, karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı.

2.5. Kapsülasyon Çalışmaları

2.5.1. *In vitro*'da pH Aracılı Kapsülasyon

In vitro'da kapsülasyon için, öncelikle JauEnc karakterize edilip "assemble" formun hangi şartlarda dağılıp tekrar bir araya toplandığı belirlendi. Belirlenen şartlara göre kapsülasyon için bir metot geliştirildi. Kapsülasyon metodunda öncelikle, JauEnc, 50 mM sodyum sitrat (pH 3) tamponu ile 1 saat boyunca muamele edilerek kapsül yapının monomerlerine ayrılması sağlandı. Native jel ile kapsül yapının altbirimlerine ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Ortama 1/10 oranında kargo protein eklendi (JauDyp ve AaySucCLP için iki ayrı reaksiyon). İnkübasyon yapılmadan örnekler 50 mM sodyum

fosfat (pH 7) tamponuna karşı 1 saat boyunca diyaliz edildi. Son olarak ‘‘rekapsülasyon’’un kontrolü için ve kapsül yapının dışında herhangi bir kargo proteinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi için native jel ve zimogram ile kontrol edildi. Geliştirilen metotta kargo protein/enkapsülün oranı literatürden yola çıkılarak tercih edildi. Laboratuarda 1/2, 1/5 ve 1/10 oranlarında kapsülasyonlar yapılarak, kargo proteinlerin kapsül yapı dışında kalıp kalmadığı native jel ve zimogram ile tespit edildi. Son olarak, ideal oranın literatüre uygun olduğu teyit edilerek, yapılan tüm çalışmalara kargo/kapsül oranı 1/10 olarak devam edildi. Enkapsülün dışında herhangi bir kargo proteinin kalmış olup olmadığı, her kapsülasyon girişiminde native jel ile kontrol edildi.

JauDyp ve AaySucCLP enzimlerinin dışında, CLP etiketi içermeyen AaySuc proteinine de, zimogram analizinde karşılaştırma yapmak üzere, kapsülasyon metodu uygulandı.

2.5.2. Native PAGE

Protein özütlerinden uygun miktarlarda alınarak, bu özütlere eşit miktarda 2X muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8, %20 gliserol) ilave edildi. JauEnc, JauDyp ve JauDyp’yi kapsülleyen JauEnc proteinleri native jel için hazırlandı. Native PAGE jeli ile zimogram görüntüleri karşılaştırılmak üzere, her bir protein, daha sonra ikiye bölünerek jelin iki tarafına ikişer kez yüklendi.

Native PAGE prosedürü, denatüre edici şartlar (SDS, β -merkaptoetanol ve ısıtma) uygulanmadan Laemmli (1970) tarafından tanımlanan SDS PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemine göre yürütüldü. Prosedüre göre, ‘‘stacking’’ ve ‘‘separating’’ jelleri, sırası ile %4 ve %12 olarak hazırlandı. Daha sonra, 0,75 mm kalınlığındaki jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi. Proteinler, elektroforezde ayrıldıktan sonra jel ikiye bölündü ve bir parçasına Coomassie Brilliant Blue R-250 ile 45 dk. boyama yapıldı. Ardından jel, fazla boyadan arındırılması için solüsyon I (%50 metanol, %10 asetik asit) ‘e aktarıldı ve 1 saat sonra proteinleri sabitlemek üzere, solüsyon II (%5 metanol, %7 asetik asit)’ye aktarıldı. Jelin diğer yarısı ise, Dyp zimogramı analizinde kullanıldı.

AaySuc analizi için, aynı şartlarda bir native jel daha hazırlandı. Jele JauEnc, AaySuc, JauEnc ile kapsüllenen AaySuc, AaySucCLP ve JauEnc ile kapsüllenen AaySucCLP yüklendi. AaySuc zimogramıyla karşılaştırma yapmak için, örnekler jele

ikişer kez yüklendi. Proteinler yürütüldükten sonra jeller ikiye ayrılarak bir kısmı Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyandı ve diğer parça AacSuc zimogramına tabi tutuldu.

2.5.3. JauDyp Zimogram Analizi

JauEnc'in JauDyp'yi içine alıp almadığını tesbit etmek üzere, JauDyp zimogram yöntemi uygulandı.

Native PAGE prosedüründe belirtildiği gibi, Dyp zimogramı için ayrılan jel, 50 mg o-dianisidin substratı, 50 mM fosfat tamponu (pH 5,5), %3'lük H₂O₂ içeren solüsyona aktarıldı. Kahverengi bant oluşumu gözlenene kadar oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı (Sahinkaya vd., 2019).

2.5.4. AaySuc ve AaySucCLP Zimogam Analizi

Yukarıda belirtildiği gibi, AaySuc ve AaySucCLP zimogram analizi için ayrılan jel, 3 kez deiyonize su ile yıkandı ve 1 mg/ml sukroz içeren 100 mM sodyum fosfat tamponunda (pH7), 40 °C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından, solüsyon uzaklaştırılıp jel yıkandı ve 2,3,5- trifenyltetrazolium klorür (TTC) ve 1 N NaOH ile muamele edildi. Son olarak, mikrodalgada 2 dk ısıtılarak koyu kırmızı-kahverengi bant oluşumu gözlemlendi.

Aynı metot, AaySucCLP kapsülasyonunu tespit etmek amacıyla, 7,2 g/L maltoz substratı kullanılarak gerçekleştirildi.

2.5.5. JauEnc'in DLS ile Analizi

DLS analizi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Maden Mühendisliği Bölümünde, Nanopartikül Analiz Laboratuvarında Zetasizer Nano ZS90 cihazında gerçekleştirildi. TBS tamponunda (pH 7,4) bulunan 0,1 mg/l JauEnc'in, Zetasizer Nano ZS90 cihazında, cam küvette, 1 ml'lik hacimle "Protein Size" ölçümü yapıldı.

2.5.6. JauEnc'in Elektron Mikroskobu ile Analizi

Elektron Mikroskop analizi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz için, Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) JEOL JEM-1220 modeli kullanıldı. Elektron mikroskobu ile, *E. coli* BL21 (DE3) Star hücresinde aşırı ekspresyonu yapılarak saflaştırılmış olan JauEnc analiz edildi. Bunun için, TBS tamponunda (pH 7,4) bulunan 0,1 mg/l JauEnc kullanıldı.

2.6. Karakterizasyon Çalışmaları

2.6.1. JauEnc'in Karakterizasyonu

2.6.1.1. JauEnc'in Kapsül Formunun pH Kararlılığı

JauEnc, 50 mM ve 100 mM sitrat tamponu (pH 3,0-5,0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0-8,0) ve 50 mM sodyum fosfat (pH 8,0-9,0), 50 mM Glisin-NaOH (pH 10,0-12,0) tamponlarına, 15 dk. maruz bırakıldı, ardından native jelde yürütülerek, hangi pH'larda kapsül formunu koruduğu tespit edildi. Ayrıca, kapsül yapının açıldığı pH ortamı, değiştirilerek JauEnc'in "reassemble" formuna dönüp dönmediği, native jelde yürütülerek tespit edildi.

2.6.1.2. JauEnc'in Kapsül Formunun Termal Kararlılığı

JauEnc, 15 dk., 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C sıcaklıklara tabi tutuldu, ardından 1 sa. boyunca buzda bekletildi. Aynı sıcaklıklarda 30 dk. boyunca inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve inkübe edilmeden native jelde yürütülerek, hangi sıcaklıklarda stabil olduğu belirlendi.

2.6.1.3. JauEnc'in Kapsül Formunun Denatüre Edici Ajanlara Karşı Dayanıklılığı

JauEnc, farklı konsantrasyonlardaki denature edici GuHCl ve SDS kimyasallarına maruz bırakıldı, native jelde yürütülerek dayanıklılığı tesbit edildi. Ardından, JauEnc'in "disassemble" formuna döndüğü konsantrasyonlarda seyreltme yapılarak native jelde yürütüldü.

2.6.1.4. JauEnc'in Kapsül Formunun Metal İyonlarına Karşı Kararlılığı

Enkapsülinin "assemble" formunu 1 mM ve 5 mM Mg^{+2} , Ni^{+} , Ca^{+2} , K^{+} , Zn^{+2} ve Co^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} metal iyonları ile, oda sıcaklığında, yarım saat inkübe edildi. Numuneler native jelde yürütülerek "assemble" ve "disassemble" formlar tespit edildi.

2.6.1.5. JauEnc'in Tripsine Karşı Dayanıklılığı

JauEnc'in proteazlara karşı dayanıklılığını değerlendirmek için, 1 μ g JauDyp ile kapsüllenen JauEnc, 0,1 μ g, 1 μ g ve 5 μ g tripsin ile 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) 5, 15 ve 30 dk boyunca, 37 °C'de inkübe edildi. Ardından SDS PAGE ile proteinlerin degradasyon durumu değerlendirildi.

2.6.2. JauDyp, AaySuc, AaySucCLP, Enkapsülinlenen JauDyp ve Enkapsülinlenen AaySucCLP Enzimlerinin Karakterizasyonları

2.6.2.1. Optimum Sıcaklık

JauEnc ile kapsüllenen ve kapsüllenmeyen JauDyp'nin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, 30, 40, 50, 60, 70 °C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta gerçekleştirilen 20 dk.'lık seri reaksiyonlar ile ABTS substratı kullanılarak belirlendi. JauDyp aktivitesi için başlık 2.4.3'de belirtilen reaksiyon şartları kullanıldı (Sahinkaya vd., 2019).

JauEnc ile kapsüllenen ve kapsüllenmeyen AaySucCLP'nin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, 30, 40, 50, 60, 70°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta gerçekleştirilen 30 dk.'lık

seri reaksiyonlar ile α -pNPG substratı kullanılarak belirlendi. oligo-1,6- α -glukosidaz aktivitesi için 2.4.3'de belirtilen reaksiyon şartları kullanıldı.

2.6.2.2. Optimum pH

JauEnc ile kapsüllenen ve kapsüllenmeyen JauDyp'nin en iyi çalıştığı optimum pH değerini bulmak için, pH 1,0-6,0 arasındaki tamponlar kullanıldı. pH 1,0 ve 3,0 için Glisin-HCl, pH 3,0-6,0 için 50 mM sodyum sitrat tamponu kullanıldı. Reaksiyonlar belirlenen optimum sıcaklık değerinde ve ABTS substratı kullanılarak gerçekleştirildi (Sahinkaya vd., 2019). JauDyp aktivitesi için 2.4.3'de belirtilen reaksiyon şartları kullanıldı.

JauEnc ile kapsüllenen ve kapsüllenmeyen AaySucCLP'nin en iyi çalıştığı optimum pH değerini bulmak için pH 4,0-10,0 arasındaki tamponlar kullanıldı. pH 3,0-6,0 için 50 mM sitrat tamponu, pH 7,0-8,0 için 50 mM fosfat tampon, pH 8,0 için, 50 mM Tris-HCl ve pH 9,0-10,0 için Glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Reaksiyonlar belirlenen optimum sıcaklık değerinde ve α -pNPG substratı kullanılarak gerçekleştirildi. oligo-1,6- α -glukosidaz aktivitesi için 2.4.3'de belirtilen reaksiyon şartları kullanıldı.

2.6.2.3. Termal Kararlılık

JauDyp ve AaySucCLP'nin kararlılıklarına ısının etkisini incelemek için enzimler, belirli saat aralıklarında, kararlı oldukları tamponda, 30, 40 ve 50 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite (%); optimum pH ve sıcaklıkta, JauDyp için ABTS ile 20 dk.'lık, AaySucCLP için ise α -pNPG ile 30 dk.'lık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü. Enzim reaksiyon şartları 2.4.3'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

2.6.2.4. pH Kararlılığı

JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP'nin kararlılıklarına pH'nın etkisini incelemek amacıyla enzim, 50 mM sitrat tamponu (pH 6,0-8,0), 50 mM fosfat tamponunda, belli saat aralıklarıyla inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite (%); optimum pH ve sıcaklıkta JauDyp için ABTS ile 20 dk.'lık reaksiyonlar sonucunda, AaySuc ve

AauSucCLP için ise α -pNPG ile 30 dk.'lık reaksiyonlar sonucunda ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi (Enzim reaksiyon şartları 2.4.3'de belirtildi).

2.6.2.5. Metallerin Etkisi

JauDyp ve AaySucCLP'nin aktiviteleri üzerine metal iyonlarının etkisi; MgSO₄, NiCl₂, CaCl₂, KCl, ZnSO₄ ve CoCl₂, MnSO₄, FeSO₄, HgCl₂, CuSO₄ metal tuzları kullanılarak gerçekleştirildi. Her iki enzim, ilave edilen 1 mM ve 5 mM metal tuzları ilave edilerek kararlı oldukları pH'ya sahip tampon ve sıcaklıkta, yarım saat inkübe edildi. Bekletilen enzimlerle JauDyp için ABTS ve AaySuc ve AaySucCLP için α -pNPG substratları kullanılarak aktivite bakıldı. Enzimin diyaliz yapılarak metalden arındırılmış hali %100 kabul edilerek metal içeren enzimlerin kalan % aktivitesi hesaplandı.

JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP'nin aktivitesini yarisından fazla azaltan metallerle, JauEnc ile kapsüllenen JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP reaksiyonları yürütüldü. Enzim reaksiyon şartları, 2.4.3'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

2.6.2.6. Organik Çözücü, Sürfaktan, İndirgeyici ve Şelatlayıcı Ajanların Etkisi

Sürfaktanlardan %5 (v/v) SDS, %5 (v/v) Tween -20 ve %5 (v/v) Triton X-100; indirgeyici ajanlardan 25 mM DTT, 25 mM β -merkaptotanol ve 1 M GuHCl; metal bağlayıcı ajanlardan ise, 25 mM EDTA, 25 mM EGTA ve 0,5 M imidazolün JauDyp, AaySuc, AaySucCLP enzimleri üzerindeki aktiviteleri test edildi. Enzimlere, belirtilen tüm kimyasallar, oda sıcaklığında, pH 7,0'de, 1 saat boyunca maruz bırakıldı. Ardından, JauDyp için ABTS ve AaySuc ile AaySucCLP için α -pNPG substratları kullanılarak, 2.4.3'de belirtilen şartlar altında reaksiyonlar gerçekleştirildi. Kimyasal içermeyen reaksiyonlar, %100 kabul edilerek, kimyasallar içeren örneklerin kalan % aktiviteleri hesaplandı.

JauDyp ve AaySucCLP'nin aktivitelerini %50'nin altına düşüren kimyasallar, aynı koşullar altında, JauEnc içerisinde bulunan Jau Dyp ve AaySucCLP enzimlerine uygulandı ve ardından, enkapsülünmeyen JauDyp ve AaySucCLP üzerindeki etkilerle karşılaştırıldı.

2.6.2.7. Enzim Kinetiği

Kinetik veri analizinden önce ABTS ve α -pNPG substratlarının sönme katsayıları (epsilon değerleri) hesaplandı.

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) substratı, Dyp ile reaksiyonunun sonucunda $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ye okside olur. Sönme katsayısı hesaplamalarında ABTS (MW: 514,62 g/mol) substratı kullanıldı. ABTS reaksiyon şartlarında bulunan, 100 mM (pH 3,0) sodyum sitrat tamponu, 0,4 mM H_2O_2 ortamında 0,16, 0,32, 0,65, 0,97, 1,29, 1,62 μmol ABTS içeren 1 ml'lik örnekler hazırlandı. 30 °C'de 20 dk'lık inkübasyonun ardından 0,1 cm'lik küvette 420 nm'de ölçümler yapıldı. Son olarak, ABTS konsantrasyonu ve elde edilen absorbans verileri ile OriginPro 2023b programında doğrusal eğri elde edildi. Eğri denkleminin eğimi, küvetin ışık yolu uzunluğuna bölünerek sönme katsayısı hesaplandı.

α -pNPG (4-Nitrophenyl α -D -glucopyranoside) substratının, oligo-1,6- α -glukosidazla reaksiyonu sonucunda α -pNP (4-Nitrophenyl α -D) oluşmaktadır. α -pNP ürünü kullanılarak oligo-1,6- α -glukosidaz reaksiyon şartlarında örnekler hazırlandı. Buna göre, 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponunda, 0,04, 0,18, 0,36, 0,54, 0,72, 0,90, 1,08, 1,26'ar μmol α -pNP içeren 500 μl 'lik örnekler, 40 °C'de 30 dk inkübe edildi, ardından tüm örnekler 500 μl 'şer sodyum karbonat (son hacim 0,5 M) ilave edildi. Son olarak, 0,1 cm'lik kuvartz küvette 405 nm'de ölçümler alındı. Daha sonra, OriginPro 2023b programı ile lineer bir grafik oluşturuldu. Grafik denkleminde elde edilen eğim küvetin ışık yolu uzunluğuna bölünerek sönme katsayısı hesaplandı.

Enkapsülsiz JauDyp, AaySuc ve AaySucCLP ile enkapsülinlenen JauDyp ve AaySucCLP'nin kinetik verilerinin elde edilmesi için, değişik substrat konsantrasyonları ile seri reaksiyonlar gerçekleştirildi. Ardından oluşturulan Michaelis-Menten grafiğinin apsis ve ordinat değerlerinin tersi alınarak doğrusal Lineweaver–Burk grafiği elde edildi ve Lineweaver–Burk grafiği denklemi ile Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hesaplandı. Ayrıca enzimin spesifik aktivitesi ve k_{cat} ve k_{cat}/K_m değeri de hesaplandı. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp için kinetik parametreler, ABTS substratına karşı belirlendi. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP aktivitesi için, α -pNPG substratı kullanıldı. Enzim reaksiyon şartları, 2.4.3'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

2.6.2.8. Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen JauDyp Kararlılıklarının Karşılaştırılması

JauEnc ile enkapsülinlenen JauDyp'nin kararlılığı, kapsüllenmeyen JauDyp'nin en kararlı olduğu pH 7 tamponunda ve 30 °C sıcaklıktaki kararlılığı, 20 dk.'lık seri reaksiyonlar ile ABTS substratı kullanılarak belirlendi. Reaksiyonlar, 2.4.3.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

2.6.2.9. Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen AaySucCLP Kararlılıklarının Karşılaştırılması

JauEnc ile enkapsülinlenen, AaySucCLP'nin kararlılığı, kapsüllenmeyen AaySucCLP'nin en kararlı olduğu pH 7 tamponunda ve 40 °C sıcaklıktaki kararlılığı, 20 dk.'lık seri reaksiyonlar ile α -pNPG substratı kullanılarak belirlendi. Reaksiyonlar, 2.4.3.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. Biyoinformatik Çalışmalar

3.1.1. JauEnc ile İlgili Yapılan Biyoinformatik Çalışmalar

- Macrogen firmasının gerçekleştirdiği dizin analizinden elde edilen sekansın, NCBI GenBank'ta bulunan *Jiangella aurantiaca* 8K307'ya ait enkapsülün geni ile örtüştüğü tespit edildi (Şekil 14).

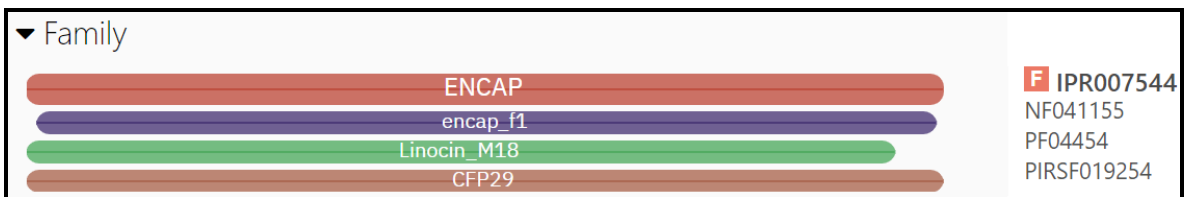
family 1 encapsulin nanocompartment shell protein [Jiangella aurantiaca]
Sequence ID: [WP_132103860.1](#) Length: 266 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 262 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
451 bits(1161)	8e-158	Compositional matrix adjust.	262/262(100%)	262/262(100%)	0/262(0%)	+1
Query 61	MNNLHRELapisaaaawadieaeaRRTFVQYVAARRVVDVIGPGDDVLQGVGTGHLRTL				240	
Sbjct 1	MNNLHRELAPISAAAADIEAEARRTFVQYVAARRVVDVIGPGDDVLQGVGTGHLRTL				60	
Query 241	PGDGLVArnsrevrpvvelrvpFNVDRQAVDDVERGAKDADWQPVKDAKKIAYAEDRAIV				420	
Sbjct 61	PGDGLVARSREVRPVVELRVPFNVDRQAVDDVERGAKDADWQPVKDAKKIAYAEDRAIV				120	
Query 421	AGFAAAGIEGIVAGTTNAPITLPGDVRELPDVAQALTTLLRLAGVGGPYSLLSAELYTA				600	
Sbjct 121	AGFAAAGIEGIVAGTTNAPITLPGDVRELPDVAQALTTLLRLAGVGGPYSLLSAELYTA				180	
Query 601	VEETTDHGYPiREHVARVLHDGEIVFAPAIDGGLLSARGGDYELHLAQDLSIGYLSHDA				780	
Sbjct 181	VEETTDHGYPiREHVARVLHDGEIVFAPAIDGGLLSARGGDYELHLAQDLSIGYLSHDA				240	
Query 781	DTIELYFEEAFTFLVQTGESGV				846	
Sbjct 241	DTIELYFEEAFTFLVQTGESGV				262	

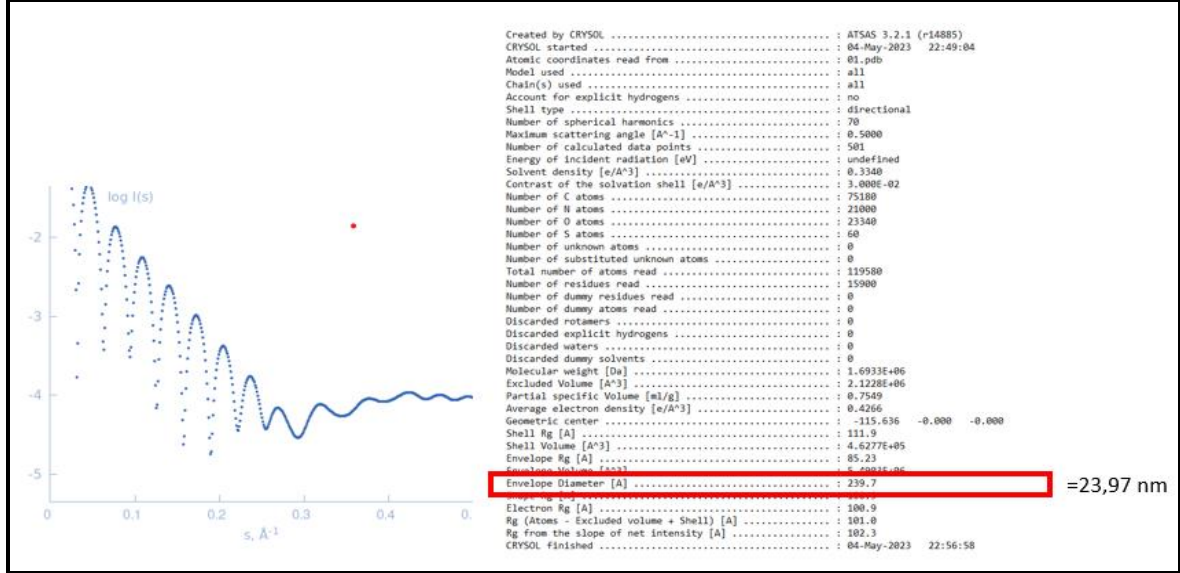
Şekil 14. JauEnc klonunun NCBI Blast analizi sonucu

- Interpro analizinde, JauEnc'in family 1 sınıfına ait enkapsülün nanokompartman olduğu tespit edildi (Şekil 15).



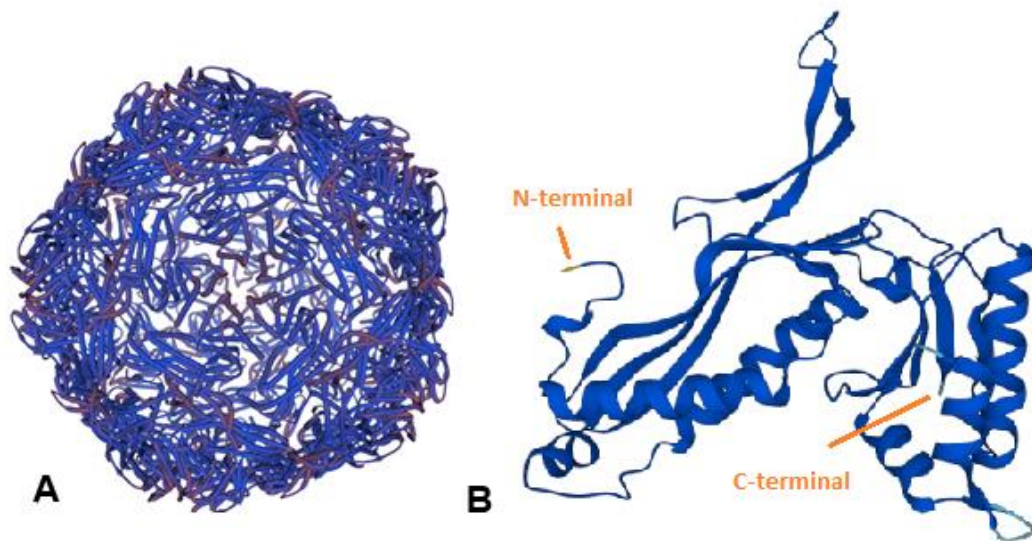
Şekil 15. JauEnc'in InterPro analizi sonucu

- Online Crysol programı ile JauEnc'in amino asit sekansından yararlanılarak, tahmini yarıçapı 23,97 nm olarak belirlendi. Crysol'un oluşturduğu temsili SAXS (Small Angle X-ray Scattering) grafiği, JauEnc'in yüksek polimer özellik gösterdiğini doğrulandı (Şekil 16).



Şekil 16. JauEnc'in Crysol programı ile temsili yarıçapının belirlenmesi

- JauEnc'in, Swiss-Model programı ile temsili üç boyutlu yapısı oluşturuldu. Yapı, homo-60-mer karakteristiği göstermektedir (Şekil 17).



Şekil 17. JauEnc'in temsili üç boyutlu yapısı (A. homo-60-mer (Kalıp: 6i9g.1.A), B. monomer yapısı (Kalıp: AF-A0A010Z2Q7.F1))

3.1.2. JauDyp ile İlgili Yapılan Biyoinformatik Çalışmalar

- Macrogen analizinden elde edilen sekansın, NCBI GenBank'ta bulunan *Jiangella aurantiaca* 8K307'ya ait Dyp geni ile örtüştüğü tespit edildi (Şekil 18).

Dyp-type peroxidase [Jiangella aurantiaca]							
Sequence ID: WP_132103859.1 Length: 331 Number of Matches: 1							
See 1 more title(s) ▼ See all Identical Proteins(IPG)							
Range 1: 1 to 331 GenPept Graphics				▼ Next Match ▲ Previous Match			
Score	Expect	Method	Identities		Positives	Gaps	Frame
656 bits(1692)	0.0	Compositional matrix adjust.	331/331(100%)		331/331(100%)	0/331(0%)	+1
Query 61		MTDPVTPQAVLGPLTEAAIFLVVTDDGGEDVARNLLADVSGLTRAVGFRSVEDNLT CIA				240	
Sbjct 1		MTDPVTPQAVLGPLTEAAIFLVVTDDGGEDVARNLLADVSGLTRAVGFRSVEDNLT CIA				60	
Query 241		GIGAGAWPRLVGGDPPSELHPFQEIAGRKH TAVTTPGDLMFHIRARRMDLCFELATLIAG				420	
Sbjct 61		GIGAGAWPRLVGGDPPSELHPFQEIAGRKH TAVTTPGDLMFHIRARRMDLCFELATLIAG				120	
Query 421		RLAGAVTVVDEVPGFRYFDQRDLLGFVDGTENPTGAAAAA VL SDEPGFEGGSYVVVQKY				600	
Sbjct 121		RLAGAVTVVDEVPGFRYFDQRDLLGFVDGTENPTGAAAAA VL SDEPGFEGGSYVVVQKY				180	
Query 601		LHMDA WNALPVEEQERVIGRRKLSDIELSDAEQPSNSHVALTTITDDDGEELEILRDNM				780	
Sbjct 181		LHMDA WNALPVEEQERVIGRRKLSDIELSDAEQPSNSHVALTTITDDDGEELEILRDNM				240	
Query 781		PFGRPGAGEFGTYFIGYAAHPDVIEQMLVNMFEVGRPPGNYDRILDFSVAVTGALFYVPTV				960	
Sbjct 241		PFGRPGAGEFGTYFIGYAAHPDVIEQMLVNMFEVGRPPGNYDRILDFSVAVTGALFYVPTV				300	
Query 961		EFLEGLADPPSPPTATDGS LNVGSLKRSDDS	1053				
Sbjct 301		EFLEGLADPPSPPTATDGS LNVGSLKRSDDS	331				

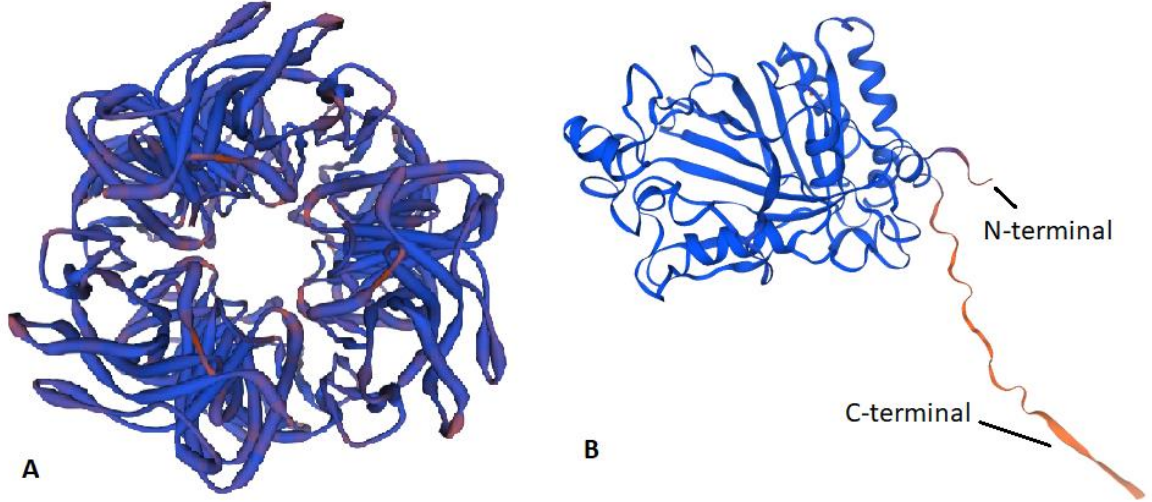
Şekil 18. JauDyp klonunun NCBI BLAST analizi

- Online InterPro programı ile JauDyp amino asit dizisinin, Dyp peroksidaz ailesine ve dimerik α/β barrel üst ailesine benzer olduğu tespit edildi (Şekil 19).

▼ Family		F IPR006314 PS51404 PTHR30521 TIGR01413
Dyp_peroxidase		
DYP_PEROXIDASE		
DEFERROCHELATASE/PEROXIDASE		
Dyp_perox_fam		
▼ Homologous Superfamily		H IPR011008 SSF54909
Dimeric_a/b-barrel		
Dimeric alpha+beta barrel		

Şekil 19. JauDyp'nin InterPro analizi

- Online Swiss-Model programı ile JauDyp'nin temsili üç boyutlu yapısı belirlendi. JauDyp, antiparalel olarak birbirine bağlı 3 Dyp dimerinin bir araya gelerek oluşturduğu bir hekzamer görünüm sergiledi (Şekil 20).



Şekil 20. JauDyp'nin temsili 3 boyutlu yapısı (A. Hekzamer (Kalıp: 7QZG), B. monomer (AF-A0A4R5AG25-F1))

- JauDyp, literatürde katalitik mekanizması çalışılmış olan diğer P sınıfı Dyp'lerle online Clustal Omega programında hizalandı, korunmuş bölgeler renklendirildi (McWilliam vd., 2013). Kırmızı çerçeve içinde (Şekil 21), korunmuş distal bölgedeki GXXDG motifi bulunmaktadır. Bu, JauDyp'de GFVDG'ye karşılık gelmektedir. Maviyle renklendirilmiş proksimal histidin, JauDyp için H219'a karşılık geldiği, hidrojen peroksit redüksiyonunda görevli korunmuş distal aspartik asit sarı, korunmuş distal arjinin ise yeşil ile renklendirildi (Şekil 21).

DyP	DVLLFLKAPDAETARRLVSECMSAL-EALASHIDVVEAGKREDG	152
DyPPa	ALWCWLRGEDRGEVTLRSHALERSL-APAFQRTGAVDAFLYGED	146
PpDyP	ALWLWLRGDERGDLRLRTQALEQAL-APALSLADSVDCFLHRGG	139
PoDyP	DVFIHAKCNTPSKLFELAQVVMKNMPANSVESFEDVYSFVYKNG	173
VcDyP	DVLIHCHATRHDLLFYTLRKGISDI-AQDIEIVDETYGFRYLDAR	151
YfeX	DVLIHILSLRHDVNFSAQAAMEAF-GDCIEVKEEIHGFRWVEER	150
TyrA	DLFVHLRCRDYDILHLVANEISQMF-EDLVELVEEERGFRFMD	158
BtDyP	DLFHIRAKQMGCLCFEFASILDEKL-KGAVVSVDETHGFRYMD	164
DypB	DLFHIKAARKDLFCFELGRQIVSAL-GSAATVVDEVHGFYFDS	160
MtDyP	DLFHIRAETMDVCFELAGRILKSM-GDAVTVVDEVHGFYFDS	156
JaDyP	DLMFHIRARFMDLCFELATLIAGRL-AGAVTVVDEVPGFRYF	155
DtpB	DLFHIRASRLDLCFALATEIMGRL-RGAVTPQDEVHGFYFDS	159
:	:	:
DyP	PISLAADILL---GDAYAGASFAFTQKFLFDWRAIAAMSPDSED	205
DyPPa	DA-ALEAALVSGRGAGLDGGSFVAVQWLHDFDRMQAIPGEEM	205
PpDyP	EE-AVQAAI-----AADGSSFAAFQWLKHDLQYFKSLPQADQ	192
PoDyP	EESRONIAVDK-----ETGGSYVITQKWIHDLQVIDKEKDK	228
VcDyP	E-KRAEVALVA--DGDFAGGSYVMVQRFVHNLPWNRLNLAAQ	206
YfeX	EETRREVAVIK--DGVDAGGSYVVFQWEHNLKQLNRMVSVDQ	208
TyrA	RH-RQEVALVGSSEDPFEKGGSYIHVQKYAHNLSKWHRLPLK	217
BtDyP	DENPYHFVIGEEADAFAGGSYVVFQKYIHDMAVNNALPVEQ	224
DypB	DD-AADSALIGDEDPDFRGGSYVIVQKYLHDMASAWNLTST	219
MtDyP	PI-AIKATTIGDEDRNFAGSCYVHVQKYVHDMASWESLSVTE	215
JaDyP	AA-AAAVAL--SDEPGFEGGSYVWVQKYLHDMADAWNLPVE	212
DtpB	AA-ARRAVLVGAEDPAFAGGSYAVVQKYLHDIDAWEGLSVEA	218
:	:	:
DyP	-----PQAPGDArIHRAHV--RDANGDNRKLLRQAL	234
DyPPa	-----PAYAHVKRTEQESF---EPAAFLLRGA	230
PpDyP	-----PASAHVKRTAQESF---EPEAFMVRRSV	217
PoDyP	SITSHVARMTGDKTLESWVGRSRPDSTELSRKSITSHVARMTG	288
VcDyP	N-----VPAASHVGRVDI--K-EEGKGLKIVRHSL	233
YfeX	E-----RPETSHLTRVDL--K-EDGKGLKIVRQSL	235
TyrA	D-----KPLTSHIKRVNL--KDENGKSIEILRQSM	245
BtDyP	E-----KPGNAHNAVNI-----GDDLKIVRANM	248
DypB	A-----QPSNSHVILNTI--VDDDGVEHDILRDNM	247
MtDyP	A-----KPANSHVALNVI--TDDDGTERKIVRHNM	243
JaDyP	E-----QPSNSHVALTTI--TDDDGSELEILRDNM	240
DtpB	V-----KPADSHVALTSV--TGPDGSELEILRDNM	246
:	:	:

Şekil 21. Uniprotta belirlenmiş P sınıfı Dyp'lerle yapılan Clustal Omega sonucu

3.1.3. AaySuc ile İlgili Yapılan Biyoinformatik Çalışmalar

- Macrogen firmasının gerçekleştirdiği dizin analizinden elde edilen sekansın, NCBI GenBank'ta bulunan *Anoxybacillus ayderensis* A9'e ait oligo-1,6 α -glukosidaz geni ile örtüştüğü tespit edildi (Şekil 22).

MULTISPECIES: alpha-glucosidase [Anoxybacillus]							
Sequence ID: WP_035064406.1 Length: 538 Number of Matches: 1							
See 4 more title(s) ▾ See all Identical Proteins(IPG)							
Range 1: 1 to 538 GenPept Graphics				▾ Next Match ▲ Previous Match			
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame	
1118 bits(2891)	0.0	Compositional matrix adjust.	536/538(99%)	538/538(100%)	0/538(0%)	+1	
Query 1	MERTWWEKAVVYQVYWSFFDSNGDGYGDLEGLIQKLDYIRDLGVDVIWLNPCYESPKDK						180
Sbjct 1	M+RTWWEKAVVYQVYWSFFDSNGDGYGDLEGLIQKLDYIRDLGVDVIWLNPCYESPKDK						60
Query 181	NGYDISDYRIMDKAGDMETFDRLLENEVHKRGMKIMDLVNHSTQHPWFIESRSSKDN						360
Sbjct 61	NGYDISDYRIMDKAGDMETFDRLLENEVHKRGMKIMDLVNHSTQHPWFIESRSSKDN						120
Query 361	PKRDWYIWRDKPNNWRSYFTPSAWEYDEKTGQYYFHSFAVEQPDNLWNEEVEEIEYKMM						540
Sbjct 121	PKRDWYIWRDKPNNWRSYFTPSAWEYDEKTGQYYFHSFAVEQPDNLWNEEVEEIEYKMM						180
Query 541	RFWLDKGIDGFRDLAIALAKPEGFPDAENPYDIRYLTNNPGVHDYLQEMHEKVLKHYDI						720
Sbjct 181	RFWLDKGIDGFRDLAIALAKPEGFPDAENPYDIRYLTNNPGVHDYLQEMHEKVLKHYDI						240
Query 721	FTVGEVAFVSPEEGLKYVGEDRNLHTLFHFEVCEMPTWDPPIRFKQIQKRWYEGWLGKG						900
Sbjct 241	FTVGEVAFVSPEEGLKYVGEDRNLHTLFHFEVCEMPTWDPPIRFKQIQKRWYEGWLGKG						300
Query 901	WNSQFLNNHDHTRQVTRYGNDKQFRVESAKLLATLVHTLPGTPIYQGEIEGTMGVKFDT						1080
Sbjct 301	WNSQFLNNHDHTRQVTRYGNDKQFRVESAKLLATLVHTLPGTPIYQGEIEGTMGVKFDT						360
Query 1081	IEDYNDIAMKNKYAEVAKGRDPKEVLESQLLSRDNSRTPMQWDDSEHAGFTTGTPWLK						1260
Sbjct 361	IEDYNDIAMKNKYAEVAKGRDPKEVLESQLLSRDNSRTPMQWDDSEHAGFTTGTPWLK						420
Query 1261	VNPNYKEINVKQALADPNVYYYYKKLIQLRKQHVMVYGTFRDFSENDPYIYAYTRELD						1440
Sbjct 421	VNPNYKEINVKQALADPNVYYYYKKLIQLRKQHVMVYGTFRDFSENDPYIYAYTRELD						480
Query 1441	GVRWLIVLNHCNDNDVYELPEELASAHRLHLLGNYTDVKEEGTTLYMRPHEARMYALQ						1614
Sbjct 481	GVRWLIVLNHCNDNDVYELPEELASAHRLHLLGNYTDVKEEGTTLYMRPHEARIYALQ						538

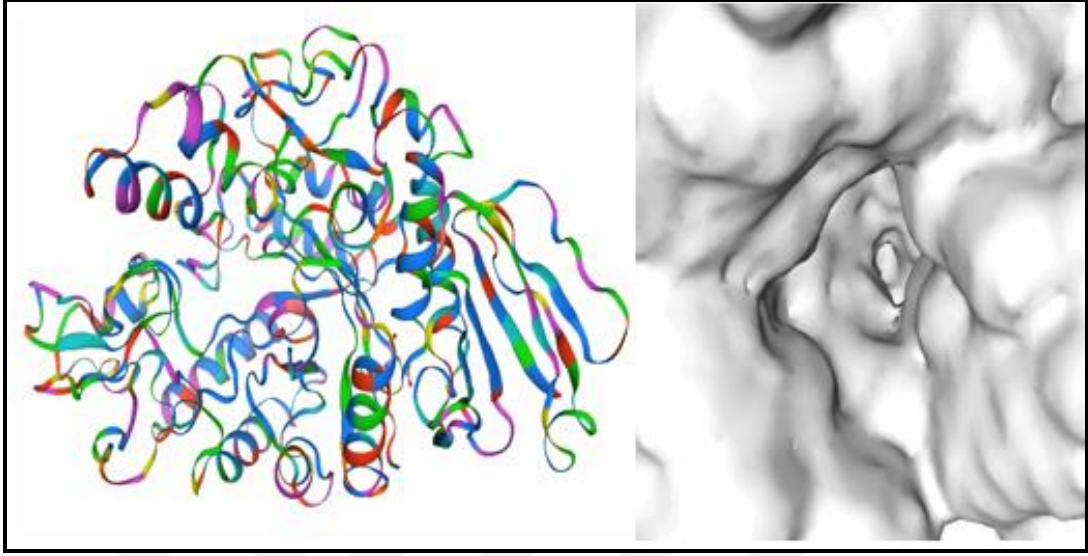
Şekil 22. AaySuc klonunun NCBI BLAST analizi sonucu

- Online InterPro programı ile AaySuc sekansının glikozil hidrolaz 13 ailesine benzer olduğu tespit edildi (Şekil 23).

▼ Domain	
Glyco_hydro_13_cat_dom	D IPR006047
aamy	SM00642
Alpha-amylase	PF00128
▼ Homologous Superfamily	
Gly...	H IPR013780
	G3DSA:2.60.40.1180
O16G...	H IPR045857
	G3DSA:3.90.400.10
Glycoside_hydrolase_SF	H IPR017853
(Trans)glycosidases	SSF51445

Şekil 23. AaySuc'ın InterPro analizi sonucu

- AaySuc sekansı, online swiss-model programında analiz edildi. AaySuc'un üç boyutlu yapısı belirlendi (Şekil 24).



Şekil 24. Swiss-Model'de oluşturulan AaySuc'ın üç boyutlu yapısı (Kalıp: A0A160F4Z8.1.A)

- AaySuc, Uniprotta aktif bölge ve 3 boyutlu yapısına ait verileri bulunan *Bacillus subtilis* 168 kaynaklı malL ile hizalandı. (Uniprot kod: O06994) (Şekil 25). Hizalama Clustal omega programı ile yapıldı (McWilliam vd., 2013).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment		
AaySuc	MERTWWEAVVYQVYWRSFESNGGEGLEGLIQKLDYIRDVGVDVIWLNPCYESPDKD	60
mall	-MSEWWKEAVVYQIYPRSFYDANGGEGDLQGVQKLDYIKNLGADVWLSPVFDSPQDD	59
*****:* ***:****:****:*****:****:*****.* :****.*		
AaySuc	NGYDISDYRIMDKAGDMETFDRLNEVHKRGMKIMDLVNVHTSDQHPWFIESRSSKDN	120
mall	NGYDISDYKNMYEKFGTNEEDMFQLIDEVHKRGMKIVMDLVNVHTSDEHAWFAESRKSND	119
*****.:*: * *: :*:*****:*****:*** ** **.*		
AaySuc	PKRDWYIWRD-----KPNNWRSYFTPSAWEYDEKTGQYYFHSFAVEQPDNLWENEEVRE	174
mall	PYRDYYLWKDPKPDGSEPNNWGSIFSGSAWYDEGTGQYYLHYFSKKQPDNLWENEAVRR	179
* **:*:*:* :**** * *: *** ** *****:* *: :***** **.		
AaySuc	EIYKMMRFWLDKGIDGFRLLDAIALLAKPEGFPDAENPYD-----IRYLTNNPGVHDYDQ	229
mall	EVYDVMRFWMDRGVDGWRMDVIGSISKYTDFPDYETDHSRSYIVGRYHSNGPRLHEFIQE	239
*.:*****:****:***. :*. :*** *. :. ** :*. :*****		
AaySuc	MHEKVLKHYDIFTVGEVAFVSPEEGLKYVGEDRNLHTLFHFVVCDE-----M	277
mall	MNREVLSHYDCMTVGEANGSDIEEAKKYTDASRQELNMIFTFEHMDIDKEQNSPNGKWQI	299
*.:**.* ** :****. . **. ***. :*****: * ** *		
AaySuc	PTWDPIRFKQIQKRWYEGWKGWNSQFLNNHHTRQVTRYGNDKQFRVESAKLLATLVH	337
mall	KPFDLIALKKTMRWQTGLMNVGWNLTLYFENHQPVRVSRWGNDKRLRKECAKAFATLVH	359
:* * :*: .** ** . ***: :*:***: * :*:*****: * **.*** :*:**		
AaySuc	TLPGTPYIYQGEEIGMTGVKFDIETEDYNDIAMKNKYAEEVAKGR--DPKEVLESQLLSR	395
mall	GMKGTPFIYQGEEIGMVNSDM-PEMYDDLEIKNAYRELVENKTMSEKEFVKAVMIKGR	418
: *****:*****. :. :* ***: :*** * *.:. :. **:***: : *		
AaySuc	DNSRTPMQWDDSEHAGFTTGTPWLKVNPNYKEINVQALADPNSVYYYYYKLIQLRKQHA	455
mall	DHARTPMQWDAGKHAGFTAGDPWIPVNSRYQDINVKESLEDQDSIFFYYQKLIQLRKQYK	478
*.:*****.:*****:* **: ** .*:*****: * * :*:*****:*****:		
AaySuc	VMVYGTFRDFSENDPIYAYTRELDGVRWLIVLNHCDNDNVYELPEELASAHRLHLLGNY	515
mall	IMIYGDYQLLQENDPQVFSYLREYRGEKLLVVNLSEEKALFEAPPELIHERWKVLISNY	538
*:** :. :.**** :*: * ** * :*:** :. :. :*: * ** : :*:**		
AaySuc	TDVKEEGTTLYMRPHEARMYALQ	538
mall	PQERADLKSISLKPYEAVMGISI	561
: : : .: :*:** *		

Şekil 25. AaySuc'un Clustal Omega ile hizalaması (Yeşil gölgelendirme, kalsiyum bağlanma bölgelerin, sarı gölgelendirmeler ise, katalitik bölgeyi temsil etmektedir)

- Klonlanan *AaySuc* ve *AaySucCLP* gen dizileri Clustal Omega ile karşılaştırıldı (McWilliam vd., 2013). Oligo-1,6- α -glukosidazın C-terminaline kodlayıcı peptit dizisi olarak eklenen EFLEGLADPPSPATPDGSLNVGSLKRSDDS dizisinin doğruluğu teyit edildi (Şekil 26).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment			
AaySucCLP	MERTWWKEAVVYQVYWRSFFDSNGDGYGDLEGLIQKLDYIRD LGVDVIWLNPCYESPDKD	60	
AaySuc	MERTWWKEAVVYQVYWRSFFDSNGDGYGDLEGLIQKLDYIRD LGVDVIWLNPCYESPDKD	60	

AaySucCLP	NGYDISDYRIMDKAGDMETFDRLNEVHKRGMKLIMDLVVNHTSDQHPWFIESRSSKDN	120	
AaySuc	NGYDISDYRIMDKAGDMETFDRLNEVHKRGMKLIMDLVVNHTSDQHPWFIESRSSKDN	120	

AaySucCLP	PKRDWYIWRDKPNNWRSYFTPSAWEYDEKTGQYYFHSFAVEQPD LNWENEEVREEIYKMM	180	
AaySuc	PKRDWYIWRDKPNNWRSYFTPSAWEYDEKTGQYYFHSFAVEQPD LNWENEEVREEIYKMM	180	

AaySucCLP	RFWLDKGIDGFR L DAIALLAKPEGFPDAENPYDIRYL TNNPGVHDY LQEMHEKVLKHYDI	240	
AaySuc	RFWLDKGIDGFR L DAIALLAKPEGFPDAENPYDIRYL TNNPGVHDY LQEMHEKVLKHYDI	240	

AaySucCLP	FTVGEVAFVSPEEGLKYVGEDRNE LHTLFHFVCD EMTWDP I RFKQIQKRWYEG LWGKG	300	
AaySuc	FTVGEVAFVSPEEGLKYVGEDRNE LHTLFHFVCD EMTWDP I RFKQIQKRWYEG LWGKG	300	

AaySucCLP	WNSQFLNNHDHTRQVTRYGNDKQFRVESAKLLATLVHTLP GTPYIYQGEEIGMTGVKFDT	360	
AaySuc	WNSQFLNNHDHTRQVTRYGNDKQFRVESAKLLATLVHTLP GTPYIYQGEEIGMTGVKFDT	360	

AaySucCLP	IEDYNDIAMKNKYAE EVA KGRDPKEVLES LQLSRD NSRTPMQWDDSEHAGFTTGTPWLK	420	
AaySuc	IEDYNDIAMKNKYAE EVA KGRDPKEVLES LQLSRD NSRTPMQWDDSEHAGFTTGTPWLK	420	

AaySucCLP	VNP NYKEINVKQALADPNSVY YYYKKLIQLRKQHAVMVYGTFRDFS ENDPYIYAYTRELD	480	
AaySuc	VNP NYKEINVKQALADPNSVY YYYKKLIQLRKQHAVMVYGTFRDFS ENDPYIYAYTRELD	480	

AaySucCLP	GVRWLIVLNHCDNDNVYELPEELAS AHRHLL LGNYTDVKEEGT TLYMRPHEARMYALQEF	540	
AaySuc	GVRWLIVLNHCDNDNVYELPEELAS AHRHLL LGNYTDVKEEGT TLYMRPHEARMYALQ--	538	

AaySucCLP	LEGLADPPSP T PATDGSLNVGSLKRSDDS	569	
AaySuc	-----	538	

Şekil 26. AaySuc ve AaySuc CLP gen dizilerinin hizalaması (Sarı gölgelendirme, kargo yükleme peptidinin (CLP) kodlayıcı dizisini temsil etmektedir)

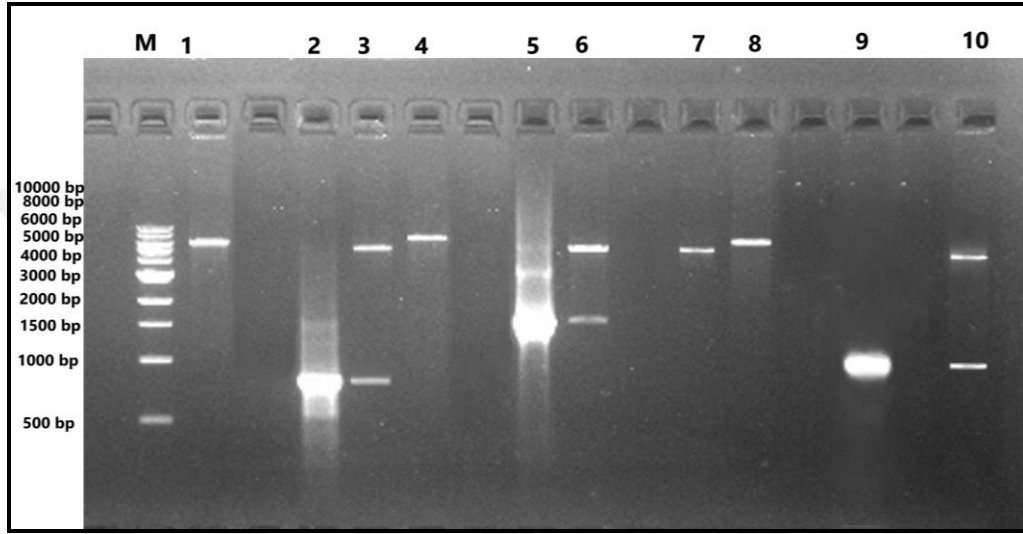
3.2. Klonlama Çalışmaları

3.2.1. *JauEnc*'in Klonlanması

JauEnc'nin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda 897 bp'lik fragment elde edildi (Şekil 27). Daha sonra, pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanan 897 bp'lik *JauEnc* fragmenti, pET28a-His-*JauEnc* klonunun *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesiymesiyle tespit edildi (Şekil 27).

3.2.2. *JauDyp*'nin Klonlanması

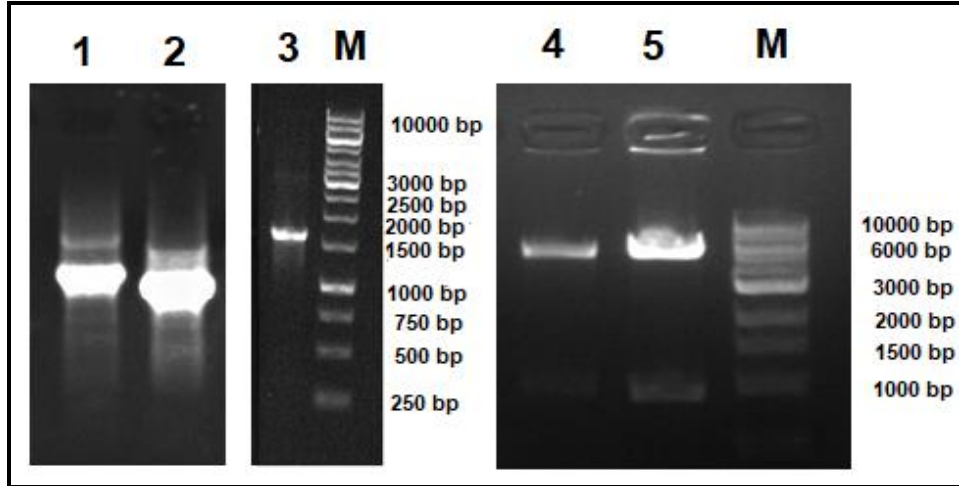
JauDyp'nin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda yaklaşık 1092 bp'lık fragment elde edildi. Daha sonra, pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanan 1092 bp'lık *JauDyp* fragmenti, pET28a-His-*JauDyp* klonunun, *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle tespit edildi (Şekil 27).



Şekil 27. *JauEnc*, *JauDyp* ve *AaySucCLP* klonlamalarından elde edilen DNA fragmentleri. (M. Marker, NEB N3232L, 1. *NdeI* ile kesilen pET28a-His-*JauEnc* klonu; 2. *JauEnc* PCR sonucu; 3. *NdeI* ve *HindIII* ile kesilen pET28a-His-*JauEnc* klonu; 4. *NcoI* ile kesilen pET28aAaySucCLP klonu, 5. *AaySucCLP* PCR ürünü, 6. *NcoI* ve *HindIII* ile kesilen pET28aAaySucCLP klonu; 7. *NdeI* ile kesilen pET28(a)+ vektörü (5369 bp), 8. *NdeI* ile kesilen -His-*JauDyp* klonu, 9. *JauDyp* PCR fragmenti, 10. *NdeI* ve *HindIII* ile kesilen pET28a-His-*JauDyp* klonu)

3.2.3. *AaySuc* ve *AaySucCLP*'nin Klonlanması

AaySuc ve *AaySucCLP*'nin elde edilmesi için gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda, sırasıyla 1620 bp ve 1704 bp'lık fragment elde edildi (Şekil 28). pET28a'ya klonlanan *AaySuc* fragmenti, pET28aSuc klonunun *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle tespit edildi. *JauDyp*'ye ait CLP dizisini içeren pET28a vektörüne klonlanan *AaySuc* fragmenti, pET28aSucCLP klonunun *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle tespit edildi.

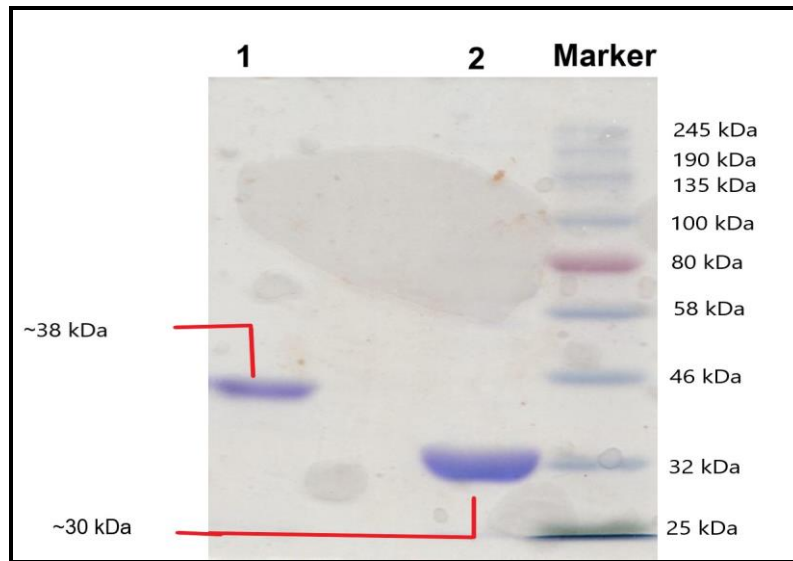


Şekil 28. AaySuc ve AaySucCLP'nin klonlanması. (1. AaySucCLP PCR fragmenti 2, 3. AaySuc PCR fragmenti, 4. *NcoI* ve *HindIII* ile kesilen pET28aAaySucCLP klonu, 5. *NcoI* ve *EcoRI* ile kesilen pET28aAaySuc klonu, M. Promega G5711 1kb DNA ladder)

3.3. Ekspresyon ve Saflaştırma Çalışmaları

3.3.1. JauEnc ve JauDyp'nin SDS PAGE Görüntüleri

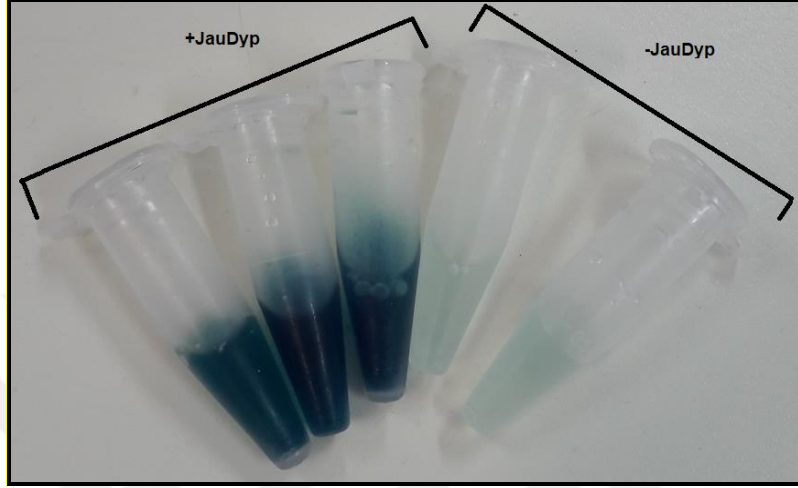
JauDyp ve JauEnc, metal (Nikel) afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE'de moleküler ağırlıkları, saf JauDy ~38 kDa ve saf encapsulin ~30 kDa olarak belirlendi (Şekil 29).



Şekil 29. JauDyp ve JauEnc proteinlerinin SDS PAGE analizi (Marker. NEB P7712S, 1. JauDyp, 2. JauEnc)

3.3.2. JauDyp'nin ABTS Substratıyla Yapılan Aktivite Testi

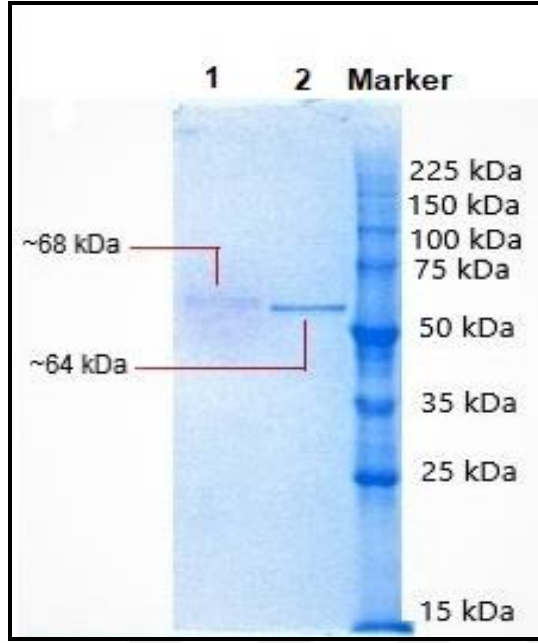
JauDyp'nin ABTS substratı ile yürütülen reaksiyonu sonucunda, $ABTS^{+\bullet}$ ürününün yol açtığı yeşil renk oluşumu gözlemlendi (Şekil 30).



Şekil 30. JauDyp'nin ABTS substratına karşı aktivite testi (JauDyp- reaksiyonun enzim içermediğini, JauDyp+ reaksiyonun enzim içerdiğini belirtmektedir)

3.3.3. AaySuc ve AaySucCLP SDS PAGE Görüntüsü

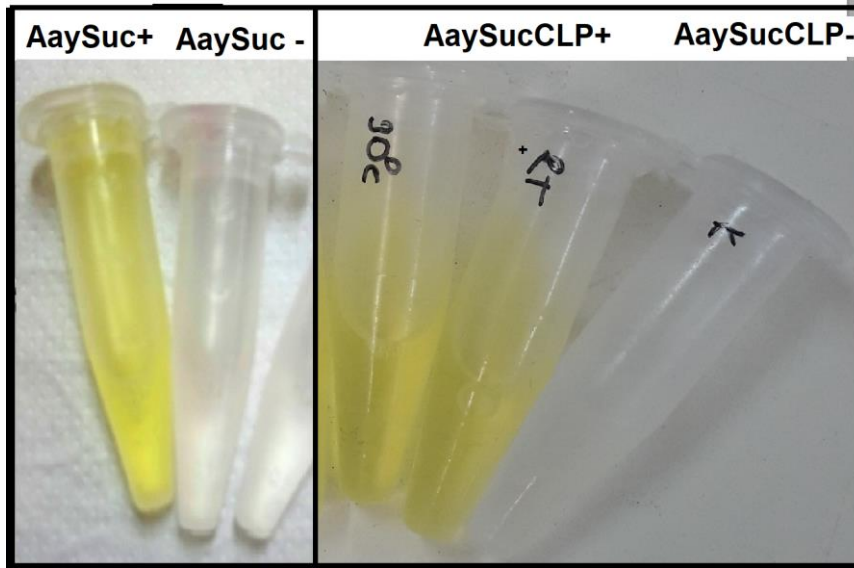
SDS PAGE analizi sonucunda, AaySuc ve AaySucCLP'nin, sırası ile ~64 kDa ve ~67 kDa'lık protein bantları tespit edildi (Şekil 31).



Şekil 31. AaySucCLP ve AaySuc proteinlerinin SDS PAGE analizi. (Marker. Promega V849A, 1. AaySucCLP, 2. AaySuc)

3.3.4. AaySuc ve AaySucCLP'nin α -pNPG Substratıyla Yapılan Aktivite Testi

AaySuc ve AaySucCLP'nin α -pNPG substratı ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda, aromatik α -pNP ürünün yol açtığı sarı renk oluşumu gözlemlendi (Şekil 32).

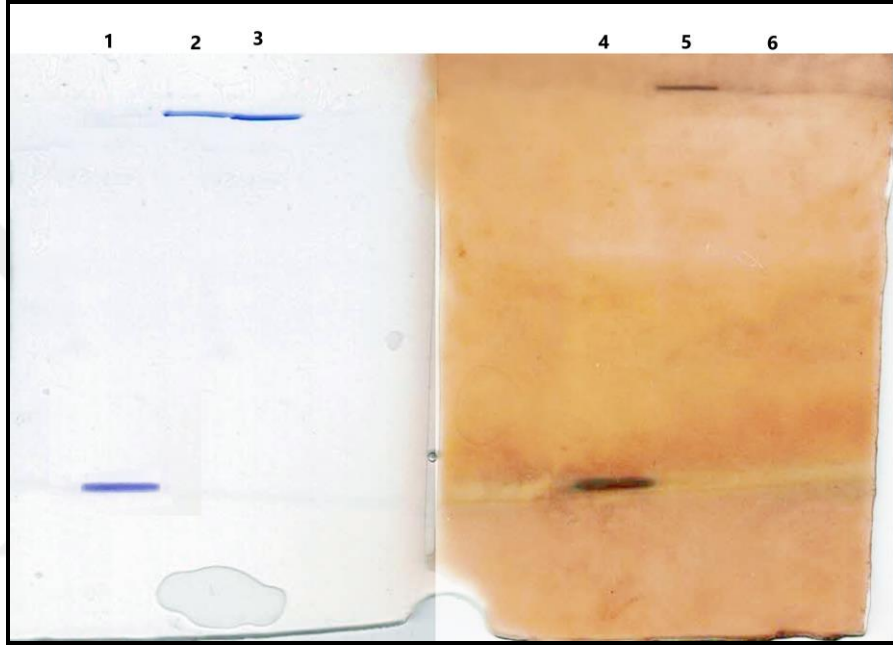


Şekil 32. AaySuc ve AaySucCLP'nin α -pNPG substratına karşı aktiviteleri (AaySuc – ve AaySucCLP- reaksiyonun enzim içermediğini, AaySuc+ ve AaySucCLP+ reaksiyonun enzim içerdiğini temsil etmektedir)

3.4. Kapsülasyon Çalışmaları

3.4.1. JauDyp Kapsülasyonunun Zimogram ve Native PAGE Karşılaştırması

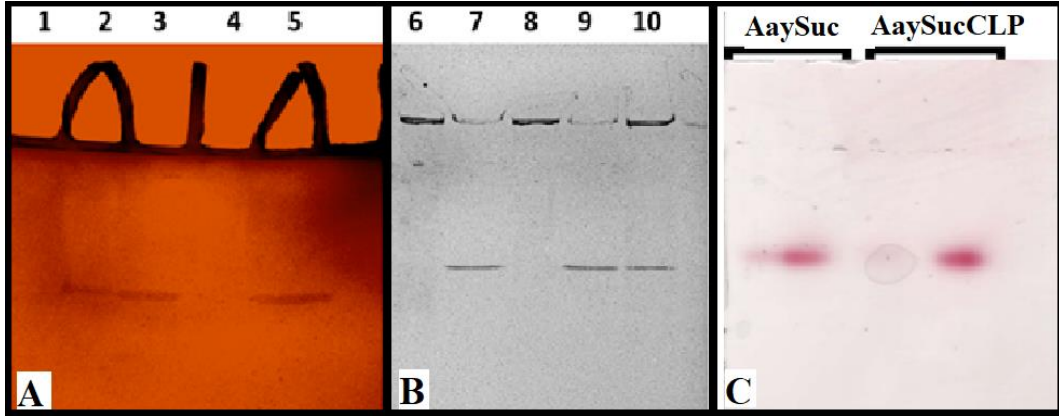
Native PAGE ve zimogram analizlerine göre, JauDyp'nin JauEnc tarafından kapsüllendiği gözlenmiştir (Şekil 33).



Şekil 33. JauDyp zimogramı ve native jel görüntüleri. (1,4. JauDyp; 2,5. JauEnc ile enkapsülinlenen JauDyp; 3,6. JauEnc)

3.4.1. AaySucCLP Kapsülasyonunun Zimogram ve Native PAGE Analizlerinin Karşılaştırması

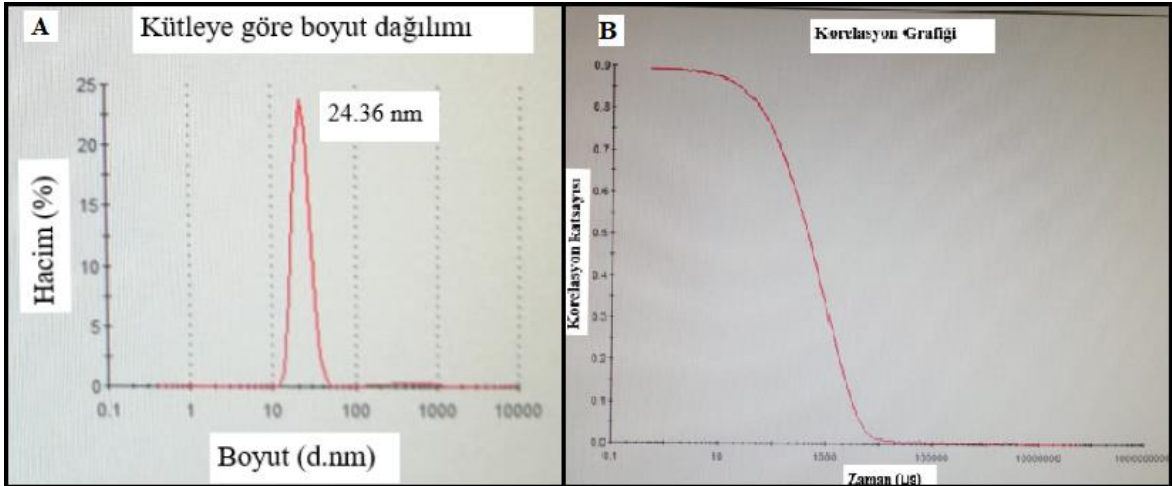
Native PAGE ve zimogram analizlerine göre, AaySuc'un JauEnc tarafından kapsüllenmezken, AaySucCLP'nin kapsüllendiği gözlenmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. oligo-1,6- α -glukosidaz zimogram ve native jel görüntüleri (A. Maltoz substratıyla yapılan zimogram analizi, B. Native PAGE analizi, 1,6. JauEnc, 2,10. JauEnc ile enkapsülinlenen AaySuc, 3,9. AaySuc, 4,8. JauEnc ile enkapsülinlenen AaySucCLP, 5,7. AaySucCLP, C. Sukraz ile yapılan zimogram analizi, AaySuc ve AaySucCLP'nin sukraz substratı kullanılarak yapılan zimogram analizleri)

3.4.2. JauEnc'in DLS ile Analizi

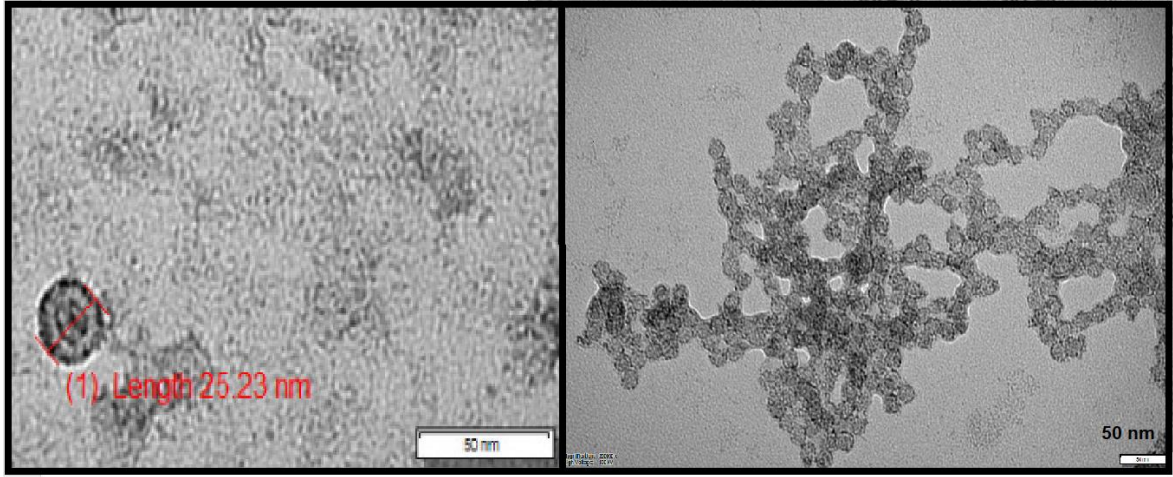
Yapılan DLS analizi sonucunda, kütleye göre boyut dağılım grafiğinde, ~24 nm'ye karşılık gelen bir pik elde edildi. Kütle dağılım grafiğinin doğruluğunu gösteren, korelasyon grafiği elde edildi (Şekil 35).



Şekil 35. Enkapsülin DLS analizi (A. Kütleye göre boyut dağılımı, B. Korelasyon Grafiği)

3.4.3. JauEnc'in Elektron Mikroskobu ile Analizi

E. coli BL21(DE3) Star hücresinde aşırı ekspres edilerek elde edilen ve saflaştırılan JauEnc'in transmisyon elektron mikroskop (JEOL JEM-1220 modeli) analizi sonucunda, 50 nm ölçek altında homojen küresel yapılar gözlendi. Küresel yapılar daha yakından incelendiğinde, çaplarının ~25 nm uzunlukta olduğu tespit edildi (Şekil 36).



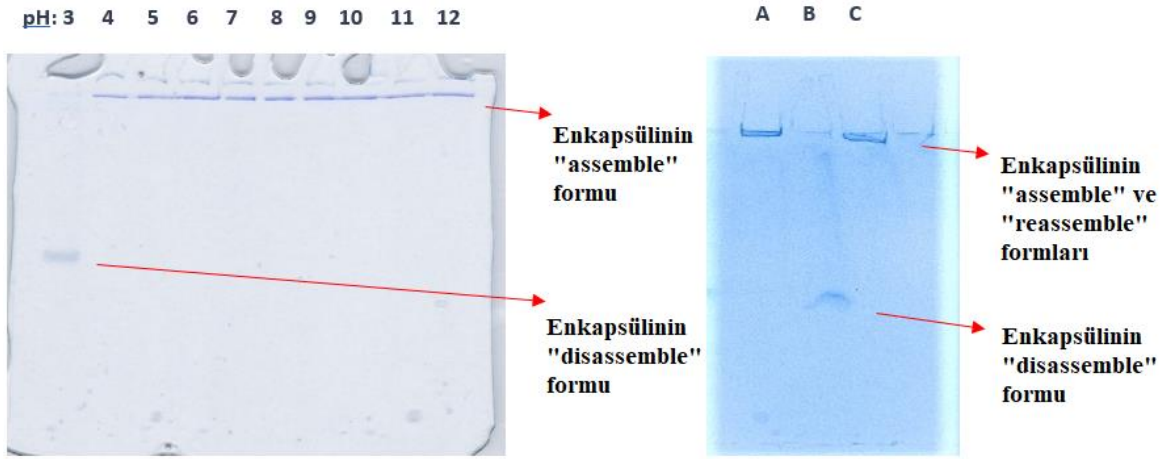
Şekil 36. JauEnc'in TEM görüntüsü

3.5. Karakterizasyon Çalışmaları

3.5.1. JauEnc'in Karakterizasyonu

3.5.1.1. pH Etkisi

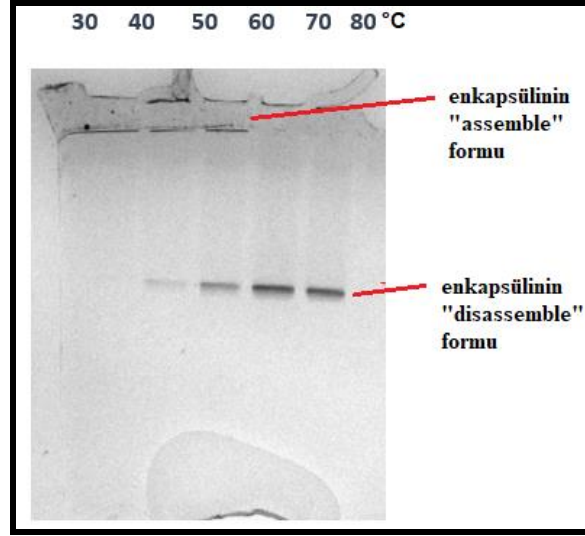
JauEnc'nin pH 4,0-12,0'da kapsül formda bulunurken, 50 mM sodyum sitrat pH 3,0 tamponunda ise altbirimlerine ayrıldığı gözlendi (Şekil 37). Şekil 37'deki sağ jel görüntüsünde, JauEnc'in pH 7,0'deki "assemble" formu, ortamın pH 3,0 ile değiştirildikten sonraki "disassemble" formu ve ortamın tekrar pH 7,0 ile değiştirildikten sonraki "reassemble" formu görülmektedir. (Şekil 37).



Şekil 37. JauEnc'in kapsül oluşturma özelliği üzerine pH'nın etkisi. (Sağdaki jel görüntüsü; A. pH 7'deki JauEnc; B. pH 3,0 ortamına alınan JauEnc; C. tekrar pH 7,0 ortamına alınan JauEnc)

3.5.1.2. Sıcaklık Etkisi

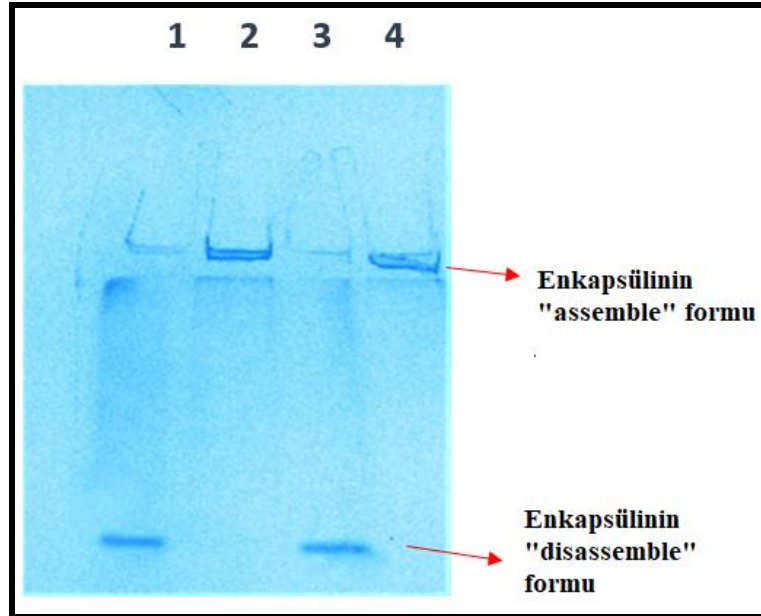
Şekil 20'de, sağdaki görüntüde, 30-80 °C'de 15 dk.lık buz inkübasyonun ardından elde edilen Native PAGE sonuçlarına göre, JauEnc'in, 50 °C'ye kadar "assemble" formunda olduğu, bununla birlikte 40 °C ve 50 °C'de kısmen ve 70 °C ve 80 °C'de ise tamamen altbirimlerine ayrıldığı gözlemlendi. Solda ise, 30 saatlik inkübasyonun ardından oda sıcaklığına alındıktan sonra Native-PAGE'de yürütülen JauEnc'lerin "disassemble" olan formlarının "reassemble" olabildiği, 80 °C'de ise kapsül yapının tamamen degrades olduğu görülmektedir (Şekil 38).



Şekil 38. JauEnc'in kapsül oluşturma özelliği üzerinde sıcaklık etkisi

3.5.1.3. İndirgeyici Ajan Etkisi

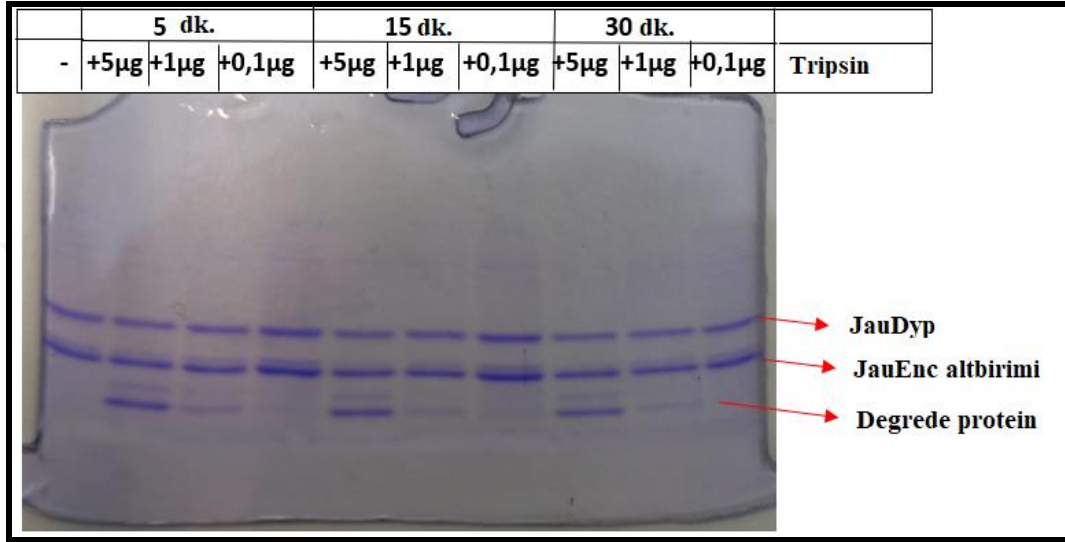
5 M GuHCl ve %20 SDS ortamında JauEnc'in altbirimlerine ayrıldığı ve denatüre olan kapsül yapının, 1 M GuHCl ve %5 SDS ortamına seyreltildiğinde tekrar kapsül form oluşturabildiği gözlemlendi (Şekil 39).



Şekil 39. Enkapsülinin kapsül oluşturma özelliği üzerine indirgeyici ajanların etkisi. (1. %20 SDS, 2. %5, 3. 5 M GuHCl, 4. 1 M GuHCl)

3.5.1.4. Proteaz Etkisi

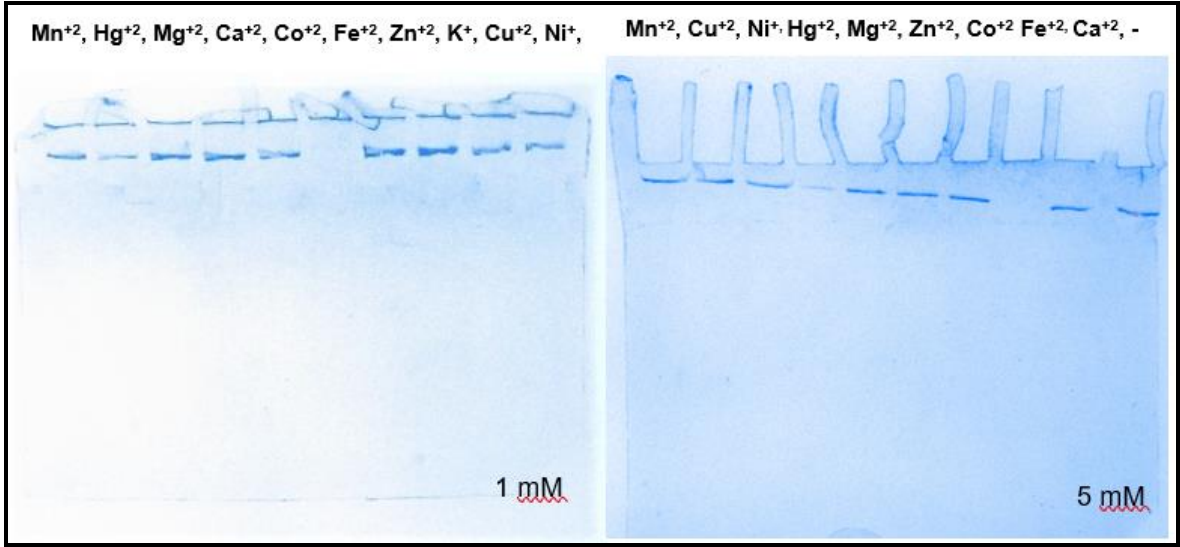
SDS PAGE analizine göre, JauEnc ile enkapsülinlenen JauDyp'nin 0,1 μg ve 1 μg tripsinle muamelesinin ardından protein degradasyonu gözlenmezken, 5 μg tripsinle muamele sonucunda, kısmi degradasyon gözlenmiştir (Şekil 40).



Şekil 40. Tripsinin Enkapsülin ve kargo protein üzerindeki etkisi

3.5.1.5. Metal İyon Etkisi

Native PAGE analizine göre, 1 ve 5 mM Mn^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , K^{+} , Cu^{+2} , Ni^{+} iyonlarının varlığında Enkapsülinin 1800 kDa'luk "assemble" formunun kuyucukta kaldığı ve Hg^{+2} varlığında ise zayıf bant oluşumu gözlemlendi. Diğer yandan, Fe^{+2} varlığında bant oluşumu gözlenmedi (Şekil 41).

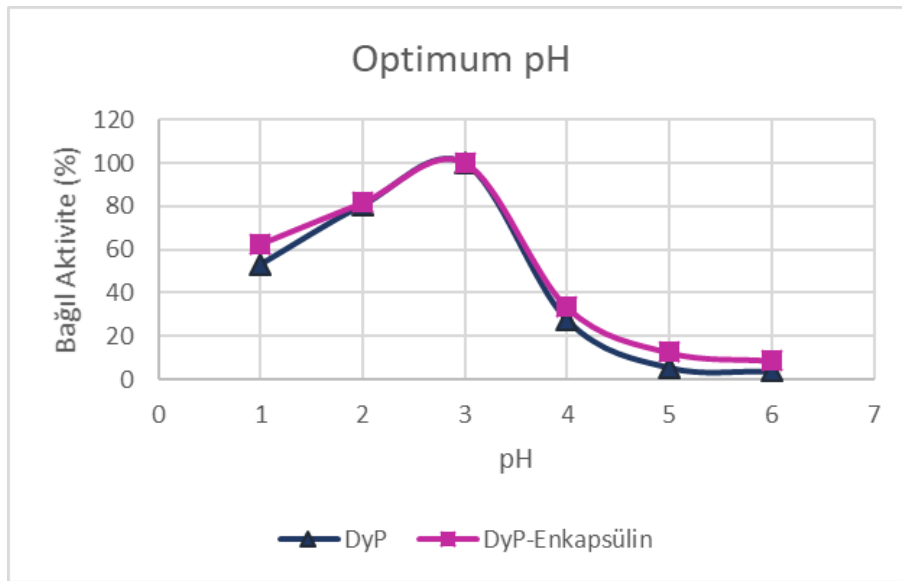


Şekil 41. 1 ve 5 mM'lik metal iyonlarının JauEnc üzerindeki etkisi

3.5.2. JauEnc ile Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin Karakterizasyonları

3.5.2.1. Optimum pH

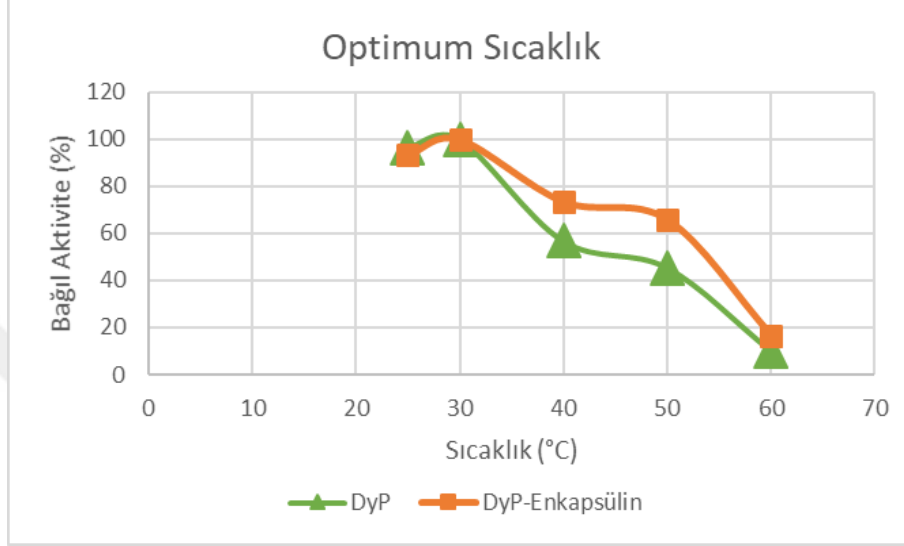
Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin optimum pH'sı 3,0 olarak belirlendi (Şekil 42).



Şekil 42. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin optimum pH'sı

3.5.2.2. Optimum Sıcaklık

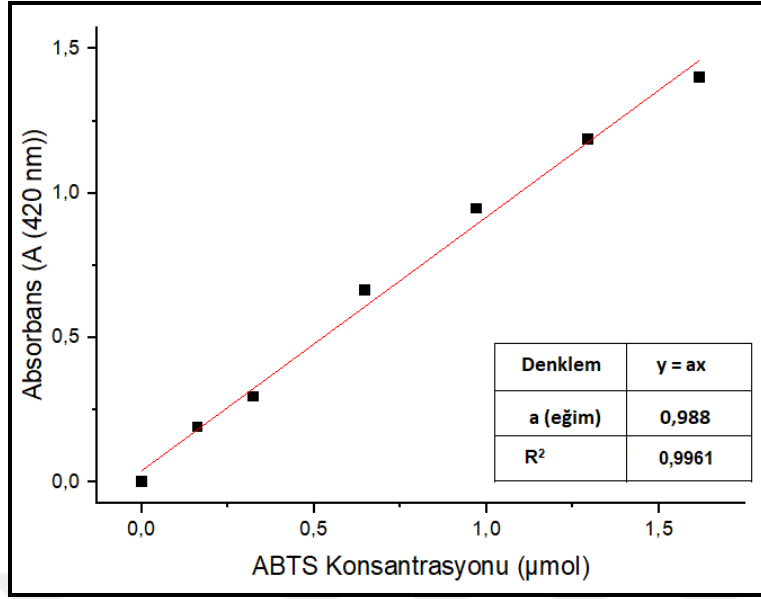
Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin optimum sıcaklığı 30 °C olarak belirlendi (Şekil 43).



Şekil 43. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin optimum sıcaklığı

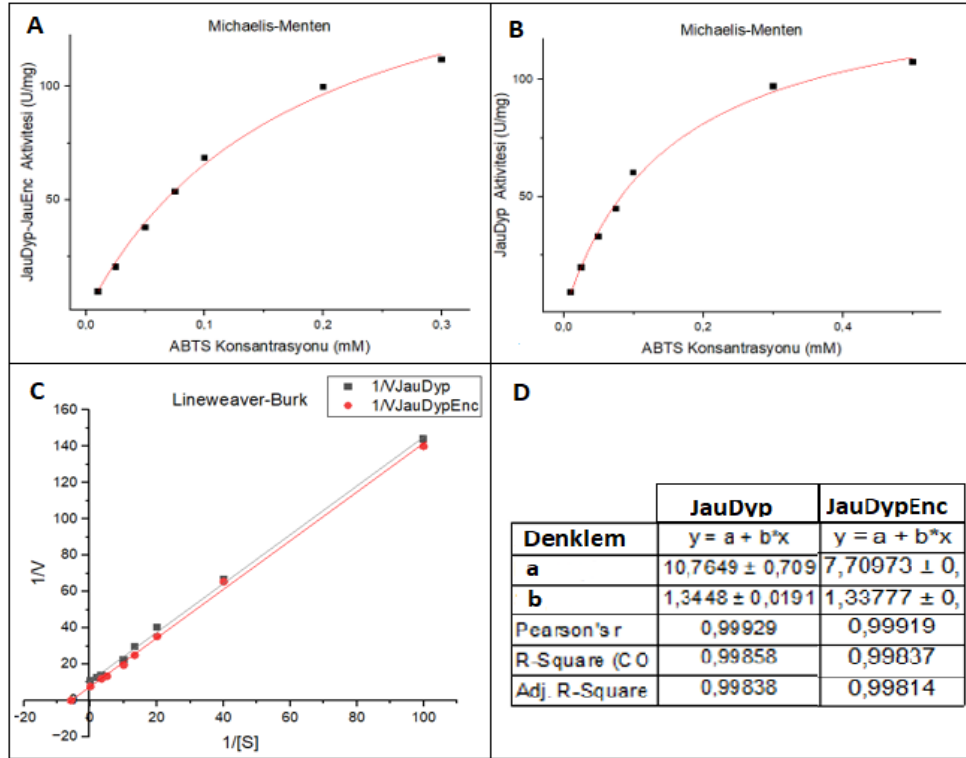
3.5.2.3. Kinetik Parametreler

ABTS'nin 420 nm'deki epsilon değeri (sönme katsayısı), $99 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak hesaplandı (Şekil 44).



Şekil 44. ABTS konsantrasyon-absorbansının doğrusal grafiği

Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin, ABTS substratına karşı oluşturulan Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 45'da, kinetik veriler ise Tablo 7'de verildi.



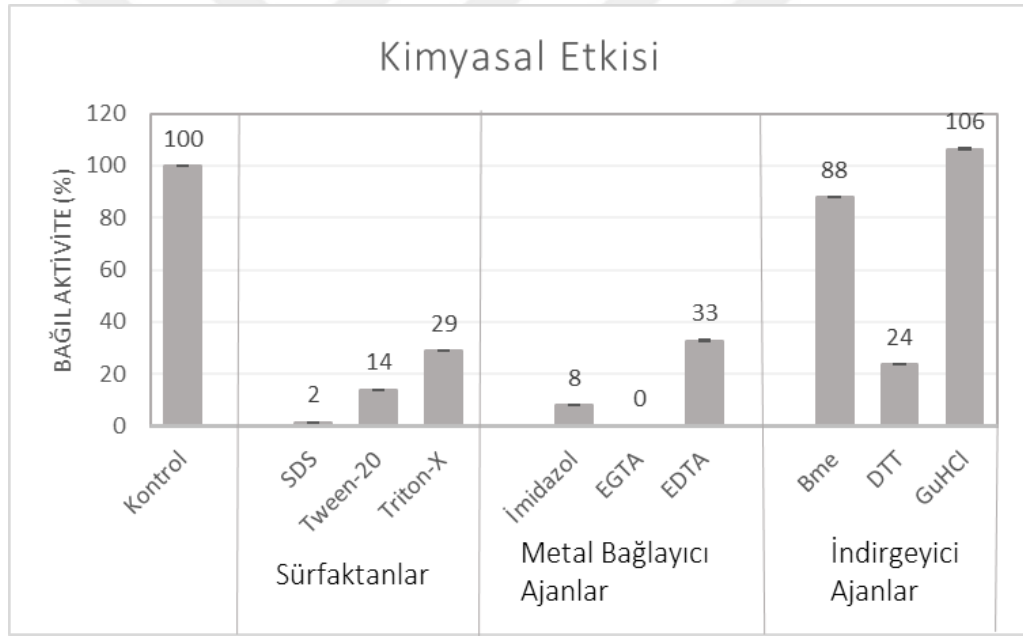
Şekil 45. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin ABTS substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri

Tablo 7. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin kinetik verileri

	K_m (mM)	V_{max} (Umg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
JauDyp	0,12	122,34	79,72	638,38
JauDypEnc	0,17	170,86	111,35	641,69

3.5.2.4. Sürfaktan, Şelatlayıcı ve İndirgeyici Ajanların JauDyp Aktivitesine Etkisi

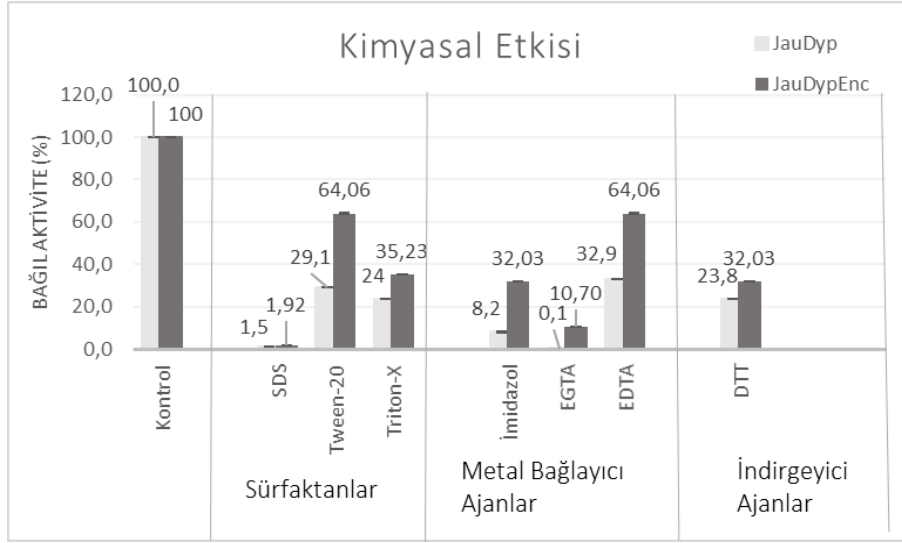
Yalnızca 1 M GuHCl JauDyp aktivitesini %6 oranında artırırken, 5 mM β -merkaptotanol %12 oranında aktiviteyi azaltmıştır. Bunlar dışındaki tüm kimyasallar JauDyp aktivitesini %50'nin altına düşürdü (Şekil 46).



Şekil 46. Kimyasalların JauDyp aktivitesine etkileri

3.5.2.5. Kimyasalların JauDyp ve Enkapsülinlenen JauDyp Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

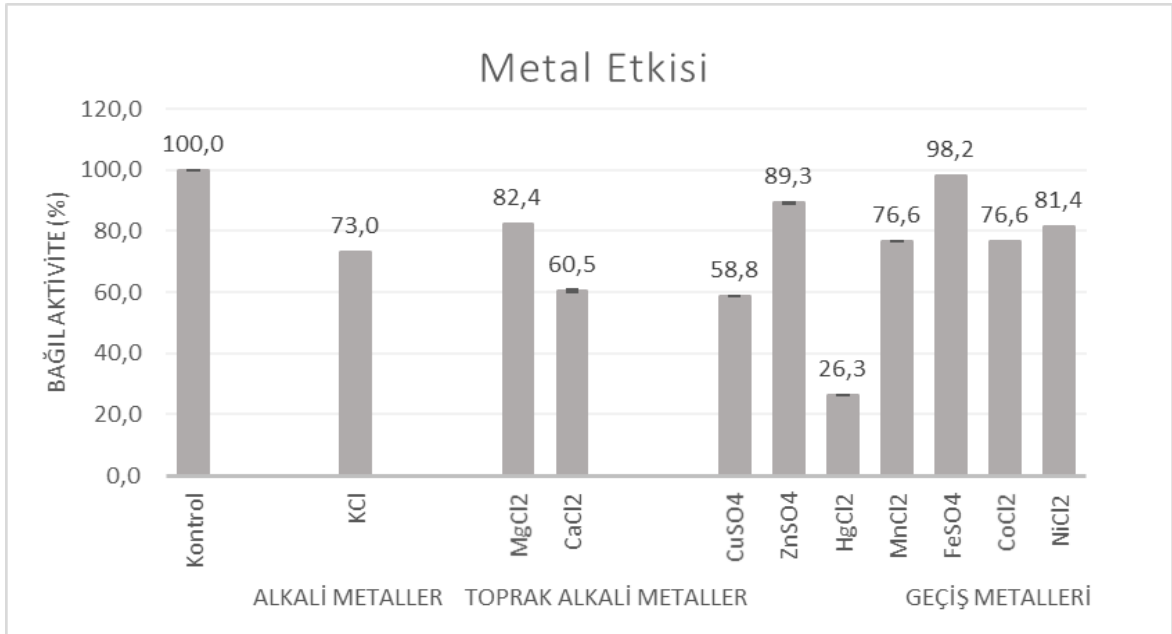
Tüm sürfaktan, şelatlayıcı ve indirgeyici ajanların, enkapsülinlenen JauDyp'nin aktivitesini, enkapsülin içinde bulunmayan JauDyp'ye, nazaran daha az düşürdüğü tespit edildi (Şekil 47).



Şekil 47. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin kimyasal etkilerinin karşılaştırılması

3.5.2.6. Metal İyonlarının JauDyp Aktivitesine Etkisi

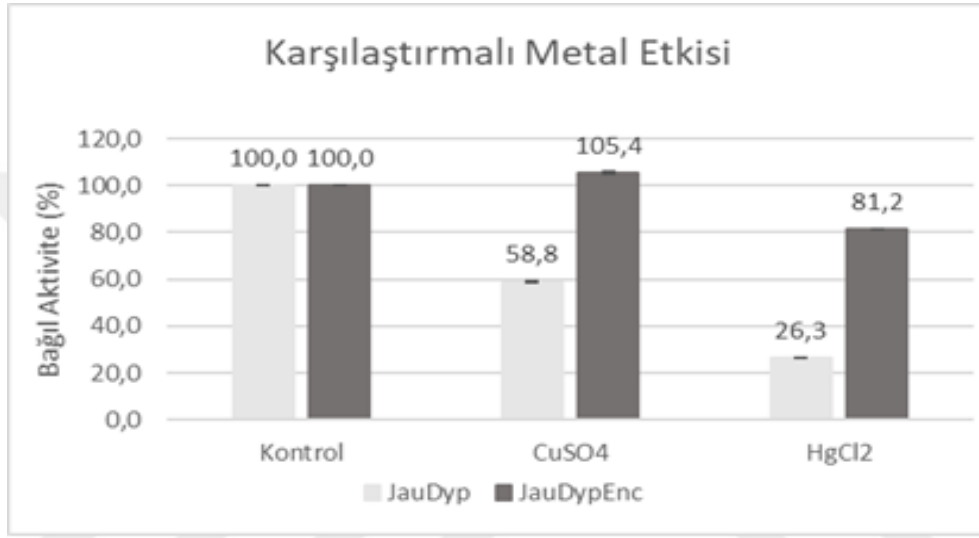
FeSO₄ dışındaki tüm metal iyonları, 1 mM konsantrasyonda JauDyp'nin aktivitesini düşürdü (Şekil 48).



Şekil 48. Metallerin JauDyp aktivitesi üzerindeki etkisi

3.5.2.7. Metal İyonlarının Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

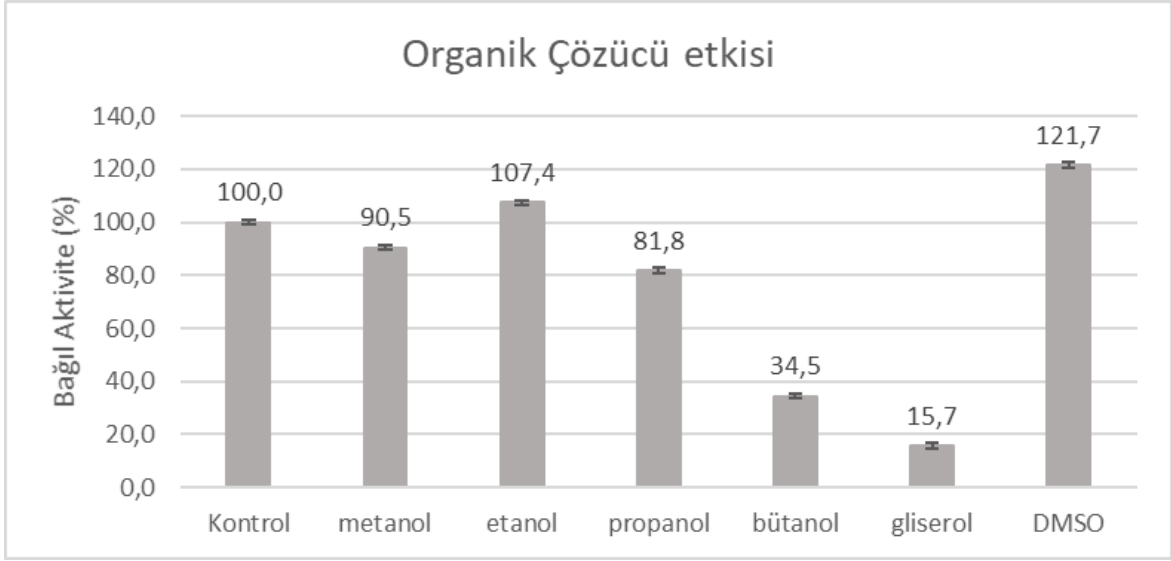
CuSO₄, JauDyp aktivitesini yaklaşık %40 oranında düşürürken, JauEnc içindeki JauDyp aktivitesini yaklaşık olarak %5 oranında artırdığı tespit edildi. HgCl₂ ise JauDyp'nin aktivitesini yaklaşık olarak %75 oranında düşürürken, JauEnc içinde bulunan JauDyp'nin aktivitesini yaklaşık olarak %20 oranında düşürdü (Şekil 49).



Şekil 49. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp üzerindeki metal etkilerinin karşılaştırılması

3.5.2.8. Organik Çözücülerin JauDyp Aktivitesine Etkisi

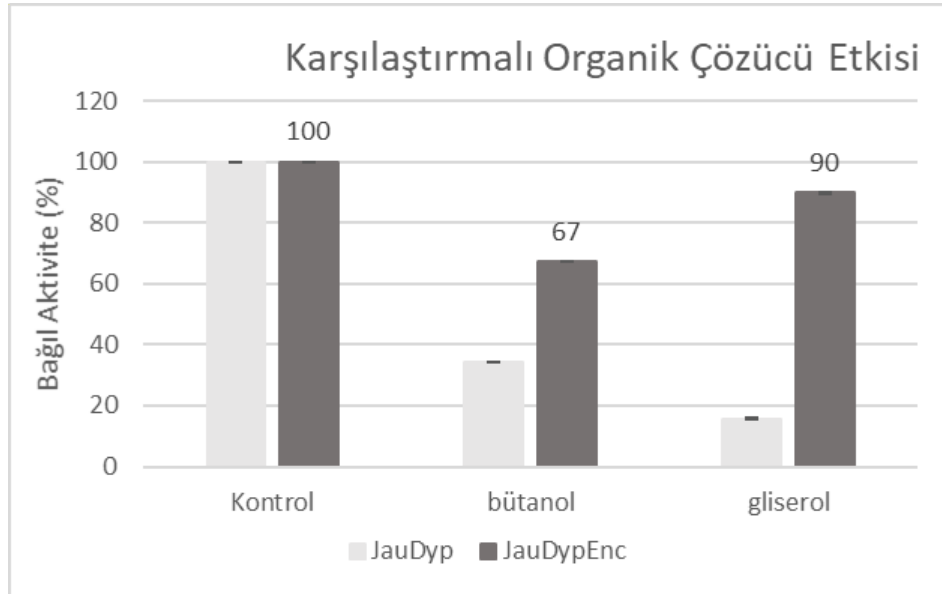
Etanol %7 ve DMSO %21 oranında JauDyp'aktivitesini artırırken, bütanol ve liserol ciddi derecede aktiviteyi düşürdü. Metanolün %10'luk, Propanolün ise %20'lik bir aktivite kaybına yol açtığı gözlemlendi (Şekil 50).



Şekil 50. %5 oranındaki organik çözücülerin JauDyp aktivitesi üzerindeki etkisi

3.5.2.9. Organik Çözücülerin Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen JauDyp Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

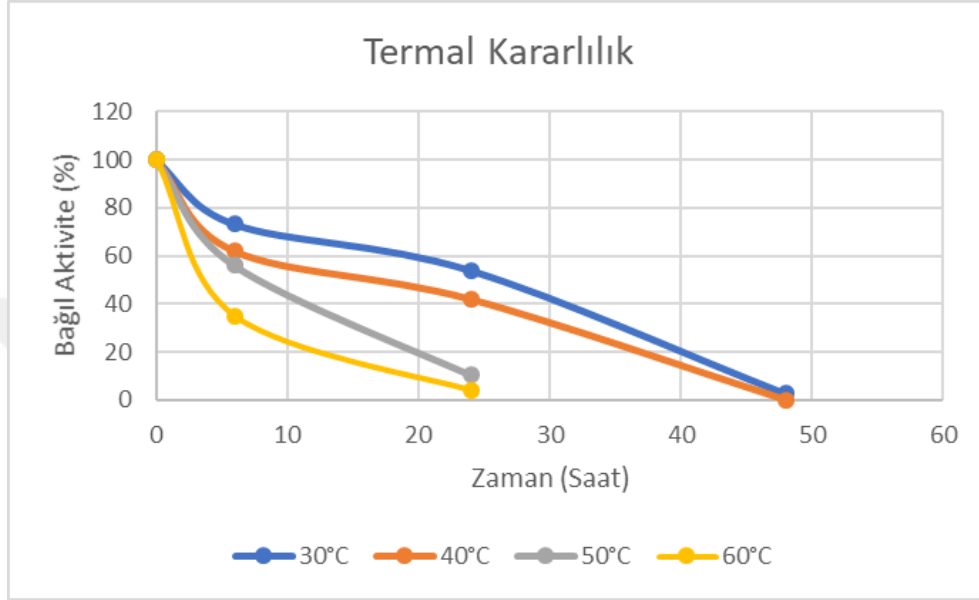
JauDyp'ye kıyasla JauEnc içinde bulunan JauDyp aktivitesinde, bütanol için yaklaşık %30, gliserol için ise %74 düşüş gözlemlendi (Şekil 51).



Şekil 51. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin organik çözücü etkilerinin karşılaştırılması

3.5.2.10. JauDyp'nin Termal Kararlılığı

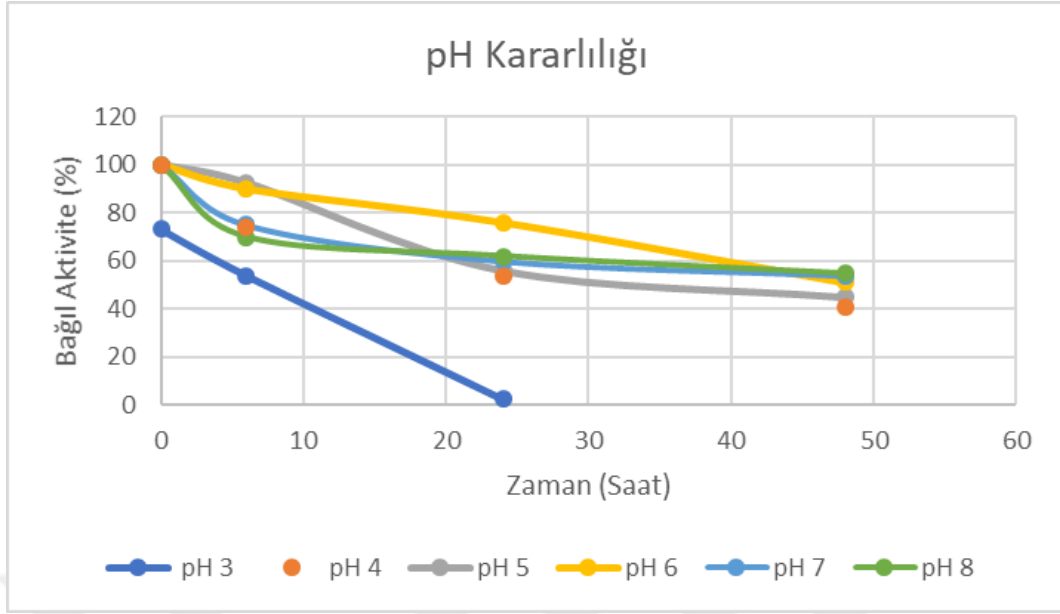
JauDyp'nin 30 °C'de ve 40 °C'de 48 saatin sonunda, 50 ve 60 °C'de 2 gün, 50 °C'de 3 gün, 40 °C'de ise 24 saatin sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği gözlemlendi (Şekil 52).



Şekil 52. JauDyp' nin termal kararlılığı

3.5.2.11. JauDyp'nin pH Kararlılığı

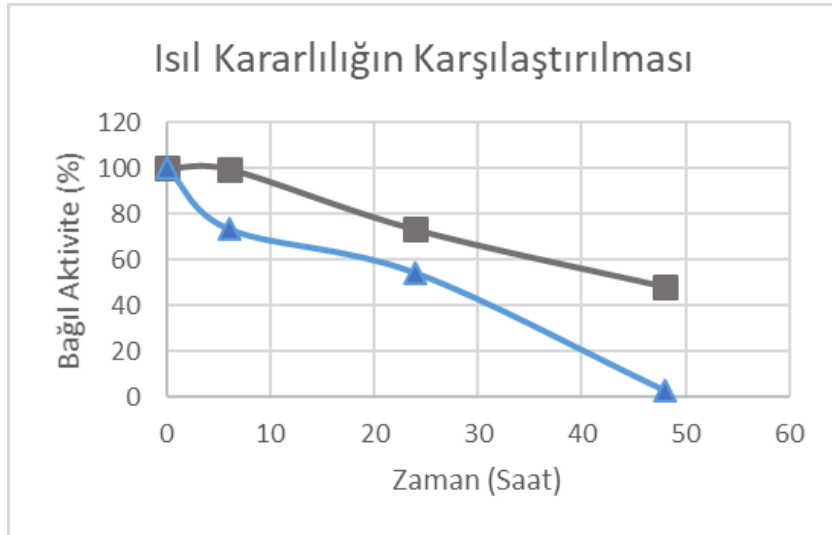
JauDyp, optimum pH'sında, 24 saatin sonunda tüm aktivitesini kaybettiği gözlemlendi. Bununla birlikte, pH 4.0-8.0 aralığında ise, 48 saatin sonunda aktivitesini yaklaşık olarak %50 kaybettiği gözlemlendi (Şekil 53).



Şekil 53. JauDyp'nin pH kararlılığı

3.5.2.12. Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin Kararlılıklarının Karşılaştırılması

JauDyp, 24 saatte %50, enkapsülinlenen JauDyp ise %30 oranında aktivite kaybettiği gözlemlendi. 48 saatte ise JauDyp aktivitesini tamamen kaybederken, enkapsülinlenen JauDyp'nin aktivitesi %50 oranında azaldığı gözlemlendi (Şekil 54).

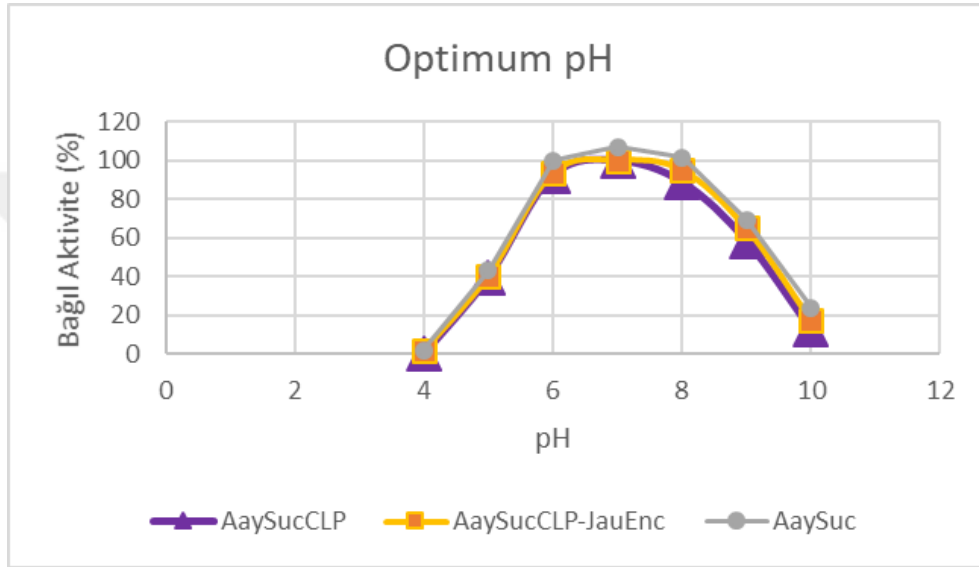


Şekil 54. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin kararlılıklarının karşılaştırılması

3.5.3. AaySuc, JauEnc ile Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin Karakterizasyonları

3.5.3.1. Optimum pH

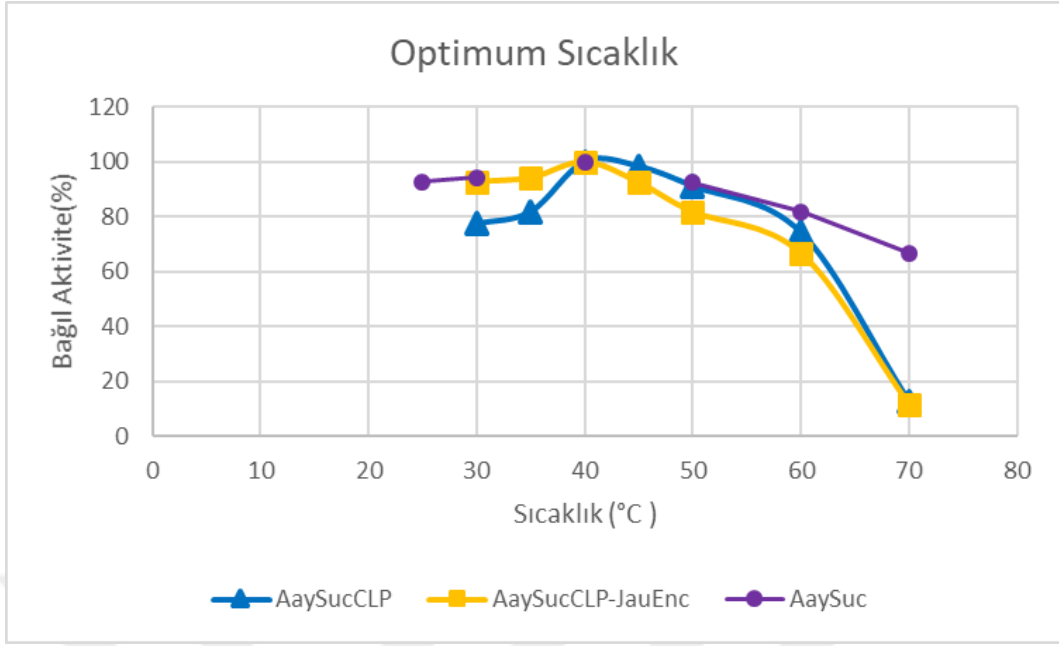
AaySuc'ın, enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin optimum pH'sı 7.0 olarak belirlendi (Şekil 55).



Şekil 55. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP ve AaySuc'ın optimum pH'sı

3.5.3.2. Optimum Sıcaklık

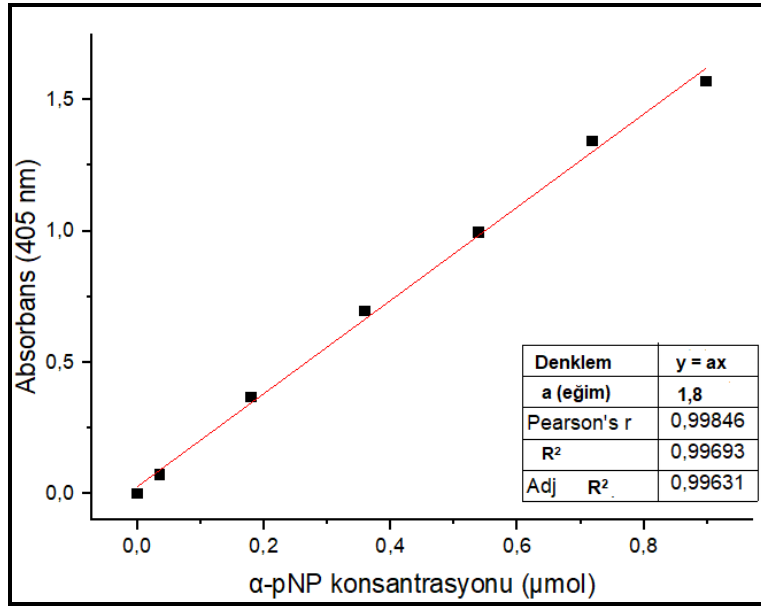
Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP ve AaySuc'ın optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi (Şekil 56).



Şekil 56. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin ve AaySuc'ın optimum sıcaklığı

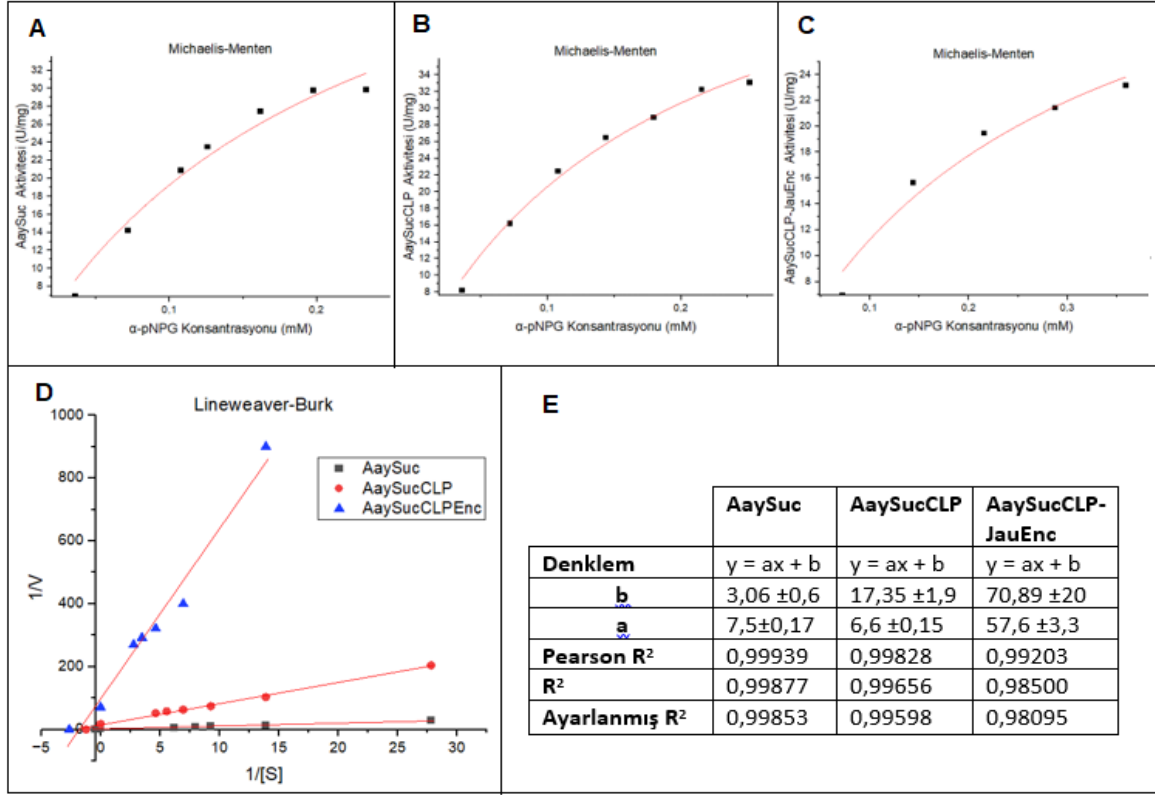
3.5.3.3. Kinetik Parametreler

Şekil 57'de elde edilen grafiğinden yararlanılarak, α -pNPG substratının 405 nm'deki sönme katsayısı, $18,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak hesaplandı.



Şekil 57. α -pNPG sönme katsayısının elde edildiği doğrusal grafik

Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP ve AaySuc'ın, α -pNPG substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 58' de, kinetik parametreleri ise Tablo 8'de verildi.



Şekil 58. . AaySuc, AaySucCLP ve AaySucCLP-JauEnc'in α -pNPG'ye karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri (A. AaySuc, B. AaySucCLP, C. AaySucCLP-JauEnc'in Michaelis-Menten grafikleri, D. AaySuc, Enkapsülinli ve enkapsülinli AaySucCLP'nin Lineweaver-Burk Grafiği, E. Lineawer-Burk verileri)

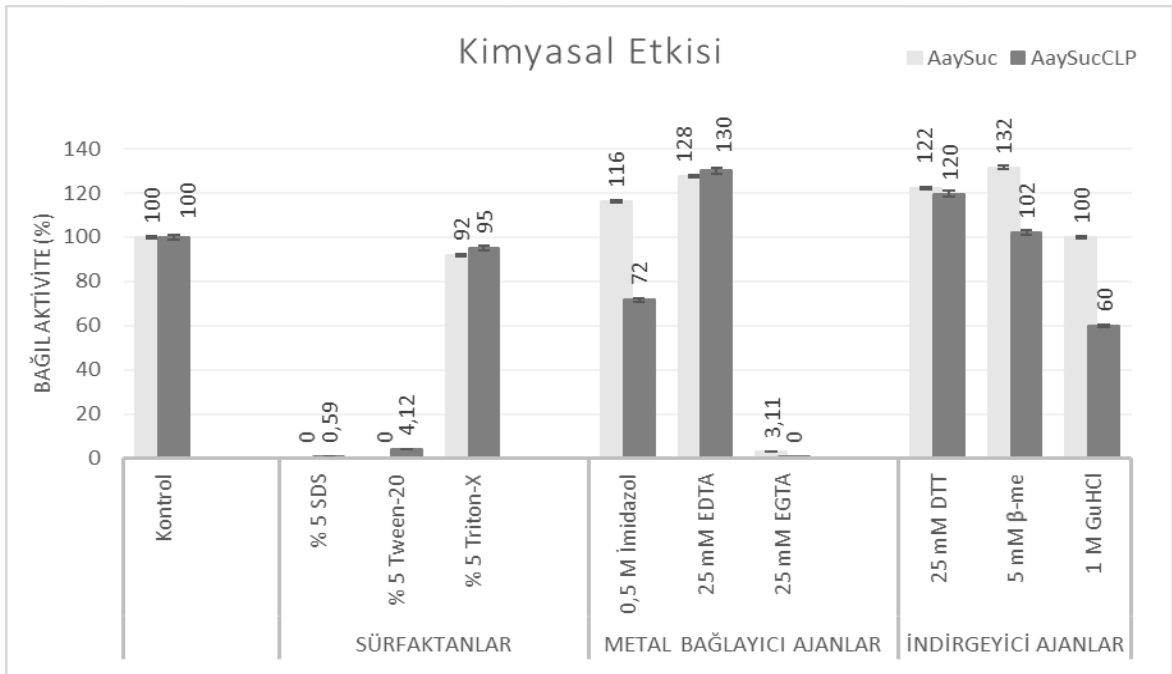
Tablo 8. AaySuc, enkapsülinli ve enkapsülinli AaySucCLP'nin kinetik verileri

	K_m (mM)	V_{max} (mg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)
AaySuc	2,4	479	524
AaySucCLP	0,38	96	105
AaySucCLP-JauEnc	0,81	88	101

3.5.3.4. Sürfactanların, İndirgeyici ve Şelatlayıcı Ajanların AaySuc ve AaySucCLP Aktivitesine Etkisi

%5'lik sürfactanlarla yapılan AaySuc ve AaySucCLP reaksiyonlarında, %5 Triton X-100 inhibisyon etki oluştururken, SDS ve Tween-20 de herhangi bir aktivite gözlenmedi.

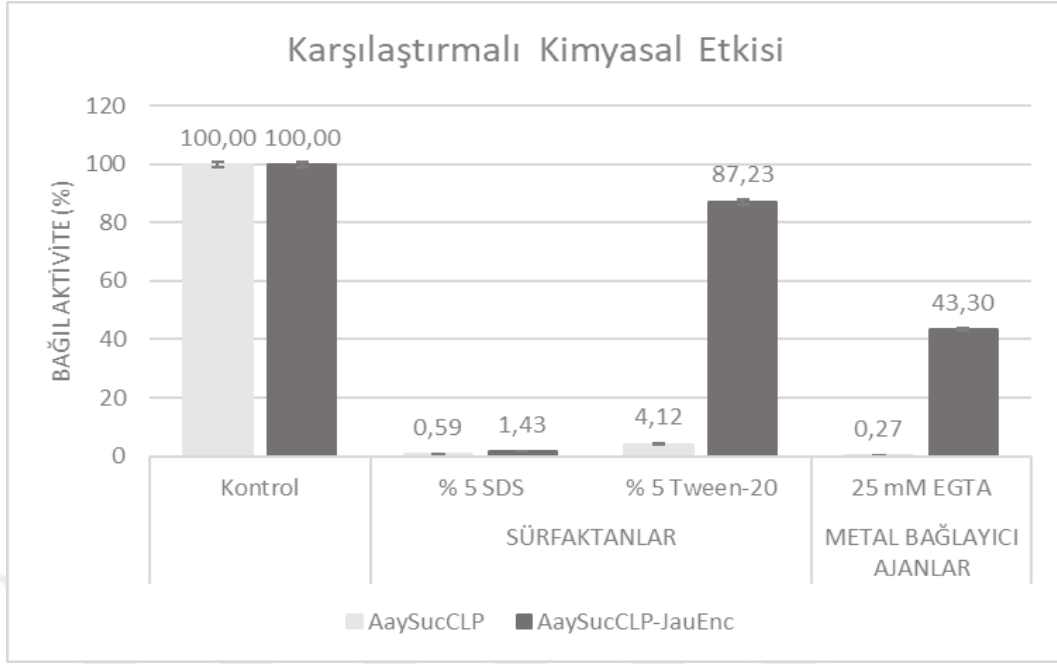
25 mM metal şelatlayıcı EDTA ve EGTA ile yapılan reaksiyonlar sonucunda, AaySuc ve AaySucCLP aktivitesinde EDTA için %30 artış gözlenirken, EGTA'da aktivite gözlenmedi. 0,5 M imidazol ise, AaySuc'da %16 aktivatör etki oluştururken, AaySucCLP'nin aktivitesini %30 oranında düşürdüğü tespit edildi (Şekil 59).



Şekil 59. Sürfactanların, şelatlayıcı ve indirgeyici ajanların AaySuc ve AaySucCLP aktiviteleri üzerindeki etkileri

3.5.3.5. Sürfactanların, İndirgeyici ve Şelatlayıcı Ajanların AaySucCLP ve Enkapsülenen AaySucCLP Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

25 mM EGTA, %5 Tween-20 ve %5 SDS, Enkapsülenen AaySucCLP'ye, enkapsülenlenmeyen AaySucCLP'ye kıyasla, sırası ile %40, %83 ve %1 oranlarda daha az etki ettiği gözlemlendi (Şekil 60).



Şekil 60. Enkapsülünlen ve enkapsülünlenmeyen AaySucCLP üzerinde sürfaktanların, indirgeyici ve şelatlayıcı ajanların etkilerinin karşılaştırılması

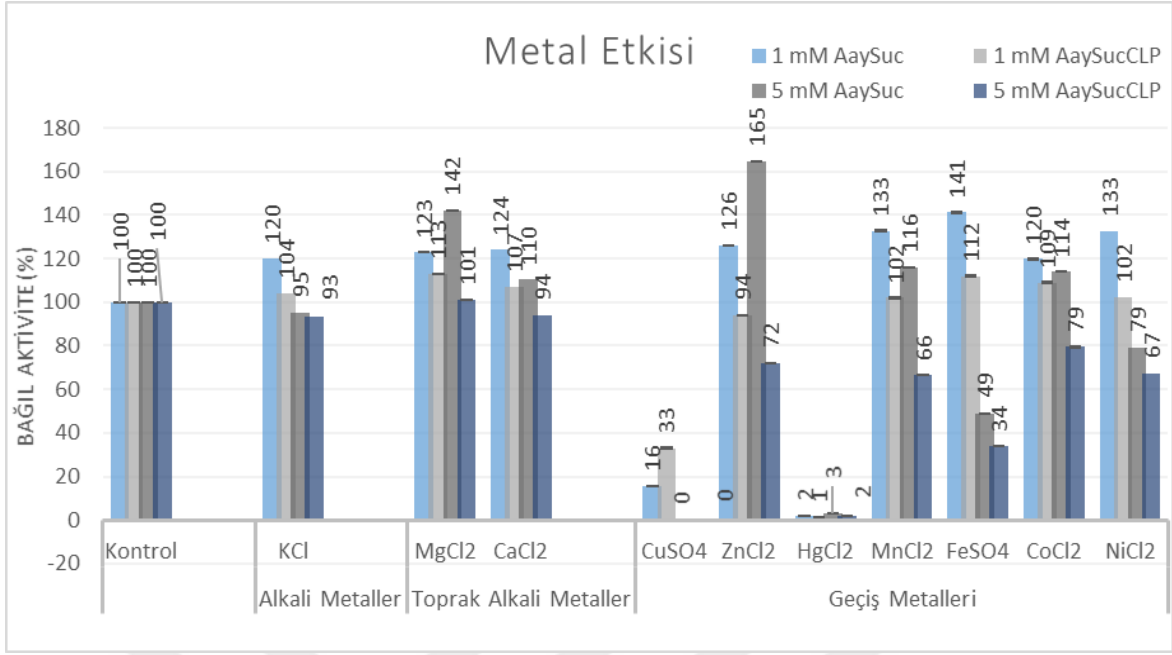
3.5.3.6. Metal iyonların AaySuc ve AaySucCLP Aktivitesine Etkisi

1 mM metal konsantrasyonlarında yürütülen AaySuc aktivite reaksiyonlarının sonucunda, %85'lik Cu^{+2} ve %99'luk Hg^{+2} inhibisyonu dışında, %20'nin üzerinde aktivite artışı gözlemlendi (Şekil 61).

5 mM metal konsantrasyonlarında yürütülen AaySuc aktivite reaksiyonlarının sonucunda, Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} metalleriyle, %10'un üzerinde aktivite artışı; K^{+} , Ni^{+2} , Fe^{+2} ve Hg^{+2} metalleriyle, sırasıyla, %5, %30, %50 ve %98 oranında inhibisyon gözlemlendi (Şekil 61).

1 mM metal konsantrasyonlarında yürütülen AaySucCLP aktivite reaksiyonlarının sonucunda, AaySucCLP aktivitesinde, Fe^{+2} ile %9, Co^{+2} ile %6 aktivite artışı gözlenirken, Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} ve Ni^{+2} metallerinde %10'a varan inhibisyonlar gözlemlendi. Cu^{+2} ve Hg^{+2} metalleriyle yürütülen reaksiyonlarda herhangi bir aktivite gözlenmezken, K^{+} 'da ise aktivitede değişim olmadığı gözlemlendi (Şekil 61).

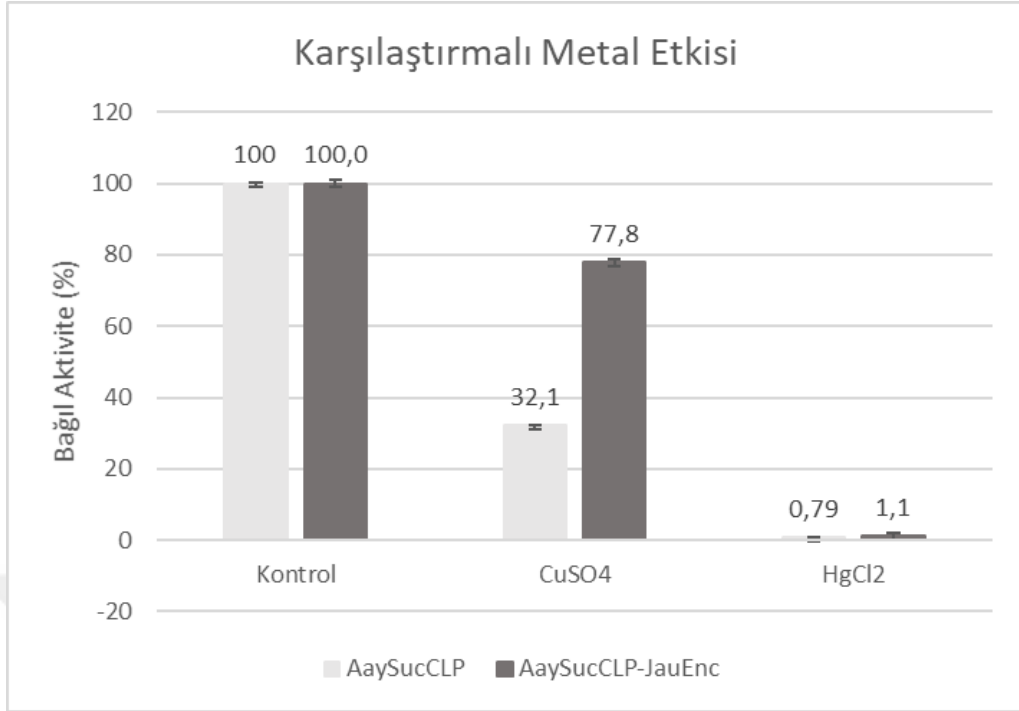
5 mM metal konsantrasyonlarında yürütülen AaySucCLP aktivite reaksiyonlarının sonucunda, tüm geçiş metallerinde %30 üzerinde inhibisyon, alkali ve toprak alkali metallerde ise %5'den az inhibisyon gözlemlendi (Şekil 61).



Şekil 61. Metallerin AaySuc ve AaySucCLP'nin aktiviteleri üzerindeki etkisi

3.5.3.7. Metallerin Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen AaySucCLP Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

CuSO₄, JauEnc içinde bulunan AaySucCLP reaksiyonunda, enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'ye nazaran, %45 daha az inhibisyon gözlenmişken, HgCl₂'de, her iki durumda da, AaySucCLP aktivitesinin hemen hemen tamamen inhibe olduğu gözlemlendi (Şekil 62).

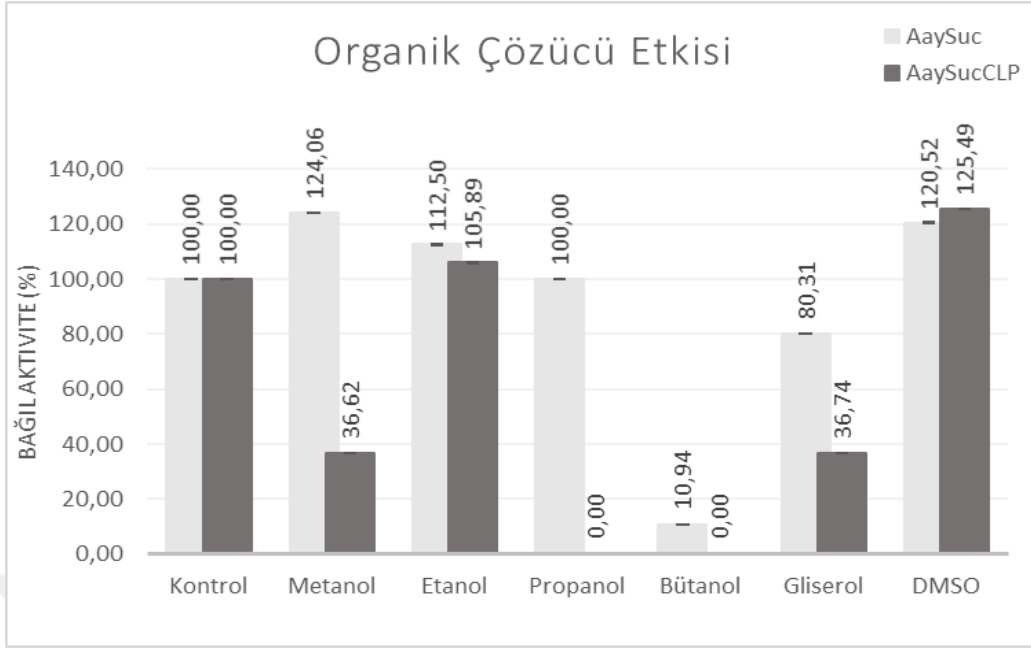


Şekil 62. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin karşılaştırmalı metal etkisi

3.5.3.8. Organik Çözücülerin AaySuc ve AaySucCLP Aktivitelerine Etkisi

%5'lik metanol, etanol, propanol, gliserol ve DMSO ile yürütülen AaySuc reaksiyonlarında, metanol, etanol ve DMSO örneklerinde sırasıyla, %25, %12 ve %20 artış, gliserolde %20, bütanolde %90 inhibisyon gözlemlendi. Propanol içeren örneğin AaySuc aktivitesinde ise herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi (Şekil 63).

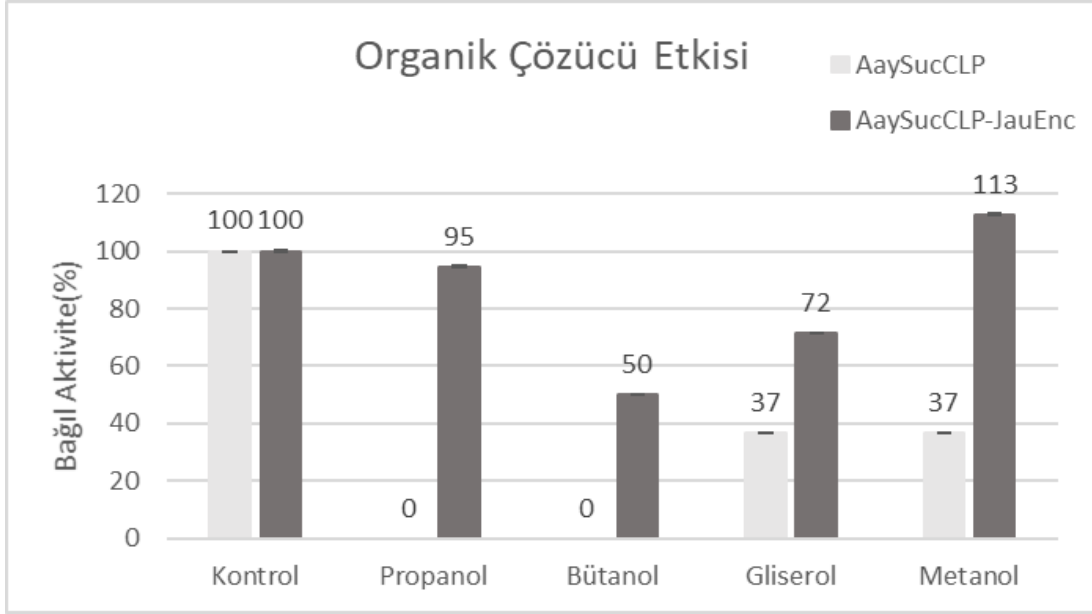
%5'lik metanol, etanol, propanol, gliserol ve DMSO ile yürütülen AaySucCLP reaksiyonlarında, DMSO'da %25 ve etanolde %5 artış, metanol ve gliserolde %75 inhibisyon gözlemlendi. Propanol ve bütanol içeren örneklerde ise herhangi bir aktivite gözlemlenmedi (Şekil 63).



Şekil 63. %5 oranındaki organik çözücülerin AaySuc ve AaySucCLP aktiviteleri üzerindeki etkileri

3.5.3.9. Organik Çözücülerin Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen AaySucCLP Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

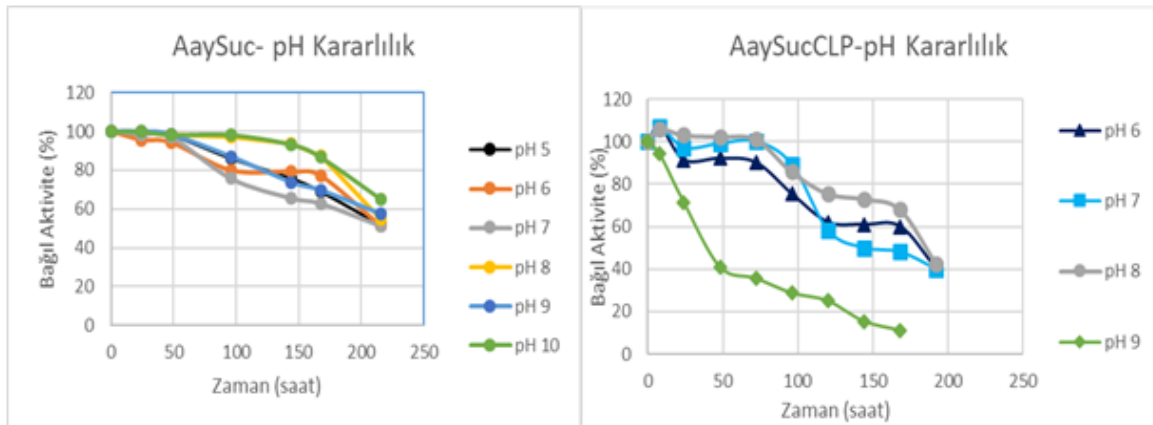
Propanol ve bütanol AaySucCLP'nin aktivitesini tamamen düşürürken, enkapsülinlenen AaySucCLP aktivitesinde propanol için %6'lık bir düşüş, bütanol için ise %28 oranında artış gözlemlendi. Bununla birlikte, gliserol ve metanol için, aktivite kaybının, AaySucCLP-Enkapsülinde, sırası ile %35 ve %76 daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 64).



Şekil 64. Enkapsülenilen ve enkapsülenlenmeyen AaySucCLP'nin karşılaştırmalı organik çözücü etkisi

3.5.3.10. AaySuc ve AaySucCLP'nin pH Kararlılığı

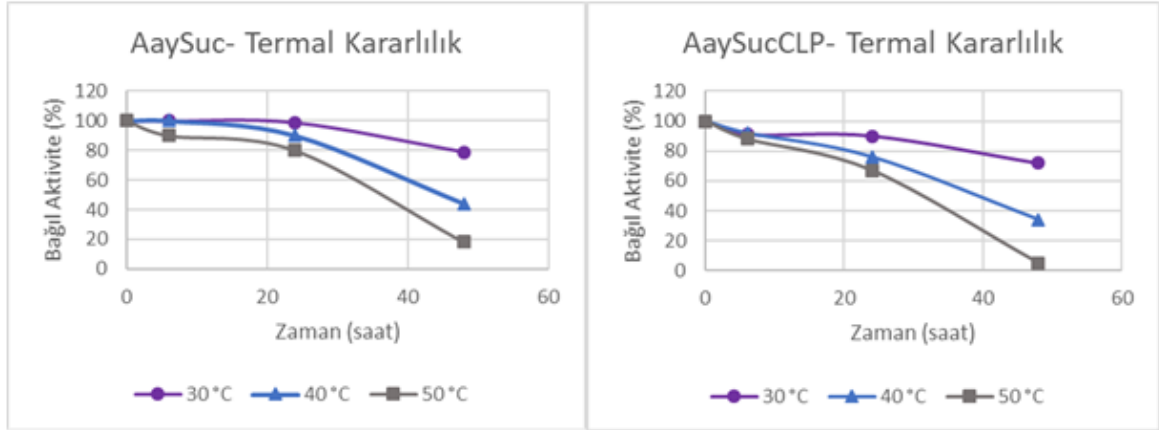
AaySuc'un, oda sıcaklığında, 9 günde, tüm pH'larda, %60; AaySucCLP'nin ise pH 6,0-8,0'de, 8. günün sonunda aktivitesinin %40'ını koruduğu gözlemlendi (Şekil 65).



Şekil 65. AaySuc ve AaySucCLP'nin pH kararlılığı

3.5.3.11. AaySuc ve AaySucCLP'nin Termal Kararlılığı

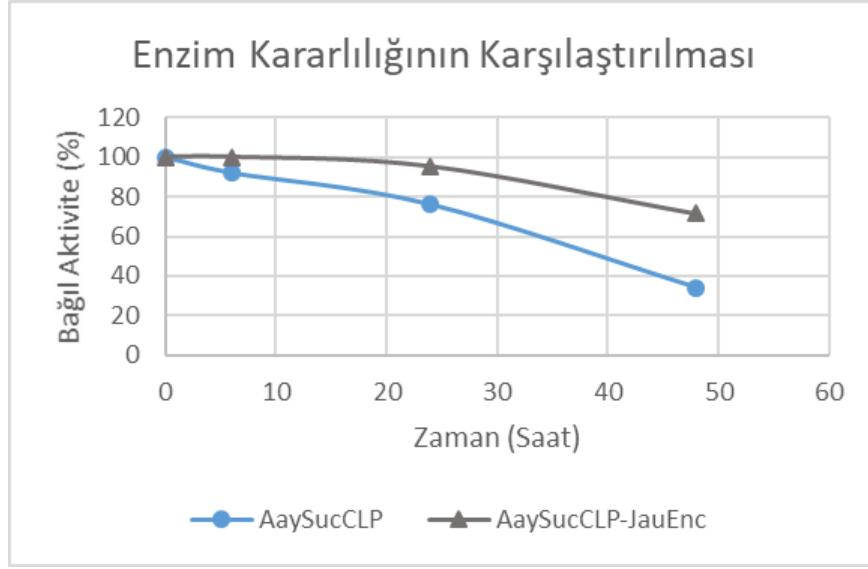
pH 7 ortamında yürütülen kararlılık testlerine göre, AaySuc, aktivitesini 48 saat sonunda, 30 °C' de %20, 40 °C'de %55 ve 50 °C'de %80 kaybetmişken, AaySucCLP ise 30 °C'de %30, 40 °C'de %75 ve 50 °C'de %95 kaybettiği gözlemlendi (Şekil 66).



Şekil 66. AaySuc ve AaySucCLP'nin Termal Kararlılığı

3.5.3.12. Enkapsülinlenen ve Enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin Kararlılıklarının Karşılaştırılması

40 °C ve pH 7 ortam şartları altında yürütülen kararlılık testlerine göre, AaySucCLP'nin aktivitesi, 24 saat sonunda %25, 48 saat sonunda %65 azalmakta iken enkapsülinlenen AaySucCLP'nin aktivitesi ise 24 saat sonunda %5, 48 saat sonunda ise %30 azaldığı gözlemlendi (Şekil 67).



Şekil 67. Enkapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen AaySucCLP'nin kararlılıklarının karşılaştırılması

4. TARTIŞMA

Jiangella aurantiaca 8K307'nin içinde bulunduğu Actinomycetes sınıfı bakteriler, P (eski adıyla B) ve I (eski adıyla A) olmak üzere iki Dyp tipini içermektedirler (Ahmad vd., 2011; Dailey vd., 2011; Liu vd., 2011). Yapılan biyoinformatik analizlere göre, JauDyp'nin, DtpB, DypB, BtDyp gibi P tip Dyp'lere benzer olduğu tespit edildi. JauDyp'nin dizileme ve modelleme analizlerinin bir sonucu olarak, 331 amino asit uzunluğuna sahip ~37 kDa native JauDyp, ekstra domain içermemektedir. Öte yandan, JauDyp, N-terminalinde herhangi bir sinyal peptide sahip değildir. Tüm bu özellikler, JauDyp'nin P tip Dyp olduğunu desteklemektedir (Yoshida ve Sugano, 2015). Dahası, JauDyp, P sınıfında bulunan bazı Dyp'lerde görüldüğü gibi (DypB, BIDyp), C-terminalinde kargo yükleme peptidi içermektedir (Sutter 2008, vd., Rahmanpour vd., 2013).

Dyp'ler, katalitik aktivite, "hem" kofaktörü içirme, substrat seçiciliği gibi pek çok açıdan klasik peroksidazlara (LiP, VP, MnP) benzerlik göstermesine rağmen, üçüncül yapıları klasik peroksidazlarınki gibi zengin α -heliks içermemektedir. Bunun yerine, klorit dismutazlarla ortak olarak, dimerik α/β barrel yapı içerirler (Van Bloois vd., 2010; Yoshida ve Sugano, 2015). Ayrıca, aktif bölgedeki korunmuş kalıntılar klasik peroksidazlara benzememekte, bunun yerine Dyp'lere özgü GXXDG motifi içermektedir. Klasik peroksidazların en önemli özelliklerinden biri olan distal histidin rezidüsü yerine, Dyp'lerde distal aspartik asit bulunmaktadır (Sugano, 2007). Yürütülen tez çalışmasında yapılan dizi ve modelleme analizleri, literatürdeki verilerle uyumlu olarak, JauDyp'nin üçüncül yapısının 2 α -heliks ve 2 β -tabakalı ferredoksin katlanmaya, distalde korunmuş GFVDG motifine ve distal aspartik asite sahip olduğunu desteklemektedir (Silva vd., 2023).

Klasik peroksidazların, nötrale yakın asidik pH'da aktif olmaları katalitik bölgede bulunan distal histidinin yan zinciri imidazolün pKa'sının 6 olmasından kaynaklanmaktadır (Sugano 2007). Dyp'lerde ise, distal histidin pozisyonunda aspartik asit bulunmaktadır. Aspartik asitin yan zinciri, 3,5 pKa değerine sahip asetik asittir. TfuDyp'nin, RB19 ve H₂O₂'ye karşı optimum pH'sı 3,5; IrlacDyp'nin ABTS, RB5 ve RB19'a karşı optimum pH'sı 3 ve Ajp I ve Ajp II'nin fenolik olmayan lignin bileşiği veratril alkole (VA) karşı optimum pH'sı 1,4 olarak belirlidiler (van Bloois vd., 2010;

Liers vd., 2010; de Eugenio vd., 2021). Literatürle uyumlu olarak, JauDyp'nin de optimum pH'sı 3 ve aktivite gösterdiği pH aralığı 3-5 olarak tespit edildi (van Bloois vd., 2010; Krahe vd., 2020).

JauDyp'nin, diğer mezofilik bakteri kaynaklı Dyp'ler gibi optimum aktivitesi, 25-30 °C'dir (Santos vd., 2014; Mink vd., 2015; Wasak vd., 2018). JauDyp, çöl biyomunda yaşayan *Jiangella aurantiaca* 8K307 bakterisinden elde edildi. Yapılan ısıl kararlılık testleri, JauDyp'nin, diğer mezofilik bakterilere kıyasla, ısıya karşı biraz daha kararlı olduğunu göstermektedir. Mezofilik Dyp'ler, genellikle, aktivitelerini 50 °C' de kaybederken, bu çalışmada, JauDyp'nin, 50 °C'de %40 aktivitesini koruduğu belirlendi (Santos vd., 2014; Dhankhar vd., 2020).

Literatürlerde mantar kaynaklı Dyp'lerin çok yüksek katalitik etkinliğe sahip olduğu, bakteriyel Dyp'lerin katalitik etkinliklerinin ise onlara kıyasla oldukça düşük oldukları belirtilmektedir. Mantarları içine alan tip V Dyp'lerde katalitik etkinlik 10^4 - 10^7 iken, birbirine yakın aktiviteye sahip I ve P tipi Dyp'lerde, sırasıyla, $10^3 - 10^6$ ve $10^2 - 10^5$ olarak gözlenmektedir (Yoshida ve Sugano, 2021). Tablo 9'da özetlenen literatür verileri, bu bilgileri desteklemektedir. Bu çalışmada, JauDyp'nin katalitik etkinliğinin belirlenmesi için ABTS substratı kullanıldı. JauDyp, ABTS'yi okside ederek, bir elektronu oksitlenmiş $ABTS^{\bullet+}$ molekülünü oluşturmaktadır. Bu çalışmada, sönme katsayısı (ϵ), ABTS substratı kullanılarak hesaplandığı için, JauDyp'nin 1 ünitesi, 1 mg JauDyp'nin bir dk.da oksitlediği ABTS moleküllerinin μ mol cinsinden miktarını ifade etmektedir. JauDyp'nin K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri, sırasıyla, 0,125 mM, 122 U_{mg}^{-1} , 79,77 $1/s$ ve 638,385 $M^{-1}s^{-1}$ olarak hesaplandı. Bu veriler, JauDyp'nin, mantar kaynaklı enzimlerle benzer yüksek katalitik etkinliğe (10^6) sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 9. Literatürde bulunan Dyp'lerin ABTS'ye karşı kinetik verileri

Ad	Sınıf	pH	K_m (mM)	V_{max} (Umg^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	ϵ ($M^{-1}s^{-1}$)	Referans
JauDyp	P	3	0,125	122	79,7	638,385	98,8 (420 nm)	Mevcut Çalışma
JauDypEnc	P	3	0,173	171	111,35	641,685		
DypB	P	4,5	23	-	55	2,400	36,600 (414 nm)	Roberts vd., 2011
DypA	I	4,5	8,2	-	16,83	2,000		
ScDypB	P	3,5	0,08	-	48,6	607,000	36,000 (420 nm)	Pupart vd., 2023
ScDyp1A	I	3,5	1,4	-	7,6	5,400		
ScDyp2A	I	3,5	2,3	-	31,7	13,800		
PflDypB	P	5,5	1,65 $\pm$ 0,07	-	49 $\pm$ 1	29,000	36,000 (420 nm)	Ehibhati on vd., 2023
PpDyp	P		0,3	-	28	55,000	36,000 (420 nm)	Borges vd., 2022
BsDyp	P		0,166	15	-	70,000		Santos vd., 2014
ElDyp	P	3,5	5	5560	-	-	36,000 (420 nm)	Shrestha vd., 2017
DypA	I	4	4,1	-	89,9	21,900	36,600 (414 nm)	Rai vd., 2021
AspDyp2	V	3,5	0,165	-	30	180,000	29,300 (436 nm)	Linde vd., 2021
TcuDyp	I	3,5	0,309	-	53	170,000	36,000 (420 nm)	
AauDyp2	V		0,123	-	255	1800,000	36,000 (420 nm)	
IlaDyp	V	3,5	0,67	-	790,00 $\pm$ 56,06	11700,000	36,000 (420 nm)	Li vd., 2021
PsaDyp	V	3,8	0,099	-	375	3800,000	36,000 (420 nm)	Lauber vd., 2017

Tween-20 ve Triton X-100, proteinleri denatüre etmeyen yumuşak sürfaktanlardır. Bu yumuşak yapılı sürfaktanlar, hidrofobik kuyrukları ile proteinlerin hidrofobik

yüzeylerine bağlanarak proteinlerin çözünmesini sağlarlar, protein-protein etkileşimlerini zayıflatırlar ve spesifik olmayan bağlanmaları ve agregasyonu engellerler. Diğer yandan, ABTS ya da antrokinon boya gibi büyük substratlar, Dyp'nin katalitik bölgesine ulaşamazlar. Bunun yerine LRET (Uzun menzilli elektron transfer) yolakları ile, Dyp'nin yüzeyinde bulunan aromatik amino asitlerdeki radikal bölgelerde okside edilirler (Strittmatter vd., 2013). ABTS substratı ile yürütülen reaksiyonlarda, %5 Tween-20 ve %5 Triton X-100'e maruz bırakılan JauDyp aktivitesinde, sırasıyla %70 ve %85 oranında azalma görüldü. Bu sonuca göre, Tween-20 ve Triton X-100'in JauDyp yüzeyindeki triptofan rezidüleriyle etkileşime girerek, ABTS bağlanmasını engellemiş olabileceği ve JauDyp'nin LRET etkinliğinin ortam koşullarına bağımlı olabileceğini göstermektedir. Yapılan testlerde, Triton-X'e oranla daha hidrofobik olan Tween-20'nin, JauDyp inhibisyonunda daha etkili oluşu bu durumu desteklemektedir. Diğer yandan, Sigma Aldrich ve G-Bioscience markaları, Triton X-100 ve Tween-20 ürün detaylarında, üretim ve depolamaya bağlı olarak, bu bileşiklerin, düşük oranlarda karbonil bileşik ve peroksit içerebileceğini belirtmektedirler. Ayrıca, ısı, ışık ve metal iyonlarına maruziyet ve seyreltik solüsyonlarda depolamanın, bu bileşiklerde karbonil ve peroksit miktarını artırdığı belirtilmektedir. Lam ve arkadaşlarının 2011'de yaptıkları bir çalışmada, Tween 20'nin katalitik bölgede önemli role sahip triptofan kalıntısını okside ederek, enzimi inhibe ettiği bildirilmektedir. Triptofan, tirozin, histidin, sistein ve metiyonin oksidasyona hassasiyeti olan amino asitlerdir (Watson vd., 2014). Diğer yandan, JauDyp'nin ABTS ile reaksiyonu için Tyr/Trp kalıntıları önemli bir role sahiptir. Ayrıca, aktif bölgede ferrik demiri tutan histidin rezidüsü bulunmaktadır (Silva vd., 2023). Bu veriler, Tween-20 ve Triton X-100 kontaminasyonlarının inhibisyonda etkili olabileceğini göstermektedir. SDS, protein denatürasyonunda etkili bir sürfaktandır. Yapılan testler, %5 SDS'in JauDyp aktivitesini neredeyse tamamen baskıladığını göstermektedir. Literatürde bulunan bir çalışmada, Dyp'nin (ANAPX) dimerik yapısının enzimatik aktivite için çok önemli olduğu ortaya konmuştur. Buna göre, ANAPX'in tetramer yapısı incelendi ve ANAPX'in tertamer yapısının, H₂O₂ giriş yolunun formasyonunda etkili olduğu belirtildi. Dimerizasyonun ikişer altbirimin birbirleriyle asimetrik Cys224-Cys224 disülfid bağı ile bir araya gelerek oluştuğu ve bu dimerik yapının kararlılığının, Cys224'in alanine mutasyonu sonucunda zayıfladığı ifade edildi (Yoshida vd., 2016). ANAPX ile tutarlı olarak, yapılan modelleme analizleri, JauDyp'nin her iki altbiriminin asimetrik olarak birleştiği ve üç dimerik yapının bir araya gelerek hekzamerik JauDyp'yi oluşturduğunu desteklemektedir. Bu bulgular,

disülfid köprülerini kıran DTT ve beta-merkaptoetanolün JauDyp aktivitesindeki, sırasıyla %80 ve %20'lik azalmayı destekler niteliktedir. JauDyp'nin bir monomeri iki sistein içermektedir. ANAPX ile uyumlu olarak, monomerler arası disülfid bağı oluşumuna karşılık, 5 mM beta-merkaptoetanol JauDyp'nin aktivitesini %20 oranında düşürdü. DTT ise yüksek konsantrasyonuyla ve daha yüksek indirgeyici kuvvete sahip olması itibarıyla %80'lik bir aktivite kaybına yol açtığı gözlemlendi. Enzim aktivitesi için önemli görülen polimer yapının, disülfid köprüsü dışında, hidrojen bağlarıyla desteklenmiş olması ve sistein kalıntılarının enzimin dış yüzeyinden uzakta olması, JauDyp'nin disülfid köprülerini indirgeyici ajanlara karşı hassasiyetin yüksek olmayışının sebepleri olarak düşünülmektedir (Yoshida vd., 2016). GuHCl'nin %6'lık aktivatör etkisi, asidik pH'da aktif olan JauDyp'nin reaksiyon ortamında asiditeyi artırmasıyla ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmada, EDTA, JauDyp'nin aktivitesini önemli ölçüde düşürdü ve EGTA neredeyse tamamen inhibisyona sebep oldu. Bu durum, JauDyp'nin aktif bölgesindeki hem merkezinde yer alan aktivite için zorunlu ferrik demirin EGTA ve EDTA ile kompleks oluşturmasından kaynaklanmaktadır. 1963'de yapılan bir çalışmada EGTA'nın EDTA'ya oranla ferrik demir ile daha kararlı bir kompleks oluşturduğu beyan edilmektedir (Schroder vd., 1963). Bu durum, elde ettiğimiz bulgularla uyumlu görünmektedir. JauDyp'nin His-Tag ile saflaştırılmasının ardından yürütülen ABTS substratına karşı reaksiyonda enzim aktivitesi gözlenmedi. Aktivite kaybının sebebi, saflaştırma sırasında kullanılan 0,5 M imidazoldür. Metal bağlama özelliğine sahip olan imidazol, JauDyp'nin aktif bölgedeki ferrik demire bağlanarak **hem** kofaktörünün apoproteinden ayrılmasına neden olmaktadır. Ancak, **hem** grubunun enzimden ayrılması, geri dönüşümlüdür. His-Tag ile saflaştırma işleminin ardından diyaliz ile imidazolün uzaklaştırılmasıyla aktivite geri kazanıldı. Ayrıca, SDS PAGE analizlerinde His-Tag saflaştırma prosedürlerinin ardından görülen yoğun çift band, hem kaybının protein katlanmasında bozulmaya sebep olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın, Ehibhathiomhan ve arkadaşları (2023), SDS-PAGE'de elde ettiği çift bandı, periplazmada rastlanan TAT içeren ve içermeyen Dyp olarak yorumlandı.

JauDyp üzerine alkol çözücülerin toksisitesi, gliserol>bütanol>propanol>metanol şeklinde gözlemlendi. Genel olarak, alkollerin enzimler üzerindeki toksisitesi, apolarlık arttıkça artmaktadır. Etanolün en iyi çözücü olması ile ilişkili olarak, JauDyp aktivitesinde %7'lik bir artış gözlemlendi. Daha önce, çözücülerin apolarlık seviyesinin arttıkça enzimin aktif bölgedeki hidrofobik bölgelerin bozulduğu, bununlar beraber, etil asetat gibi polaritesi

yüksek çözücülerde enzim substrat ilişkisinin güçlenerek aktivitenin indüklendiği bildirilmektedir (Serdakowski ve Dordick, 2008).

Wuorimaa ve arkadaşları (2006), geçiş metallerinin H_2O_2 'nin bozunmasına neden olduğunu ve bu sebeple, H_2O_2 'nin, kağıt hamuru ağartma uygulamalarında EDTA ile birlikte kullanıldığı bildirildi (Hart 2000). Bu durum, 1 mM metal iyonu ile yapılan JauDyp reaksiyonlarındaki aktivite kaybının, zorunlu kofaktör olan H_2O_2 'nin bozunmasının bir sonucu olabileceğine işaret etmektedir. Buna karşın, literatürde, geçiş metallerinin Dyp aktivitesini artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Liv d., 2012; Bouacem vd., 2018). Daha önceki çalışmamızda, metallerin T1Dyp üzerine milimolar konsantrasyonlarda inhibe edici etki gösterirken, mikromolar miktarda aktivasyon etkisi gözlemlendi belirtildi (Sahinkaya vd. 2019). Bu durum, JauDyp için, metallerin daha düşük konsantrasyonlarında aktivatör etki gösterebileceğini desteklemektedir. Literatürde, Fe^{+2} 'nin Dyp (ANAPX ve PpNX1Dyp) için kuvvetli inhibitör olduğu bildirilmesine rağmen, JauDyp aktivitesinde yalnızca %2 azalma gözlemlendi (Ogola 2009; Xu vd., 2021). Fe^{+2} 'nin oksitlendiğinde ferrik iyonu oluşturduğu bilinmektedir (Kremer vd., 2023). Bu durum, bu çalışmada, H_2O_2 'nin varlığında Fe^{+2} 'nin oksitlenerek ferrik iyon oluşturduğunu ve böylece, ortamda olası ferrik iyonu eksik olan apoprotein haldeki JauDyp enzimlerinin ferrik iyon ihtiyacını karşılamış olabileceğini düşündürmektedir.

Anoxybacillus ayderensis A9 genomundan (GCA_000833605.1) yararlanılarak klonlanan oligo-1,6- α -glukosidazın sekans analizi sonucu elde edilen 538 amino asitlik dizi Expasy-Protparam'da 64000,62 Da olarak belirlendi. Yapılan SDS PAGE analizi, bu veriyi destekledi. Elde edilen amino asit dizisi ile yapılan biyoinformatik analizler, oligo-1,6- α -glukosidazın glikozil hidrolaz (GH) 13-31 ailesine ait olduğunu göstermektedir. Sukroz ve maltoz ile yapılan zimogram analizleri de, indirgeyici maltoz ve indirgeyici olmayan sukrozu hidroliz kabiliyetini desteklemektedir. Interpro ve Swiss-Model analizleri, AaySuc'ın, GH13 ailesine özgü, α/β barrel katlanma gösteren oligo 1,6 glukosidaz domaine ve yine GH13 ailesine özgü korunmuş C-terminal domainine sahip olduğunu desteklemektedir. Yapılan hizalama analizlerinde, AaySuc'a ait, yine GH13 ailesine özgü olan, hidrolizde görevli glutamik asit (E294) ve iki aspartik asit (D194 ve D310) rezidüsü, ayrıca substrat bağlanmasında görevli olan H108, Y63 ve R192 kalıntıları belirlendi.

Literatürde, GH13-31 tip oligo-1,6- α -glukosidazla yapılan çalışmalar genel olarak ökaryotlar üzerinedir. Eksikliğinde, glukoz intoleransına sebep olduğu için, çalışmalar

genellikle insan oligo-1,6- α -gukosidazı üzerinedir. Bunun dışında, hiperglisemiye çözüm olarak oligo-1,6- α -gukosidaz inhibitörlerinin araştırıldığı çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Long vd., 2020). Literatürde mevcut olan E.C. 3.2.1.10 sınıfından oligo-1,6- α -glukosidazlara ait optimum pH, optimum sıcaklık ve α -pNPG substratına karşı kinetik parametreler Tablo 10'da verildi. Tablo 10'da göre, AaySuc, α -pNPG' ye karşı yüksek katalitik aktiviteye sahip glukosidazlar arasındadır. Ayrıca, yapılan maltoz ve sukroz zimogramları elde edilen oligo-1,6- α -gukosidazın çok fonksiyonlu olduğunu desteklemektedir. Literatürde, oligo-1,6- α -gukosidazın, sukroz, maltoz ve izomaltozun hidrolizi üzerindeki kinetik parametreleri karşılaştırıldığında, izomaltoz (0,45 mM K_m) ve maltoza (0,135 mM K_m) ilgisinin sukroza (10,2 mM K_m) oranla çok daha yüksek olduğu görülmektedir (Schönert vd., 1999). Bu durum, Sim ve arkadaşlarının (2020) bildirdiği şekilde, indirgeyici substratların tanıma bölgesinin aktif bölgenin yüzeyinde iken, indirgeyici olmayan substratların oldukça dar olan aktif bölge içine gömülü olması ile paralel görünmektedir. Bununla birlikte, substrata doymun ortamdaki hidroliz aktivitesi (V_{max}), sukrozda daha yüksekken (356 Umg^{-1}), maltoz (65 Umg^{-1}) ve izomaltozda (162 Umg^{-1}) daha düşük bulundu.

Tablo 10'da göre ökaryotik oligo-1,6- α -gukosidazlar genellikle asidik pH'da aktif iken, AaySuc verilerinin de desteklediği şekilde, bakteriyel kaynaklı olanların genellikle nötr pH'da çalıştığı gözlemlendi.

Tablo 10. Oligo-1,6- α -glukozidazın α -pNPG'ye karşı kinetik verileri

Kaynak	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	K_m (mM)	V_{max} (Umg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	Ref.
<i>Anoxybacillus ayderensis</i> A9 (AaySuc)	7	40	2,4	479	524	Bu çalışma
<i>Anoxybacillus ayderensis</i> A9 (AaySucCLP)	7	40	0,38	96	105	Bu çalışma
<i>Anoxybacillus ayderensis</i> A9 (AaySucCLP-JauEnc)	7	40	0,81	88	101	Bu çalışma
<i>Bacillus cereus</i>	7	35	0,8	-	483	Watanabe vd., 2001
<i>Arthrobacter globiformis</i>	-	-	1,76	-	697	Yamaguchi vd., 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D-346b	6,8	30	1,3	-	129	Frandsen vd., 2002
<i>Homo sapiens</i>	6,5	37	1,3	-	17	Sim vd., 2010

B. subtilis'e ait oligo-1,6- α -glukosidazın (malL) N-terminalinde, dört adet kalsiyum bağlanma bölgesi (D20, N22, D24, F26, D28) bulunmaktadır (Hobs vd., 2013). Clustal Omega ile yapılan hizalama sonucuna göre AaySuc'ın N-terminali (D20, N22, D24, Y26, D28), malL ile benzerlik göstermektedir. Yapılan deneyler sonucunda ise, EGTA'nın AaySuc'ın aktivitesini neredeyse tamamen kaybettirdiği gözlemlendi. Bu durum, kalsiyum bağlanma bölgesinin hidrolaz aktivitesinde çok önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. 25 mM EDTA ve 0,5 M imidazol, oligo-1,6- α -glukosidaz üzerinde, sırasıyla %30 ve %16 aktivatör etki sağlamıştır. Bu durum, metal bağlayıcı EDTA ve imidazol üzerinde koruyucu etki yaptığını göstermektedir. *Qipengyuania seohaensis* sp. SW-135'in oligo-1,6- α -glukosidazının tuza karşı da hassas olduğu bildirilmektedir. Tuza dirençli halofilik bakteri *Qipengyuania seohaensis* sp. SW-135'in oligo-1,6- α -glukosidazında dahi 1 M NaCl' nin %20 aktivite kaybına yol açtığı belirtilmektedir (Zhai vd., 2022). Ayrıca, oligo-1,6- α -glukosidazın aktif bölgesinde, substrat bağlanmasını sağlayan His, Tyr ve Trp gibi amino asitler oksidasyona duyarlıdır. EDTA'nın oksidasyona duyarlı Trp'ı oksidasyondan koruduğu bildirilmektedir (Lam vd., 2011).

Hidroliz reaksiyonlarının gerçekleşmesi için ortamda su moleküllerinin var olması elzemdir. Daha önce yapılan çalışmalarda apolar çözücülerin oligo-1,6- α -glukosidazları

inhibe ettiği bildirilmektedir (Zhai vd., 2022). Bu çalışmada yapılan organik çözücü testlerine bakıldığında, DMSO, metanol ve etanolün enzim üzerinde aktivatör etki oluşturduğu, zayıf polar özellikteki gliserol ve apolaritesi göreceli olarak daha yüksek olan bütanolün ise inhibitör etki oluşturduğu gözlendi. Bütanol enzim aktivitesini %90 oranında azalttı. Bu durum, çözeltinin polaritesinin enzim aktivitesi için çok önemli olduğuunu göstermektedir.

Metal iyonu ile yapılan testler sırasında, gerçekleştirilen Cu^{+2} 'nin AaySuc reaksiyonlarında AaySuc içermeyen gruplarda renk değişimi gözlendi. Bu durumda, verilerde gözlenen, %95' değeri enzim inhibisyonunu değil, Cu^{+2} 'in AaySuc'a yakın katalitik glikozit bağı hidrolizini ifade etmektedir. Bu sonuçla paralel olarak, literatürde bulunan glikozil hidrolaz benzeri Cu_2O inorganik nanopartikül çalışmaları bu veriyi doğrulamaktadır (Yu vd., 2023). Ni^+ ve Fe^{+2} iyonlarının da, Cu^{+2} 'inkine benzer bir sonuçla, α -pNPG'ye daha düşük ilgileri bulunduğu tespit edildi.

Biyoinformatik incelemelerle elde edilen veriler, *Jiangella aurantiaca* 8K307'ya ait enkapslinin (JauEnc) homolojik olarak *Rhodococcus* ve *Brevibacillus* cinsi enkapslinlere yüksek oranda benzerlik gösterdiğini, enkapsülin dizisinin ve özellikle N-terminalinde bulunan kargo protein bağlanma peptitinin bakteriler arasında yüksek oranda korunduğuunu göstermektedir. Biyolojik analizler, kargo proteini olarak peroksidaz (JauDyp) içeren JauEnc, Licolin M18 olarak da adlandırılan family 1 yesi olduğuunu desteklemektedir (Radford, 2015; Giessen ve Silver 2017). Bu analizlere ek olarak, yapılan DLS ve TEM analizleri de, JauEnc'in diğerlerinde olduğu gibi yaklaşık olarak 24 nm civarında, T1 tipi enkapsülin olduğuunu göstermektedir (Sutter vd., 2008 Rahmanpour vd., 2013). Klonlama alışmaları ve SDS PAGE analizleri ile JauEnc'in bir altbiriminin ~30 kDa olduğu doğrulandı. Ayrıca, 1800 kDa ağırlığında olan native enkapslinin %4'lk jelde yryemeyip kuyucukta kalan bandı, Native-PAGE'de tespit edildi. Literatürde, homolojik olarak *Jiangella aurantiaca* 8K307 kaynaklı enkapsline benzeyen T1 tipli *Rhodococcus jostii* RHA1'in enkapslinin "assemble" formunun da kuyucukta kaldığı gösterildi ve başka bir çalışmada, aynı cinse ait *Rhodococcus erythropolis* N771 enkapslinin, FFF-MALS ve jel filtrasyon analizleri ile "assemble" formun ~1800 kDa olduğu analiz edildi (Rahmanpour vd., 2013; Tamura vd., 2015).

JauEnc'in kapsül formunun stabilitesini belirlemek için JauEnc farklı fizyolojik ortamlara tabi tutuldu, Literatürde enkapslinin 90 dk.da 90 mM ve 15 dk.da 100 mM pH 3,0 tamponlarında altbirimlerine ayrıldığı gösterildi. Çalışmamızda literatüre uyumlu

olarak 50 mM pH 3,0 tamponunda, 15 dk.da kapsül yapının altbirimlerine ayrıldığı, 50 mM'lık pH 4,0-12,0 tamponlarında kapsül yapının "assemble" formunu koruduğu tespit edildi (Rahmanpour vd., 2013; Cassidy-Amstutz vd, 2016). Ayrıca, düşük pH'da altbirimlerine ayrılan JauEnc'in ortam pH'sı artırıldığında yeniden kapsül formuna dönebildiği Native-PAGE' de gösterildi. Sıcaklığın enkapsülün üzerindeki etkisini ayrıntılı olarak gösteren çalışmada, enkapsülün DLS cihazında, 35 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C ve 65 °C'de, 10 dk.lık döngülere tabi tutuldu. Sonuçta, enkapsülünün 50 °C'ye kadar kapsül formunu koruduğu, 50 °C'den sonra kaybettiği kaydedildi (Tamura vd., 2015). Native PAGE ile yapılan çalışmalarda, JauEnc'in 30-80 °C'de 15 dk.lık inkübasyonun ardından buzda 1 sa. bekletilen enkapsülünlerin Native-PAGE'de verdiği sonuçlar, literatürle benzerlik göstermektedir (Tamura vd., 2015). Farklı olarak, 40 ve 50 °C'de kapsül yapının kısmi olarak monomerlerine ayrıldığı gözlemlenmiştir. 50-70 °C'de JauEnc tamamen altbirimlerine ayrılırken, 80 °C'de ise tamamen degrades olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, 30 dk.lık inkübasyonlarımızın ardından oda sıcaklığına alınan JauEnc'in 30-70 °C'de kapsül formuna dönebildiği tespit edildi. Elde edilen veriler, JauEnc'in protein yapısının geniş sıcaklık ve pH stabilitesine sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde enkapsülünün 7 M GuHCl ve 1 mM DTT ile muamelesi sonucuna kapsül yapının açıldığı elektron mikroskopu ile tespit edildi (Cassidy-Amstutz vd, 2016). Başka bir çalışmada, enkapsülün 500 mM NaCl, 25 mM MgCl₂ ve 1,0 mM DTT ile muamele edilerek FFF-MALS (Field-flow Fractionation with Multi-Angle Light Scattering) analizi yapıldı ve enkapsülünün bir altbirimini temsil eden 28,67 kDa karşılık gelen pik tespit edildi (Tamura vd., 2015). Yürütülen Native PAGE analizine göre, 5 M GuHCl'nin kapsül yapıyı altbirimlerine ayırmak için yeterli olduğu ve 1 M GuHCl'de enkapsülünün kapsül formuna tekrar dönebildiği, benzer şekilde %20 SDS'de altbirimlerine ayrılan enkapsülünün %5 olarak seyreltilen SDS ortamında "reassemble" olabildiği gözlemlendi. Bu veriler, JauEnc'in protein ve kapsül yapısının SDS gibi güçlü sürfaktan yapıya ve güçlü indirgeyici GuHCl'ye karşı yüksek dayanıklılığını göstermektedir.

JauEnc'in kapsül formda bulunduğu ortam şartlarında, 1 mM ve 5 mM Mn⁺², Hg⁺², Mg⁺², Ca⁺², Co⁺², Zn⁺², K⁺, Cu⁺², Ni⁺ metal iyonları ile 30 dk. boyunca muamele edildi. Sonuçta, metal iyonlarının kapsül formu etkilemediği, yalnızca Fe⁺² iyonunun tamamen ve Hg⁺² iyonunun ise kısmen kapsül formu inhibe ettiği tespit edildi. JauEnc'in, ağır metal olan 1 mM Hg⁺² iyonuna karşı bile daha dayanıklı iken, 1 mM Fe⁺² ortamında tamamen "disassemble" olması oldukça dikkat çekicidir. Bu durum enkapsülün porlarının Fe⁺²'e

spesifik afinitesi olabileceğini düşündürmektedir. Stres anında enkapsülinle kargolama mekanizmasıyla ilişkiyi ya da Fe^{+2} 'in daha düşük konsantrasyonlarında, Dyp reaksiyonu sırasında porları genişleterek kapsül yapı içerisine substrat girişini sağlayan bir mekanizmayı işaret ediyor olabilmektedir. Enkapsülinin özel kargo proteini olan Dyp, katalitik bölgesinde Fe^{3+} bulundurmaktadır ve katalitik aktivite sırasında, iki aşamalı olarak okside (Fe^{4+}) olmaktadır. Enkapsülinin Fe^{+2} ortamında monomerlere ayrılıyor oluşu, Dyp mekanizması ile ilgili eksik bilgilerin tamamlanmasına ve stres anında kargolama mekanizmasının aydınlatılmasına ya da hücre içindeki fizyolojik rolü hala belirsiz olan Dyp ve enkapsülin hakkında bir ipucu sağlayabilir.

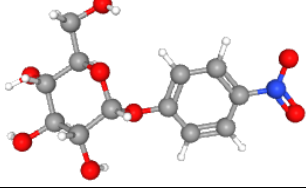
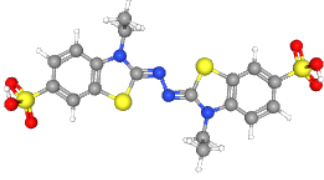
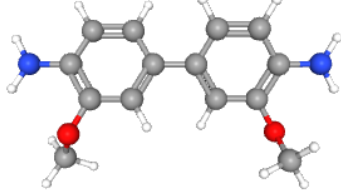
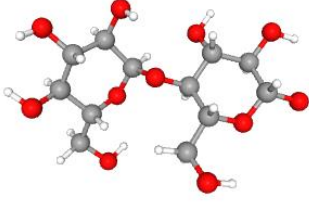
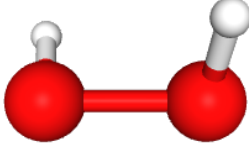
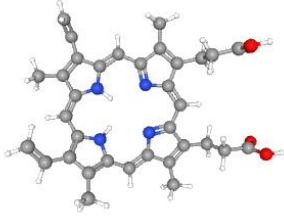
Cassidy-Amstutz vd. (2016), DLS analizi verilerine dayanarak, pH ve kimyasal ortam değişikliği ile enkapsülinin *in vitro* ortamda altbirimlerine ayrılıp tekrar bir araya gelebileceğini gösterdiler. Prosedüre göre, 1 mM HCl ve 1 mM DTT ile kapsül yapı pH 1'de 1 saat boyunca inkübe edilmiş, ardından 1 mM DTT ve 1 mM NaOH ile pH 12'de 1 saat boyunca inkübe edilerek kapsül yapı geri kazanıldı. Yürütülen projede, bu *in vitro* kapsülasyon modifiye edildi. Karakterize edilen enkapsülinin fiziksel özelliklerine dayanılarak geliştirilen metotta, kuvvetli asit, kuvvetli baz ve denatüre edici bir ajan kullanmadan, 50 mM sodyum sitrat (pH 3,0) ve 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponlarında birer saatlik inkübasyon ile kapsülasyonun sağlanabileceği belirlendi.

JauDyp'nin JauEnc tarafından enkapsüllendiğini teyit etmek için bir Dyp substratı olan o-dianizidine karşı zimogram analizi ile teyit edildi. Zimogram analizi sonuçlarına göreyse, substrat olarak kullanılan o-dianizidinin topolojik yüzey hacmi $70,5 \text{ \AA}^2$ 'dır. T1 tipi enkapsülinlerin por genişliği ise 5-6 $\text{\AA}$ 'dur (Tablo 11). Zimogram analizi, 50 mM fosfat tampon (pH 5,5) ortamında gerçekleştirildi ve yürütülen çalışmalara göre enkapsülin pH 5,5' de kapalı formda bulunmaktadır. Bu durumda çalışmalarımız, kuyucukta görülen aktivitenin, JauDyp'nin JauEnc içinde iken gerçekleştiğine işaret etmektedir. Diğer yandan, o-dianizidin JauDyp'nin katalitik boşluğuna girebilecek boyutta değildir ve JauDyp muhtemelen lineer formdaki H_2O_2 aracılı olarak aktivite göstermektedir. Bu durum, hacimli substratlara karşı JauEnc'in JauDyp aktivitesi için bir engel teşkil etmediğine işaret etmektedir. Bununla beraber, Rahman vd., (2013) porlardan giremeyecek kadar büyük bir substrata karşı Dyp'nin kapsül içinde aktivite vermesini ilginç bulmakta ve kapsül yapının aktivite sırasında açılabilme ihtimalini öne sürmektedirler. Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre, Rahmanpour vd.'nin (2013) reaksiyonunda enkapsülinin açılmasını tetikleyecek herhangi bir pH (pH 5,0) ya da sıcaklık etkeni

bulunmamaktadır. Bu durumda, biz kapsül yapıda Dyp aktivitesinin, substrat-enzim kompleksi oluşturma gereksinimi olmadan H_2O_2 aracılı olarak gerçekleştiğini önmekteyiz. Bununla beraber ABTS, veratril alkol ve diğler azo boyaların Dyp'nin katalitik boşluğuna ulaşamayacak kadar büyük oldukları bilinmektedir. Hacimli substratlar, enzim yüzeyindeki aromatik yapılarla etkileşime girerek aktif bölgeye ulaşmadan okside olurlar. LRET mekanizmasının nasıl işlediğı net olmamakla birlikte, çalışmamız JauDyp'nin enkapsülün içerisindeyken substrat yüzeyine bağlanma gereksinimi bulunmadığını ya da kapsül yapı üzerinde substrat bağlanma bölgelerinin bulunma ihtimalinin olduğunu ortaya koymaktadır.



Tablo 11. Dyp ve oligo-1,6- α -glukosidaz substratları ve kofaktörler

α -pNPG		145 Å ²	oligo-1,6- α -glukosidaz substratı
ABTS		215 Å ²	Dyp Substratı
o-dianizidin		70.5 Å ²	Dyp substratı (Zimogram)
Maltoz		190 Å ²	oligo-1,6- α -glukosidaz substratı (Zimogram)
H ₂ O ₂		40.5 Å ²	Dyp kofaktörü
Protohem XI		101 Å ²	Dyp kofaktörü

ABTS substratıyla yürütülen reaksiyonlarda, serbest ve enkapsülün içinde bulunan JauDyp'nin optimum pH'sı 3'tür. JauDyp, ABTS'ye karşı JauEnc'in kapalı bulunduğu pH formlarında aktivite göstermemektedir ve JauDyp'nin optimum pH ortamında JauEnc, altbirimlerine ayrılmaktadır. Bu durum ise, JauDyp'nin ABTS aktivitesinin kapsül form açıldıktan sonra gerçekleştiğini desteklemektedir. Dyp'nin bir makalede ABTS, guaicol ve catechol gibi substratlara optimum pH 3'te aktivite gösterirken, dimetoksifenol (DMP), diklorofenol (DCP), sringaldazin gibi lignin türevli fenoliklere karşı optimum pH 8'de

aktivite gösterdiği belirtilmektedir (Musengi vd., 2020). JauDyp'nin çok fonksiyonlu oluşu ve farklı pH'larda aktivite gösterme kabiliyeti, fizyolojik şartlarda da farklı özelliklere sahip substratlarla farklı pH'larda aktif olduğu bir sistemin var olduğunu düşündürmektedir. Belki de, JauDyp'nin bu farklı özellikleri, hücre içinde stres ortamının olup olmamasına bağlı olarak ortaya çıkan iki mekanizmayı göstermektedir.

Enlapsülinlenen ve enkapsülinlenmeyen JauDyp'nin optimum aktiviteleri 30 °C olarak belirlendi ve enkapsülinlenen JauDyp'nin aktivitesinde 40 ve 50 °C'de yaklaşık olarak %40 artış gözlemlendi. 40 ve 50 °C'de JauEnc'in kapsül formu kısmi olarak açılmaktadır. Bu da, JauEnc'in ısının okside edici etkilerinden JauDyp'yi kısmi olarak koruduğuna işaret etmektedir.

Elde edilen kinetik verilere göre, JauEnc'in JauDyp'nin ABTS'ye olan ilgisini ve katalitik aktivitesini 1,5 kat artırdığı gözlemlendi. Literatürde bulunan verilere göre, H₂O₂ JauEnc'in porlarından içeri girebilecek büyüklükte iken, ABTS porlardan içeri giremeyecek kadar büyüktür (Rahmanpour vd., 2011) (Tablo 11). Kapsül bariyerine rağmen substratın enzime ilgisinin artması, JauEnc'in H₂O₂'yi JauDyp'nin aktif bölgesine yönlendirdiğini ya da JauEnc üzerinde ABTS için bir substrat bağlanma bölgesi olduğunu işaret etmektedir. Katalitik aktivitedeki artış için bir diğer teori ise, JauEnc bariyerinin, H₂O₂'nin JauDyp üzerindeki inhibe edici etkisini elimine etmesi olabilir.

JauEnc içerisinde bulunan ve serbest haldeki JauDyp üzerindeki kimyasalların etkisinin araştırılmasında, JauEnc, güçlü sürfaktan olan SDS'in yol açtığı inhibisyonu engelleyemediği; diğer sürfaktanların, metal bağlayıcı ajanların inhibe edici etkilerini %10-30 arasında elimine ettiği gözlemlendi. Bütanol ve gliserol gibi organik çözücülerin inhibisyonu ise sırasıyla %40 ve %75 oranında elimine edildi. Genel olarak, aktivitenin %100 oranında geri kazandırılmaması, JauEnc'in bu kimyasallardan etkilendiğine işaret etmektedir. Bu etkilenme, kapsül formun bozunmasını, substratların JauEnc'e bağlanma sorununu ya da substratları JauDyp'ye yönlendirme kısıtlılığını içerebilir. Örnek olarak, zimogram çalışmalarında enkapsülinin Hg⁺² ve Fe⁺² dışındaki metallerle karşı dirençli olduğu, kapsül formun bu metallerden etkilenmediği tespit edildi. Buradaki, sonuca göre, JauEnc'in Cu⁺²'ye karşı dirençli olduğu için, JauDyp'yi Cu⁺²'ye karşı koruduğu, bu yüzden JauDyp Cu⁺² ortamında %100 aktivite gösterdiği gözlemlendi. Diğer yandan, kapsül form Hg⁺²'a karşı hassas olduğu için, JauDyp, JauEnc içerisinde ancak %30 oranında aktivite gösterebildiği gözlemlendi. JauEnc'in, JauDyp'yi çözücülere karşı iyi derecede koruma etkisi gösterdi. JauEnc, protein yapılı olduğundan çözücü etkisiyle kapsül yapının

daha fazla gevşeyip porların genişlemesine ve böylece substrat girişine katkı sağlıyor olabilir.

Yürütülen çalışmalar, enkapsülinin proteolitik aktiviteye karşı oldukça dayanıklı olduğunu desteklemektedir. Tamura vd. (2015), enkapsülinin, kargo proteinini 0,02 µg Tripsine karşı, koruduğunu tespit ettiler. Bu çalışmada ise, enkapsülinin, Dyp'yi 0,1 µg Tripsine karşı koruduğunu, ayrıca enkapsülinin 1 µg Tripsine karşı oldukça dayanıklı olduğu, ancak enkapsülinin 5 µg Tripsin ile kısmi degradasyona uğradığı belirlendi.

Projede ayrıca, *Anoxybacillus ayderensis* A9'e ait AaySuc'un C-terminaline, JauDyp'ye ait kargo yükleme peptiti (CLP) eklendi ve üretilen AaySucCLP karakterize edilerek CLP etiketinin AaySuc enzimine etkisi araştırıldı.

AaySucCLP, JauEnc ile kapsülasyonu sağlandı. Kapsülasyon zimogram analizi ile tespit edildi. Böylece, biyoinformatik incelemelerle öngörüldüğü şekilde, JauEnc'e spesifitesi bulunan JauDyp'nin C-terminal bölgesindeki 83 bp'lik dizinin, JauEnc tarafından kapsüllenme için gerekli olan kargo yükleme peptiti (CLP) olduğu desteklendi. Bu proje, enkapsülinle ilişkisiz bir enzimin kapsüllenecek enzim aktivitesinin ve enzim aktivitesine etkilerin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bunun dışında literatürde, enkapsülinin tespit edilmesi amacıyla GFP proteini ve medikal alanda bir antikanser ön ilacı olan Aldoxorubicin ve gümüş ile kapsülleme çalışmaları yapıldı (Moon vd., 2014; Cassidy-Amstutz vd, 2016; Giessen ve Silver, 2016).

AaySuc ve AaySucCLP karakterizasyonları karşılaştırıldığında, CLP etiketinin pH çalışma grafiğini etkilemezken, AaySuc'ın 30 °C'de ve 70 °C'de derecede aktivitesi azaldı. CLP AaySuc'ın termal kararlılığında %10-20 oranında azaltmıştır. AaySuc'ın pH kararlılığı, 30 °C'de, 8 gün boyunca korunurken AaySucCLP'nin aktivitesi 5. Günden itibaren azalmaya başladı. Ayrıca, AaySucCLP'nin pH 9' da kararlılığında belirgin bir düşüş gözlemlendi.

AaySuc ve AaySucCLP kinetik parametreleri karşılaştırıldığında, CLP'nin AaySuc'ın katalitik hızını 5 kat düşürdüğü gözlemlendi. AaySuc ve AaySucCLP'e aktiviteleri üzerine metal iyonlarının, organik çözücülerin, sürfaktanların ve ündirgeyici ajanların etkileri karşılaştırıldığında genel olarak benzer sonuçlar elde edildi. Yalnızca, 0,5 M imidazol ile 1 M GuHCl'nin AaySuc üzerinde inhibe edici etkileri olmamasına rağmen AaySucCLP'nin aktivitesini, sırasıyla %30 ve %40 oranında azalttıkları gözlemlendi. Organik çözücülerden etanol ve DMSO AaySucCLP ve AaySuc'da benzer etkiye yol açarken, AaySuc'ın %5'lik propanolde %100 aktivitesini korumasına rağmen AaySucCLP

aktivitesini tamamen kaybetti. CLP etiketi, geçiş metallerinin 5 mM konsantrasyonda %30 AaySuc'in aktivite kaybına yol açtı. Yürütölen deneyler, C-terminal domainin hidrolaz aktivitesi için ve enzimin kararlılığında etkili bir role sahip olduğunu göstermektedir. C-terminal domaini, GH13 ailesine özgü çok iyi korunmuş bir domaindir (Zhai vd., 2022). Ancak bu domain hakkındaki veriler, literatürde henüz mevcut değildir.

JauEnc ile kapsöllenöen ve kapsöllenmeyen AaySucCLP'nin farklı pH'larda gösterdiği aktivitelerin birebir aynı olduğu saptandı. Kargo proteini olarak JauDyp için de benzer sonuçlar elde edildi. Bu durumda, JauEnc'in kargo proteinlerin aktivitelerinin pH profillerini etkilemediği sonucuna varılmaktadır. Buna karşın, JauEnc, JauDyp'nin optimum sıcaklığını değıştirmese de sıcaklık-aktivite grafiğinde %40 oranında iyileştirme sağladığı gözlemlendi, yine JauDyp kapsölasyonunda olduğu gibi, AaySucCLP kapsölasyonunda da 30-35 °C'lerde, %10' luk bir iyileşme gözlemlendi. Termal kararlılık deneyleri sonucunda, 40 °C'de, AaySucCLP, 48 saatin sonunda aktivitesinin %65'ini kaybederken enkapsölinlenen AaySucCLP'de, 40 °C'de, %71 aktivite gözlemlendi. Paralel şekilde JauDyp, 48 saatin sonunda, 30 °C'de, aktivitesinin neredeyse tamamen kaybederken, enkapsölinlenen JauDyp'nin aktivitesini %50 koruduğı gözlemlendi. Tüm veriler, JauEnc'in kargo proteinlerine ısıya karşı tolerans kazandırdığı konusunda uyumlu görölmektedir.

Enkapsölinlenen ve enkapsölinlenmeyen AaySucCLP'nin kinetik verileri karşılaştırıldığında, JauEnc'in AaySucCLP'nin katalitik etkinliğinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit edildi. Wiryaman ve Toor (2022), enkapsölinin kabuğunun dış kısmında flavin substratı için bağlanma bölgesi olduğunu belirlendi. Bu sebeple, literatürde, enkapsölinlerin kargo proteinlerinin substratlarına karşı bağlanma bölgesi içerdikleri ve substratı kargo proteinine doğru yönlendirdiklerine dair öneriler bulunmaktadır. Çalışmamızda JauEnc'in, kendi spesifik kargo proteinin kapsöl içinde katalitik etkinliğini artırırken, AaySuc aktivitesi üzerinde önemli bir değışillğe sebep olmaması, literatürde bulunan bu önerileri desteklemektedir. JauEnc'in SDS ile olan AaySucCLP üzerindeki aktivitesinde bir iyileşme gözlenmedi. JauDyp ile alınan benzer sonuçlar JauEnc'in kargo proteinlerini, SDS'in denatüre edici etkisine karşı koruyamadığını göstermektedir. JauEnc, AaySucCLP'nin propanol, bütanol, metanol ve gliserol çözücülerindeki aktivitelerini iyi derecelerde iyileştirdi. Özellikle propanol ve bütanol, serbest AaySucCLP üzerinde hiçbir aktivite göstermezken, JauEnc içerisinde bulunan AaySucCLP, propanolde %95, bütanolde %50 ve gliserolde %72 aktivite gösterdi. Bu durum, JauEnc'in, apolar çözücölere karşı

hassas olan AaySucCLP'yi etkili bir şekilde koruduğunu göstermektedir. JauDyp ile yürütülen organik çözücü testlerinde de JauEnc, JauDyp aktivitesi üzerinde iyi derecede iyileştirici etki gösterdi. Bu durum, uygun çözücü seçiminde, JauEnc'in enzim immobilizasyonunda etkili olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, yüksek katalitik etkinliğe sahip enkapsülin ile kararlı hale getirilmiş ve etkinliği 1,5 kat artırılmış endüstriyel Dyp enzimi üretildi. Bu çalışmada ayrıca, kullanım alanına göre optimize edilerek daha geniş alanlarda kullanılabilir, iyi bir etkinliğe sahip termofilik enkapsülin ile kapsüllenmiş AaySucCLP endüstriyel enzimi üretildi. Tüm bunların dışında enkapsülin kargo proteinleri üzerindeki etkisi hakkında net bilgiler ve Dyp'nin fizyolojisi hakkında bazı ipuçları literatüre kazandırıldı.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, öncelikli olarak, *Jiangella aurantiaca* 8K307'nin JauDyp geni pET28a(+) vektörüne klonlandı, genin *E. coli* BL21 (DE3) suşunda aşırı ekspresyonu gerçekleştirildi ve elde edilen enzim His-Tag kromatografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırmanın ardından, enzimin optimum pH'sı 3,0, optimum sıcaklığı 30 °C olarak belirlendi. JauDyp'nin ABTS substratına karşı ilgisi, 0,12 mM ve katalitik hızı $\sim 80 \text{ s}^{-1}$ ve katalitik etkinliği, $\sim 700,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak bulundu. JauDyp'nin yüksek katalitik etkinliğine dayanarak, kağıt yapımında ya da atık suların giderilmesinde etkili olabileceği düşüncesi ile lignin, lignin türevli bileşikler ve atık sularında bulunan antrokinon ve azo gibi çeşitli tipteki boya maddelerine karşı katalitik özelliklerinin araştırılması önerilmektedir. JauDyp'nin farklı substratlara karşı nört ve bazik pH'larda da aktivite testlerinin yapılması, önerilmektedir. JauDyp aktif bölgesindeki "hem"den dolayı, sürfaktanlara, metal şelatlayıcı ve indirgeyici ajanlara ve apolar çözücülere karşı hassas karaktere sahip olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, JauDyp'nin endüstriyel alanda en etkili şekilde kullanılması için, JauDyp üretiminin ardından "hem"nin doygunluk testlerinin yapılması, ayrıca H_2O_2 ve metallerle karşı ki değerlerinin hesaplanarak katalitik etkinliğin tam olduğu ve kararlılığın optimum olduğu şartların belirlenmesi önerilmektedir. JauDyp ile ilgili olarak, ayrıca, sistein bölgelerindeki mutasyon çalışmalarıyla dimerik yapının aktivitede ve kararlılıktaki rolünün belirlenmesi önerilmektedir.

Anoxybacillus ayderensis A9 kaynaklı AaySuc geni pET28a(+) vektörüne klonlandı. *E. coli* BL21 (DE3) suşunda aşırı ekspres edildi ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırıldı. Optimum parametreleri pH 7,0 ve optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlendi. AaySuc'un α -pNPG'ye ilgisi 2,4 mM ve katalitik sabiti 524 s^{-1} olarak belirlendi. Maltoz ve sukroz substratlarıyla yapılan zimogram analizleriyle, AaySuc'ın sukroz ve maltoza karşı ilgisinin olduğu doğrulandı. Maltoz hidrolizi, AaySuc'ın iki glukoz arasındaki α -1,4 bağını kırmasıyla gerçekleşmektedir. Biyoinformatik veriler, AaySuc'ın 3.2.1.10 sınıfına ait olduğunu yani oligo α -1,6 glukoz bağlarını da hidroliz etme kabiliyeti olduğunu desteklemektedir. AaySuc'ın çok fonksiyonlu özelliğinin ortaya konması için, α -1,6 glukoz bağını içeren izomaltoz ve dekstran gibi substratlarla spesifik aktivite deneylerinin yapılması önerilmektedir. Ayrıca, literatürdeki verilere bağlı olarak, AaySuc'ın NaCl ve glukozu karşı ki değerlerinin hesaplanarak uygun polar çözücü ortamı oluşturularak

katalitik etkinliğinde optimizasyon sağlanması önerilmektedir. Metal, sürfaktan, şelatlayıcı ve indirgeyici ajan ve organik çözücülerin AaySuc üzerindeki etkileri araştırıldı ve sonuçta metal şelatlayıcı ajanlardan EGTA (25 mM) ve güçlü sürfaktan SDS (%5), Hg^{+2} (1 ve 5 mM) ve apolar özelliğe sahip çözücülerin inhibisyon etkileri haricinde, Aaysuc genel olarak kararlı bir enzim olarak bulundu. AaySuc'un termal ve pH kararlılıkları da yüksek bulunmuştur. AaySuc, yüksek kararlılığı ve yüksek katalitik etkinliğinden dolayı, araştırılmaya değer bir glikozil hidrolazdır. AaySuc'un mensup olduğu 3.2.1.10 sınıfı, oligo-1,6- α -glukosidazların yapısı, katalitik özellikleri ve substrat seçiciliği hakkında literatürde bilgi kısıtlılığı mevcuttur. AaySuc'un eksikliğinde glukoz intoleransa yol açan insan α -glikozidazına benzerliği, indirgeyici ve indirgeyici olmayan substrat bağlanma bölgelerini içeren çift fonksiyonlu aktif bölgesi ve elde edilen verilere göre aktivite ile ilişkili olduğu düşünülen, 4 Ca^{+2} bağlanma bölgesi içeren 8 amino asitlik N-terminal dizisi, ortaya konmayı bekleyen ilgi çekici özelliklerden bazılarıdır. Ayrıca glikozil hidrolaz ailesi çok geniş ve sınıflandırması çok karışık olduğundan, AaySuc ile yapılacak her çalışma glikozil hidrolaz ailelerinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. α -glikozidazlar, α -amilaz olmadan nişastayı parçalayamazlar da, α -amilazla birlikte kullanılması durumunda, etkili oligo-1,6- α -glukosidaz özellikleri ile gıda endüstrisinde dirençli nişasta çalışmalarında ve fruktoz üretiminde kullanılabilir potansiyele sahip görünmektedir.

Jiangella aurantiaca 8K307'nin JauEnc geni pET28a(+) vektörüne klonlandı. *E. coli* BL21 (DE3) Star hücrelerinde aşırı ekspresyonu yapıldı ve elde edilen protein His-Tag kromatografisi ile saflaştırıldı. JauEnc'in kapsül formunun korunduğu ve altbirimlerine ayrıldığı pH ve sıcaklık koşulları belirlendi. JauEnc'in pH 3'de altbirimlerine ayrılıp daha yüksek pH ortamına getirilmesi durumunda kapsül formunu yeniden kazandığı belirlendi. JauEnc'in, 5 M GuHCl ve %20 SDS ortamında denatüre olduğu, 1 M GuHCl ve %5 SDS ortamlarına seyreltme yapıldığında kapsül formunu tekrar geri kazandığı belirlendi. 5 mM Hg^{+2} ve 1 ve 5 mM Fe^{+2} metali dışında metallerin JauEnc'in kapsül formunu etkilemediği belirlendi. JauEnc'in termal kararlılığı olarak 80 °C'nin üzerinde 1 saatlik reaksiyonun sonucunda kapsül formun geri kazanılamadığı belirlendi. Bu çalışmada yapılan tüm fizyolojik araştırmaların tespiti, Native PAGE üzerinde yapıldı. Ancak kimyasalların PAGE boyaları ile uyumsuzluğu ve PAGE analizinin uzun zaman alması ve kompleks ortam koşulları, analizleri oldukça zorlaştırmaktadır. Bu duruma binaen, tüm fizyolojik analizlerin, daha fazla kimyasal maddenin farklı konsantrasyonlarının ve organik çözücülerin JauEnc'in kapsül formu üzerindeki etkilerinin DLS metodu ile yapılması

önerilmektedir. Fe^{+2} , JauEnc'in ağır metal Cıva(II)'dan daha etkili bir denatürasyonuna sebep olmuştur. Native-PAGE, Fe^{+2} etkisini anlamada güvenilir bir yöntem olmadığından, Fe^{+2} ve JauDyp'nin aktif bölgesinde bulunan ferrik iyonlarının JauEnc üzerindeki etkisinin ve bu iyonların JauDyp aktivitesi üzerine etkisinin DLS metodu ile araştırılması önerilmektedir.

JauEnc ile JauEnc'in fizyolojik özelliklerine dayanarak in vitro ortam koşullarında JauDyp kapsülasyonu gerçekleştirildi ve o-dianizidin substratı ile yapılan zimogram ve Native PAGE analizleri ile kapsülasyon teyit edildi. JauDyp ve JauEnc, *Jiangella aurantiaca* 8K307 genomunda ardışık olarak bulunmaktadır. Literatürde JauDyp ve JauEnc, operon olarak üretilip, kapsülasyon *E. coli* içerisinde üretim aşamasında gerçekleşmektedir. Ancak, bu çalışmada çeşitli operon denemelerinde downstreamdeki (aşağıdaki) gen yani RBS bölgesine uzakta kalan genin ekspresyonu sağlanamadı. Bu sebeple in vivo kapsülasyon için, ikinci genin ekspresyonunu artırmaya yönelik fizyolojik yöntemler, farklı vektör ve hücre sistemlerinde, güçlü operon denemeleri ya da birbiriyle uyumlu iki farklı plazmite klonlama yapılarak hücre içi kapsülasyon çalışmalarının yapılması önerilmektedir. Ayrıca daha basit ve kısa bir in vitro metot olarak ısı etkisiyle kapsülasyon denemeleri önerilmektedir.

Enkapsülinli ve enkapsüliniz JauDyp'nin ABTS'ye karşı kinetik parametreleri belirlendi. Kapsülasyonun, JauDyp aktivitesini 1,5 kat arttırdığı belirlendi. Enkapsülinli ve enkapsüliniz JauDyp'nin farklı substratlara karşı aktivite testleri yapılarak ve kenetlenme (docking) çalışmaları ile enkapsülin porlarının H_2O_2 'ye veya dış yüzeyinin substratlara karşı ilgisi olup olmadığının araştırılması önerilmektedir.

Enkapsülinin, metal iyonu, sürfaktan, metal şelatlayıcı, indirgeyici ajan ve organik çözücülere karşı JauDyp aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi ve JauEnc'in JauDyp'yi negatif fizyolojik ortam koşullarına karşı koruduğu belirlendi. Enkapsülinin, JauDyp üzerindeki termal kararlılık etkileri incelendi ve JauEnc'in JauDyp'nin termal kararlılığını artırdığı belirlendi. Enkapsülinin ayrıca, tripsine karşı dayanıklılığı ve JauDyp üzerindeki koruyucu etkisi incelendi. Enkapsülinin koruyucu etkilerine bakıldığında, JauDyp'nin kapsül formuyla uygulama çalışmalarının yapılması önerilmektedir. Ayrıca daha etkili bir immobilizasyon için termofilik enkapsülin kullanımı önerilmektedir.

JauDyp'ye ailt kargo yükleme peptidinin (CLP) AaySuc'ın C-terminaline eklenerek AaySucCLP geni inşa edildi, AaySucCLP'nin pET28a(+) klonu BL21 (DE3) hücresinde aşırı ekspresyonu sağlanarak, enzim iyon değişim kromatografisi ile saflaştırıldı. Daha

sonra AaySucCLP enzimi ile optimum pH ve optimum sıcaklık parametreleri belirlendi ve bu değerlerin optimum şartları değiştirmediği gözlemlendi. AaySucCLP'nin α -pNPG'ye karşı kinetik parametreleri belirlendi ve CLP etiketinin AaySuc aktivitesini 5 katı oranda azalttığı gözlemlendi. Daha sonra, sürfaktan, metal bağlayıcı ve indirgeyici ajan, metal ve organik çözücülerin AaySucCLP üzerindeki etkileri incelendi. Sonuçta, AaySucCLP'nin, metal iyonları, organik çözücü ve deterjanlarla yapılan reaksiyonları, AaySuc'inkine benzer sonuçlar verdiği, diğer yandan, 0,5 M imidazol, 1 M GuHCl, %5 propanol ve 5 mM geçiş metallerinin enzim aktivitesinde inhibisyona neden olduğu belirlendi. AaySucCLP'nin termal ve pH kararlılık testleri yapıldı ve AaySuc'ın termal ve pH kararlılığında azalma olduğu belirlendi. CLP'nin tüm negatif etkileri sonucunda, C-terminal bölgesinin, Zhu ve arkadaşlarının (2022) belirttiği şekilhidrolaz aktivitesinde ve enzim kararlılığında etkili olduğu anlaşılmaktadır. Bu sebeple, C terminal bölgesinin araştırılması önerilmektedir. Ayrıca enkapsülasyonun enzim aktivitesini etkilememesi için N-terminal bölgesinde kapsülasyon önerilmektedir. Bu çalışmada, kargo yükleme peptidi (CLP) olarak Sutter (2008)'in önerdiği korunmuş 31 amino asitlik peptit kodlayıcı dizi eklendi. Cassidy-Amstutz (2016) ve arkadaşları ise kapsülasyon için daha kısa peptit kodlayıcı bölge belirlendi. Bu çalışma referans alınarak, AaySuc veya diğer enzimlerin kapsülasyonunda, enzimin aktivite ve kararlılığında daha az etki oluşturacağı düşünülen GSLNVSGL etiketinin eklenmesi önerilmektedir. Enzimin yapısına göre, CLP etiketinin N-terminal bölgesindeki etkisi de araştırılması önerilmektedir.

AaySucCLP, son olarak, JauEnc ile kapsüllendi ve kapsül içinde karakterizasyonu yapıldı. Elde edilen veriler enkapsülinlenmeyen AaySucCLP verileriyle karşılaştırıldı. Buna göre, enkapsülin, JauDyp ile paralel olarak, AaySucCLP'nin optimum pH ve optimum sıcaklık parametrelerini etkilemediği belirlendi. Enkapsülinin, JauDyp üzerindeki kinetik etkilerinden farklı olarak, AaySucCLP'nin katalitik hız sabitini etkilemediği belirlendi. Enkapsüllenen AaySucCLP üzerinde metal iyonu, sürfaktan, metal bağlayıcı ve indirgeyici ajanlar ve organik çözücülerin etkileri araştırıldı. Sonuçta, JauDyp ile paralel şekilde, JauEnc'in AaySucCLP'nin aktivitesini koruduğu belirlendi. Son olarak, enkapsülinlenen AaySucCLP ile termal kararlılık testi yapıldı ve JauEnc'in AaySucCLP'nin termal kararlılığını artırdığı belirlendi.

6. KAYNAKLAR

- Aehle, W. (Ed.). (2007). Enzymes in industry: production and applications. John Wiley and Sons.
- Ahmad, M., Roberts, J. N., Hardiman, E. M., Singh, R., Eltis, L. D., & Bugg, T. D. (2011). Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry*, 50(23), 5096-5107.
- Akita, F., Chong, K. T., Tanaka, H., Yamashita, E., Miyazaki, N., Nakaishi, Y., Suzuki, M., Namba, K., Ono, Y., Tsukihara, T., & Nakagawa, A. (2007). The Crystal Structure of a Virus-like Particle from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Provides Insight into the Evolution of Viruses. *Journal of Molecular Biology*, 368, 1469-1483.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Alfalah, M., Keiser, M., Leeb, T., Zimmer, K. P., & Naim, H. Y. (2009). Compound heterozygous mutations affect protein folding and function in patients with congenital sucrase-isomaltase deficiency. *Gastroenterology*, 136(3), 883-892.
- Andreas, M. P., & Giessen, T. W. (2021). Large-scale computational discovery and analysis of virus-derived microbial nanocompartments. *Nature Communications*, 12(1), 4748.
- Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., & Biswas, M. (2000). InterPro--an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Bioinformatics*. 16(12), 1145-50.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., & Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Researchs*, 40, 597-603.
- Bae, Y., Kim, G. J., Kim, H., Park, S. G., Jung, H. S., & Kang, S. (2018). Engineering tunable dual functional protein cage nanoparticles using bacterial superglue. *Biomacromolecules*, 19(7), 2896-2904.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 326-338.
- Borges, P. T., Silva, D., Silva, T. F., Brissos, V., Cañellas, M., Lucas, M. F., & Martins, L. O. (2022). Unveiling molecular details behind improved activity at neutral to alkaline pH of an engineered DyP-type peroxidase. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 3899-3910.

- Bouacem, K., Rekik, H., Jaouadi, N. Z., Zenati, B., Kourdali, S., El Hattab, M., & Jaouadi, B. (2018). Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* strain CX-9. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 636-646.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brissos, V., Tavares, D., Sousa, A. C., Robalo, M. P., & Martins, L. O. (2017). Engineering a bacterial DyP-type peroxidase for enhanced oxidation of lignin-related phenolics at alkaline pH. *Acs Catalysis*, 7(5), 3454-3465.
- Cassidy-Amstutz, C., Oltrogge, L., Going, C. C., Lee, A., Teng, P., Quintanilla, D., East-Seletsky, A., Williams, E. R., & Savage, D. F. (2016). Identification of a minimal peptide tag for *in vivo* and *in vitro* loading of encapsulin. *Biochemistry*, 55, 3461-3468.
- Chmelyuk, N. S., Oda, V. V., Gabashvili, A. N., & Abakumov, M. A. (2023). Encapsulins: structure, properties, and biotechnological applications. *Biochemistry (Moscow)*, 88(1), 35-49.
- Chen, C., Shrestha, R., Jia, K., Gao, P. F., Geisbrecht, B. V., Bossmann, S. H., & Li, P. (2015). Characterization of dye-decolorizing peroxidase (DyP) from *Thermomonospora curvata* reveals unique catalytic properties of A-type DyPs. *Journal of Biological Chemistry*, 290(38), 23447-23463.
- Chen, C., & Li, T. (2016). Bacterial dye-decolorizing peroxidases: Biochemical properties and biotechnological opportunities. *Physical Sciences Reviews*, 1(9), 20160051.
- Choi, B., Moon, H., Hong, S. J., Shin, C., Do, Y., Ryu, S., & Kang, S. (2016). Effective delivery of antigen-encapsulin nanoparticle fusions to dendritic cells leads to antigen-specific cytotoxic t cell activation and tumor rejection. *ACS Nano*, 10, 7339-7350.
- Colpa, D. I. (2018). Exploring the biochemical and biocatalytic properties of bacterial DyP-type peroxidases. Thesis fully internal (DIV), University of Groningen, Rijksuniversiteit Groningen.
- Contreras, H., Joens, M. S., McMath, L. M., Le, V. P., Tullius, M. V., Kimmey, J. M., Bionghi, N., Horwitz, M. A., Fitzpatrick, J. A. J., & Goulding, C. W. (2014). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* nanocompartment and its potential cargo proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 26, 18279-18289.
- Corchero, J. L., & Cedano, J. (2011). Self-assembling, protein-based intracellular bacterial organelles: emerging vehicles for encapsulating, targeting and delivering therapeutical cargoes. *Microbial Cell Factories*, 10, 92.
- Dhankhar, P., Dalal, V., Mahto, J. K., Gurjar, B. R., Tomar, S., Sharma, A. K., & Kumar, P. (2020). Characterization of dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 693, 108590.

- de Eugenio, L. I., Peces-Perez, R., Linde, D., Prieto, A., Barriuso, J., Ruiz-Duenas, F. J., & Martinez, M. J. (2021). Characterization of a dye-decolorizing peroxidase from *Irpex lacteus* expressed in *Escherichia coli*: An enzyme with wide substrate specificity able to transform lignosulfonates. *Journal of Fungi*, 7(5), 325.
- Dong, Z., Tang, C., Lu, Y., Yao, L., & Kan, Y. (2020). Microbial Oligo-A-1, 6-Glucosidase: Current developments and future perspectives. *Starch-Stärke*, 72(1-2), 1900172.
- Dulger, S., Demirbag, Z., & Belduz, A. O. (2004). *Anoxybacillus ayderensis* A9sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 1499-1503.
- Ehibhathiomhan, A. O., Pour, R. R., Farnaud, S., Bugg, T. D., & Mendel-Williams, S. (2023). Periplasmic expression of *Pseudomonas fluorescens* peroxidase Dyp1B and site-directed mutant Dyp1B enzymes enhances polymeric lignin degradation activity in *Pseudomonas putida* KT2440. *Enzyme and Microbial Technology*, 162, 110147.
- Frandsen, T. P., Palcic, M. M., & Svensson, B. (2002). Substrate recognition by three family 13 yeast α -glucosidases. Evaluation of deoxygenated and conformationally biased isomaltosides. *Eur. J. Biochem.*, 269, 728-734.
- Gabashvili, A. N., Chmelyuk, N. S., Efremova, M. V., Malinovskaya, J. A., Semkina, A. S., & Abakumov, M. A. (2020). Encapsulins—bacterial protein nanocompartments: Structure, properties, and application. *Biomolecules*, 10(6), 966.
- Gabashvili A. N., Vodopyanov S. S., Chmelyuk N. S., Sarkisova V. A., & Fedotov K. A. (2021). Encapsulin based self-assembling iron-containing protein nanoparticles for stem cells MRI visualization. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12275.
- Garcia-Gonzalez, M., Minguet-Lobato, M., Plou, F. J., & Fernandez-Lobato, M. (2020). Molecular characterization and heterologous expression of two α -glucosidases from *Metschnikowia spp*, both producers of honey sugars. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-14.
- Giessen, T. W. (2016). Encapsulins: microbial nanocompartments with applications in biomedicine, nanobiotechnology and materials science. *Current Opinion in Chemical Biology*, 34, 1-10.
- Giessen, T. W., & Silver, P. A. (2016). Converting a natural protein compartment into a nanofactory for the size-constrained synthesis of antimicrobial silver nanoparticles. *ACS Synth. Biol.*, 5, 1497-1504.
- Giessen, T. W., & Silver, P. A. (2017). Widespread distribution of encapsulin nanocompartments reveals functional diversity. *Nature Microbiology*, 2, 17029.
- Giessen, T. W. (2022). Encapsulins. *Annual review of biochemistry*, 91, 353-380.
- Giessen, T. W., Orlando, B. J., Verdegaal, A. A., Chambers, M. G., Gardener, J., Bell, D. C., & Silver, P. A. (2019). Large protein organelles form a new iron sequestration system with high storage capacity. *Elife*, 8, e46070.

- Harper, S., & Speicher, D. W. (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol.*, 681, 259-280.
- Hart, J. R. (2000). Ethylenediaminetetraacetic acid and related chelating agents. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*.
- He, D., Hughes, S., Vanden-Hehir, S., Georgiev, A., Altenbach, K., Tarrant, E., Mackay, C. L., Waldron, K. J., Clarke, D. J., & Marles-Wright, J. (2016). Structural characterization of 1 encapsulated ferritin provides 2 insight into iron storage in bacterial nanocompartments. *Elife*. 5, e18972.
- Hofbauer, S., Schaffner, I., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2014). Chlorite dismutases—a heme enzyme family for use in bioremediation and generation of molecular oxygen. *Biotechnology journal*, 9(4), 461-473.
- Hobbs, J. K., Jiao, W., Easter, A. D., Parker, E. J., Schipper, L. A., & Arcus, V. L. (2013). Change in heat capacity for enzyme catalysis determines temperature dependence of enzyme catalyzed rates. *ACS Chemical Biology*, 8(11), 2388-2393.
- Jenkins, M. C., & Lutz, S. (2021). Encapsulin nanocontainers as versatile scaffolds for the development of artificial metabolons. *ACS Synthetic Biology*, 10(4), 857-869.
- Kaewmuangmoon, J., Kilaso, M., Leartsakulpanich, U., Kimura, K., Kimura, A., & Chanchao, C. (2013). Expression of a secretory α -glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. *BMC Biotechnology*, 13, 16.
- Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A., H. (2009). FastPCR software for pcr primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1), 1-14.
- Kim, S. J., & Shoda, M. (1999). Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1029-1035.
- Kim, T., Momin, E., Choi, J., Yuan, K., Zaidi, H., Kim, J., & Gilad, A. A. (2011). Mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles as positive T 1 contrast agents for labeling and MRI tracking of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of the American Chemical Society*, 133(9), 2955-2961.
- Kirk, T. K., & Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. Wiley, New York, 273-307.
- Kirk, T. K., & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465-501.
- Klem, R., De Ruiter, M. V., & Cornelissen, J. J. (2018). Protecting encapsulin nanoparticles with cysteine-knot miniproteins. *Molecular pharmaceutics*, 15(8), 2991-2996.
- Krahe, N. K., Berger, R. G., & Ersoy, F. (2020). A dyP-type peroxidase of *Pleurotus sapidus* with alkene cleaving activity. *Molecules*, 25(7), 1536.

- Kremer, M. L. (2023). Initial steps in the reaction of H_2O_2 with Fe^{2+} and Fe^{3+} ions: inconsistency in the free radical theory. *Reactions*, 4(1), 171-175.
- Künzle, M., Mangler, J., Lach, M., & Beck, T. (2018). Peptide-directed encapsulation of inorganic nanoparticles into protein containers. *Nanoscale*, 10(48), 22917-22926.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lagoutte, P., Mignon, C., Stadthagen, G., Potisopon, S., & Donnat, S. (2018). Simultaneous surface display and cargo loading of encapsulin nanocompartments and their use for rational vaccine design. *Vaccine*, 36, 3622-3628.
- Lam, X. M., Lai, W. G., Chan, E. K., Ling, V., & Hsu, C. C. (2011). Site-specific tryptophan oxidation induced by autocatalytic reaction of polysorbate 20 in protein formulation. *Pharmaceutical Research*, 28, 2543-2555.
- Lau, Y. H., Giessen, T. W., Altenburg, W. J., & Silver, P. A. (2018). Prokaryotic nanocompartments form synthetic organelles in a eukaryote. *Nature communications*, 9(1), 1311.
- Lauber, C., Schwarz, T., Nguyen, Q. K., Lorenz, P., Lochnit, G., & Zorn, H. (2017). Identification, heterologous expression and characterization of a dye-decolorizing peroxidase of *Pleurotus sapidus*. *AMB Express*, 7, 1-15.
- Li, J., Liu, C., Li, B., Yuan, H., Yang, J., & Zheng, B. (2012). Identification and molecular characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa* PKE117. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 774-785.
- Li, L., Wang, T., Chen, T., Huang, W., Zhang, Y., Jia, R., & He, C. (2021). Revealing two important tryptophan residues with completely different roles in a dye-decolorizing peroxidase from *Irpex lacteus* F17. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 128.
- Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2010). DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(6), 1869-1879.
- Linde, D., Ayuso-Fernández, I., Laloux, M., Aguiar-Cervera, J. E., de Lacey, A. L., Ruiz-Dueñas, F. J., & Martínez, A. T. (2021). Comparing ligninolytic capabilities of bacterial and fungal dye-decolorizing peroxidases and class-II peroxidase-catalases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2629.
- Liu, X., Du, Q., Wang, Z., Zhu, D., Huang, Y., Li, N., & Gu, L. (2011). Crystal structure and biochemical features of EfeB/YcdB from *Escherichia coli* O157: ASP235 plays divergent roles in different enzyme-catalyzed processes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14922-14931.
- Liu, X., Yuan, Z., Wang, J., Cui, Y., Liu, S., Ma, Y., & Xu, S. (2017). Crystal structure and biochemical features of dye-decolorizing peroxidase YfeX from *Escherichia coli*

- O157 Asp143 and Arg232 play divergent roles toward different substrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(1), 40-44.
- Lončar, N., Colpa, D. I., & Fraaije, M. W. (2016). Exploring the biocatalytic potential of a DyP-type peroxidase by profiling the substrate acceptance of *Thermobifida fusca* DyP peroxidase. *Tetrahedron*, 72(46), 7276-7281.
- Lučić, M., Svistunenko, D. A., Wilson, M. T., Chaplin, A. K., Davy, B., Ebrahim, A., & Worrall, J. A. (2020). Serial femtosecond zero dose crystallography captures a water-free distal heme site in a dye-decolorising peroxidase to reveal a catalytic role for an arginine in FeIV=O Formation. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(48), 21656-21662.
- Lučić, M., Wilson, M. T., Svistunenko, D. A., Owen, R. L., Hough, M. A., & Worrall, J. A. (2021). Aspartate or arginine? Validated redox state X-ray structures elucidate mechanistic subtleties of Fe IV=O formation in bacterial dye-decolorizing peroxidases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 26, 743-761.
- Lučić, M., Wilson, M. T., Tosha, T., Sugimoto, H., Shilova, A., Axford, D., & Worrall, J. A. (2022). Serial femtosecond crystallography reveals the role of water in the one-or two-electron redox chemistry of compound I in the catalytic cycle of the B-type dye-decolorizing peroxidase DtpB. *ACS catalysis*, 12(21), 13349-13359.
- Luque Santolaria, A. (2011). Structure, mechanical properties, and self-assembly of viral capsids. *Universitat de Barcelona*.
- MacWilliams, M. P., & Liao, M. K. (2006). Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. *ASM MicrobeLibrary*. American Society for Microbiology.
- Maity, B., Fujita, K., & Ueno, T. (2015). Use of the confined spaces of apo-ferritin and virus capsids as nanoreactors for catalytic reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 25, 88-97.
- McHugh, C. A., Fontana, J., Nemecek, D., Cheng, N., Aksyuk, A. A., Heymann, J. B., Winkler, D. C., Lam, A. S., Wall, J. S., Steven, A. C., & Hoiczyk, E. (2014). A virus capsid-like nanocompartment that stores iron and protects bacteria from oxidative stress. *The EMBO Journal*, 33, 1896-191.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y., M, Buso, N., Cowley, A., P. & Lopez, R. (2013). Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41, 597-600.
- Mendes, S., Brissos, V., Gabriel, A., Catarino, T., Turner, D. L., Todorovic, S., & Martins, L. O. (2015). An integrated view of redox and catalytic properties of B-type PpDyP from *Pseudomonas putida* MET94 and its distal variants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 574, 99-107.
- Min, K., Gong, G., Woo, H. M., Kim, Y., & Um, Y. (2015). A dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis* exhibiting substrate-dependent optimum temperature for dyes and β -ether lignin dimer. *Scientific Reports*, 5(1), 8245.

- Mizrachi, I. (2007). GenBank: the Nucleotide Sequence Database. The NCBI handbook [Internet], updated, 22.
- Moon, H., Lee, J., Min, J., & Kang, S. (2014). Developing genetically engineered encapsulin protein cage nanoparticles as a targeted delivery nanoplatform. *Biomacromolecules*, 15, 3794-3801.
- Moon, H., Lee, J., Kim, H., Heo, S., Min J., & Kang, S. (2014). Genetically engineering encapsulin protein cage nanoparticle as a SCC-7 cell targeting optical nanoprobe. *Biomaterials Research*, 18, 21.
- Morsy, S. A. G. Z., Ahmad Tajudin, A., Ali, M. S. M., & Shariff, F. M. (2020). Current development in decolorization of synthetic dyes by immobilized laccases. *Frontiers in Microbiology*, 11, 572309.
- Musengi, A., Durrell, K., Prins, A., Khan, N., Agunbiade, M., Kudanga, T., & Le Roes-Hill, M. (2020). Production and characterisation of a novel actinobacterial DyP-type peroxidase and its application in coupling of phenolic monomers. *Enzyme and Microbial Technology*, 141, 109654.
- Nichols, R. J., Cassidy-Amstutz, C., Chaijarasphong, T., & Savage D. F. (2017). Encapsulins: molecular biology of the Shell. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 5, 583-594.
- Nichols, R., LaFrance, B., Phillips, N., Oltrogge, L., Valentin-Alvarado, L., Bischoff, A., Nogales, E., & Savage, D., (2020). Discovery and characterization of a novel family of prokaryotic nanocompartments involved in sulfur metabolism. *eLife* 113720. 10.7554/eLife.59288.
- Norberg, I. (2012). Carbon Fibres From Kraft Lignin. KTH Royal Institute of Technology, Doctoral Dissertation.
- Nys, K., Pfanzagl, V., Roefs, J., Obinger, C., & Van Doorslaer, S. (2021). In vitro heme coordination of a dye-decolorizing peroxidase—the interplay of key amino acids, pH, buffer and glycerol. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9849.
- Ogola, H. J. O., Kamiike, T., Hashimoto, N., Ashida, H., Ishikawa, T., Shibata, H., & Sawa, Y. (2009). Molecular characterization of a novel peroxidase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7509-7518.
- Palonen, H. (2004). Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. VTT Technical Research Centre of Finland.
- Pfanzagl, V., Nys, K., Bellei, M., Michlits, H., Mlynek, G., Battistuzzi, G., & Obinger, C. (2018). Roles of distal aspartate and arginine of B-class dye-decolorizing peroxidase in heterolytic hydrogen peroxide cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 293(38), 14823-14838.

- Pupart, H., Jöul, P., Bramanis, M. I., & Lukk, T. (2023). Characterization of the ensemble of lignin-remodeling dyp-type peroxidases from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Energies*, 16(3), 1557.
- Putri, R. M., Allende-Ballester, C., Luque, D., Klem, R., Rousou, K. A., Liu, A., Traulsen, C. H. H., Rurup, W. F., Koay, M. S. T., Castón, J. R., & Cornelissen, J. J. L. M. (2017). Structural characterization of native and modified encapsulins as nanoplateforms for in vitro catalysis and cellular uptake. *ACS Nano*, 11, 12796-12804.
- Putri, R. M., Cornelissen, J. J. L. M., & Koay M. S. T. (2015). Self-Assembled Cage-Like Protein Structures. *ChemPhysChem*, 16, 911-918.
- Radford, D. (2015). Understanding the encapsulins: prediction and characterization of phage capsid-like nanocompartments in prokaryotes. University of Toronto, Doctoral Dissertation, Canada.
- Rahmanpour, R., & Bugg, T. D. (2013). Assembly in vitro of *Rhodococcus jostii* RHA 1 encapsulin and peroxidase DypB to form a nanocompartment. *The FEBS Journal*, 280(9), 2097-2104.
- Rai, A., Klare, J. P., Reinke, P. Y., Englmaier, F., Fohrer, J., Fedorov, R., & Manstein, D. J. (2021). Structural and biochemical characterization of a dye-decolorizing peroxidase from *Dictyostelium discoideum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6265.
- Riseh, N., S., Ghadamyari, M. & Motamediniya, B. (2012). Biochemical characterisation of α - and β - glucosidases and α - and β -galactosidases from red palm weevil. *Plant Protect. Sci.*, 48, 85-93.
- Roberts, J. N., Singh, R., Grigg, J. C., Murphy, M. E., Bugg, T. D., & Eltis, L. D. (2011). Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biochemistry*, 50(23), 5108-5119.
- Rurup, W. F., Snijder, J., Koay, M. S. T., Heck, A. J. R., & Cornelissen, J. J. L. M. (2014). Self-sorting of foreign proteins in a bacterial nanocompartment. *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 3828-3832.
- Sahinkaya, M., Colak, D. N., Ozer, A., Canakci, S., Deniz, I. & Belduz, A. O. (2019). Cloning, characterization and paper pulp applications of a newly isolated DyP type peroxidase from *Rhodococcus sp.* T1. 46, 569-580.
- Samanta, S. (2022). Structural & catalytical features of different amylases and their potential applications. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(2).
- Santos, A., Mendes, S., Brissos, V., & Martins, L. O. (2014). New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: towards biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2053-2065.

- Saygın, H., Ay, H., Güven, K. & Şahin, N. (2020). Genome-based classification of three novel actinobacteria from the Karakum Desert: *Jiangella asiatica* sp. nov., *Jiangella aurantiaca* 8K307 sp. nov. and *Jiangella ureilytica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70(3), 1993-2002.
- Schönert, S., Buder, T., & Dahl, M. K. (1999). Properties of maltose-inducible α -glucosidase MalL (sucrase-isomaltase-maltase) in *Bacillus subtilis*: evidence for its contribution to maltodextrin utilization. *Research in microbiology*, 150(3), 167-177.
- Schröder, K. H., Karvonen, P., Holm, A., Nielsen, P. H., & Munch-Petersen, J. (1963). The Stability of the Ferric complex with EGTA. *Acta Chemica Scandinavica*, 17, 1509-1514.
- Schwede T., Kopp J., Guex N., & Peitsch M. C. (2003). Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*. 31(13), 3381-3385. doi:10.1093/nar/gkg520. PMC 168927.
- Serdakowski, A. L., & Dordick, J. S. (2008). Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in Biotechnology*, 26(1), 48-54.
- Shrestha, R., Huang, G., Meekins, D. A., Geisbrecht, B. V., & Li, P. (2017). Mechanistic insights into dye-decolorizing peroxidase revealed by solvent isotope and viscosity effects. *ACS catalysis*, 7(9), 6352-6364.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. In Russell D. J. (ed.). *Multiple Sequence Alignment Methods. Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 1079, 105-116.
- Sigmund, F., Pettinger, S., Kube, M., Schneider, & F., Schifferer, M., (2019). Iron-sequestering nanocompartments as multiplexed electron microscopy gene reporters. *ACS Nano*. 13, 8114-8123. doi: 10.1021/acsnano.9b03140.
- Silva, D., Rodrigues, F., Lorena, C., Borges, P. T., & Martins, L. O. (2023). Biocatalysis for biorefineries: The case of dye-decolorizing peroxidases. *Biotechnology Advances*, 108153.
- Sim, L., Willemsma, C., Mohan, S., Naim, H. Y., Pinto, B. M., & Rose, D. R. (2010). Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase N-terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17763-17770.
- Singh, R., Grigg, J. C., Armstrong, Z., Murphy, M. E., & Eltis, L. D. (2012). Distal heme pocket residues of B-type dye-decolorizing peroxidase: arginine but not aspartate is essential for peroxidase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10623-10630.
- Singh, R., & Eltis, L. D. (2015). The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 574, 56-65.
- Sonotaki, S., Takami, T., Noguchi, K., Odaka, M., Yohda, M., & Murakami, Y. (2017). Successful PEGylation of hollow encapsulin nanoparticles from *Rhodococcus*

erythropolis N771 without affecting their disassembly and reassembly properties. *Biomater Sci.*, 30, 5(6), 1082-1089.

- Snijder, J., Kononova, O., Barbu, I. M., Uetrecht, C., Rurup, W. F., Burnley, R. J., Koay, M. S. T., Cornelissen, J. J. L. M., Roos, W. H., Barsegov, V., Wuite, G. J. L., & Heck, A. J. R. (2016). Assembly and mechanical properties of the cargo-free and cargo-loaded bacterial nanocompartment encapsulin. *Biomacromolecules*, 17, 2522-2529.
- Stam, M. R., Danchin, E. G., Rancurel, C., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2006). Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 19(12), 555-562.
- Sugano, Y., Matsushima, Y., & Shoda, M. (2006). Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 862-871.
- Sugano, Y., Muramatsu, R., Ichiyanagi, A., Sato, T., & Shoda, M. (2007). DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36652-36658.
- Sugano, Y., Matsushima, Y., Tsuchiya, K., Aoki, H., Hirai, M., & Shoda, M. (2009). Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Biodegradation*. 20(3), 433-40.
- Sugano, Y., & Yoshida, T. (2021). DyP-type peroxidases: recent advances and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5556.
- Sutter, M., Boehringer, D., Gutmann, S., Günther, S., Prangishvili, D., Loessner, M. J., Stetter, K. O., Weber- Ban, E., & Ban N. (2008). Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9, 939-947.
- Strittmatter, E., Wachter, S., Liers, C., Ullrich, R., Hofrichter, M., Plattner, D. A., & Piontek, K. (2013). Radical formation on a conserved tyrosine residue is crucial for DyP activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 537(2), 161-167.
- Svergun, D. I. B. C., Barberato, C., & Koch, M. H. (1995). CRY SOL—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, 28(6), 768-773.
- Tamura, A., Fukutani, Y., Takami, T., Fujii, M., Nakaguchi, Y., Murakami, Y., Noguchi, K., Yohda, M., & Odaka, M. (2015). Packaging guest proteins into the encapsulin nanocompartment from *Rhodococcus erythropolis* N771. *Biotechnol. Bioeng.*, 112, 13-20.
- Tiangpook, S., Nhim, S., Prangthip, P., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., & Waeonukul, R. (2023). Production of a series of long-chain

- isomaltooligosaccharides from maltose by *Bacillus subtilis* AP-1 and associated prebiotic properties. *Foods*, 12(7), 1499.
- Valdes-Stauber, N. & Scherer, S. (1994). Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3809-3814.
- van Bloois, E., Torres Pazmiño, D. E., Winter, R. T., & Fraaije, M. W. (2010). A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1419-1430.
- Wang, Q., Zhou, Y. M., Xing, C. Y., Li, W. C., Shen, Y., Yan, P., & Chen, Y. P. (2022). Encapsulins from *Ca. Brocadia fulgida*: An effective tool to enhance the tolerance of engineered bacteria (pET-28a-cEnc) to Zn^{2+} . *Journal of Hazardous Materials*, 435, 128954.
- Wasak, A., Drozd, R., Struk, Ł., & Grygorcewicz, B. (2018). Entrapment of DyP-type peroxidase from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 into Ca-alginate magnetic beads. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(2), 238-245.
- Watanabe, K., Miyake, K., & Suzuki, Y. (2001). Identification of catalytic and substrate-binding site residues in *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1, 6-glucosidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(9), 2058-2064.
- Watson, R. E., Gibbs, N. K., Griffiths, C. E., & Sherratt, M. J. (2014). Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(7), 1063-1077.
- Williams, E. M., Jung, S. M., Coffman, J. L., & Lutz, S. (2018). Pore engineering for enhanced mass transport in encapsulin nanocompartments. *ACS Synthetic Biology*, 7(11), 2514-2517.
- Wiryaman, T., & Toor, N. (2022). Recent advances in the structural biology of encapsulin bacterial nanocompartments. *Journal of Structural Biology: X*, 6, 100062.
- Wuorimaa, A., Jokela, R., & Aksela, R. (2006). Recent developments in the stabilization of hydrogen peroxide bleaching of pulps: An overview. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 21(4), 435-443.
- Yamaguchi, K., Morimoto, N., Wang, Y., Watanabe, K., Unno, T., Ito, H., & Matsui, H. (2004). Cloning and expression of an oligo-1,6-glucosidase gene from *Arthrobacter globiformis* I42 and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *J. Appl. Glycosci.*, 51, 37-40.
- Yoshida, T., & Sugano, Y. (2015). A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Archives of biochemistry and biophysics*, 574, 49-55.
- Yoshida, T., Ogola, H. J. O., Amano, Y., Hisabori, T., Ashida, H., Sawa, Y., & Sugano, Y. (2016). Anabaena sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 84(1), 31-42.

- Yu, Z., Chen, J., Chao, D., Sun, X., Liu, L., & Dong, S. (2023). Study on hydrolase mechanism of copper compound nanoparticles and its application in the evaluation of gut bacteria in aquatic environment. *Applied Catalysis B: Environmental*, 330, 122639.
- Zhai, X., Wu, K., Ji, R., Zhao, Y., Lu, J., Yu, Z., & Huang, J. (2022). Structure and function insight of the α -glucosidase QsGH13 from *Qipengyuania seohaensis* sp. SW-135. *Frontiers in Microbiology*, 13, 849585.
- Zhang, Y., Wang, X., Chu, C., Zhou, Z., Chen, B., Pang, X., & Liu, G. (2020). Genetically engineered magnetic nanocages for cancer magneto-catalytic theranostics. *Nature Communications*, 11(1), 5421.
- Xing, C. Y., Fan, Y. C., Chen, X., Guo, J. S., Shen, Y., Yan, P., & Chen, Y. P. (2020). A self-assembled nanocompartment in anammox bacteria for resisting intracellular hydroxylamine stress. *Science of the Total Environment*, 717, 137030.
- Xu, L., Sun, J., Qaria, M. A., Gao, L., & Zhu, D. (2021). Dye decoloring peroxidase structure, catalytic properties and applications: current advancement and futurity. *Catalysts*, 11(8), 955.

7. EKLER

Ek-1

Jiangella aurantiaca 8K307'ya ait enkapsulin geninin DNA dizisi aşağıda verilmiştir. N- ve C-terminalde 6X histidin etiketi bulundurmaktadır.

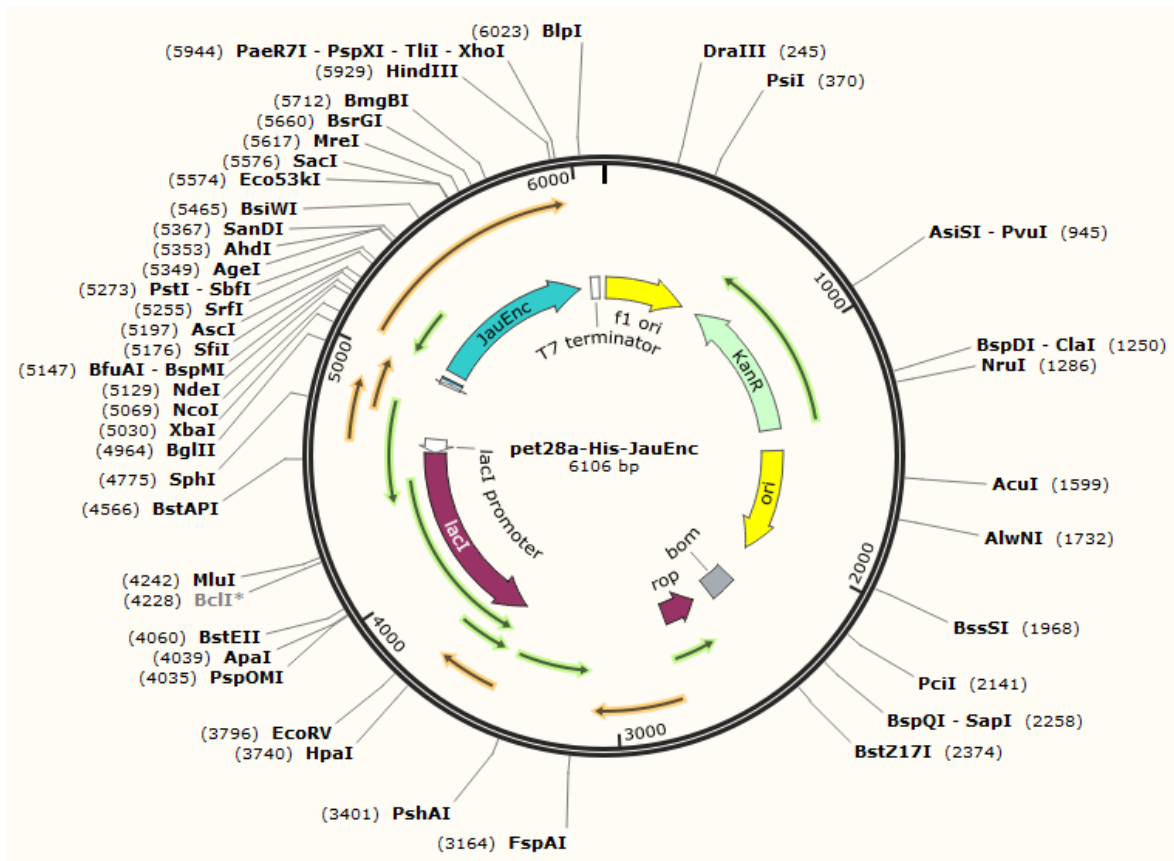
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAC
AACCTGCACCGGGAACCTCGCGCCCATCTCGGCGGCCCGCCTGGGCCGACATCGAGGCCGAGGCGCGC
CGCACGTTTCGTCCAGTACGTGCGCGCCCGCCGCGTTCGTGACGTCATCGGCCCGGGCGACGACGTC
CTGCAGGGGGTTCGGGACCGGGCATCTGCGCACGCTGGACGGCCCCGGCGACGGCGTGCTGGCGCGC
AGCCGCGAGGTCCGACCGGTGGTTCGAGCTGCGGGTCCCGTTCAACGTCGACCGTCAGGCCGTCGAC
GACGTCGAGCGCGGCGCGAAGGACGCCGACTGGCAGCCGGTGAAGGACGCCGCGAAGAAGATCGCG
TACGCCGAGGACCGCGCCATCGTCGCGCGCTTCGCGGGCGGCCGATCGAGGGCATCGTCGCGCGC
ACCACCAACGCGCCGATCACCTCCCCGGCGACGTCGCGAGCTCCCCGACGTCGCGGCCAGGCG
CTCACCACCTCCGGCTCGCCGGCGTGGGCGGCCCGTACAGCCTGCTGCTGTCCGCCGAGCTGTAC
ACCGCGGTTCGAGGAGACTACCGACCACGGCTACCCGATCCGCGAGCACGTCGCCCCGCTCCTCCAC
GACGGCGAGATCGTCTTCGCCCCGGCCATCGACGGCGGCCTGCTGCTGTGCGGCCGCGGCGGGAC
TACGAGCTGCACCTCGCCAGGATCTCTCCATCGGCTACCTCTCCACGACGCCGACACCATCGAG
CTGTACTTCGAGGAGGCGTTCACCTTCCTCGTCCAGACCGGCGAATCCGGCGTCGCGCTCGGCGCC
AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

897 nt

Jiangella aurantiaca 8K307'ya ait enkapsulinin amino asit dizisi aşağıda verilmiştir.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMNNLHRELAPISAAAWADIEAEARRTFVQYVAARRVVDVIGPGDDV
LQGVGTGHLRRLDGPBGVGLARSREVRPVVELRVFPNVDRQAVDDVERGAKDADWQPVKDAKKIA
YAEDRAIVAGFAAAGIEGIVAGTTNAPITLPGDVRELPDVAQAALTLRLAGVGGPYSLLLSAELY
TAVEETTDHGYPIREHVARVLHDGEIVFAPAI DGGLLSARGGDYELHLAQDLSIGYLSHDADTIE
LYFEEAFTFLVQTGESGVALGAKLAAALEHHHHHH

299 amino asit



Ek-2

Jiangella aurantiaca 8K307'ya ait Dyp geninin DNA dizisi aşağıda verilmiştir. N-ve C- terminalde 6X histidin etiketi bulunmaktadır.

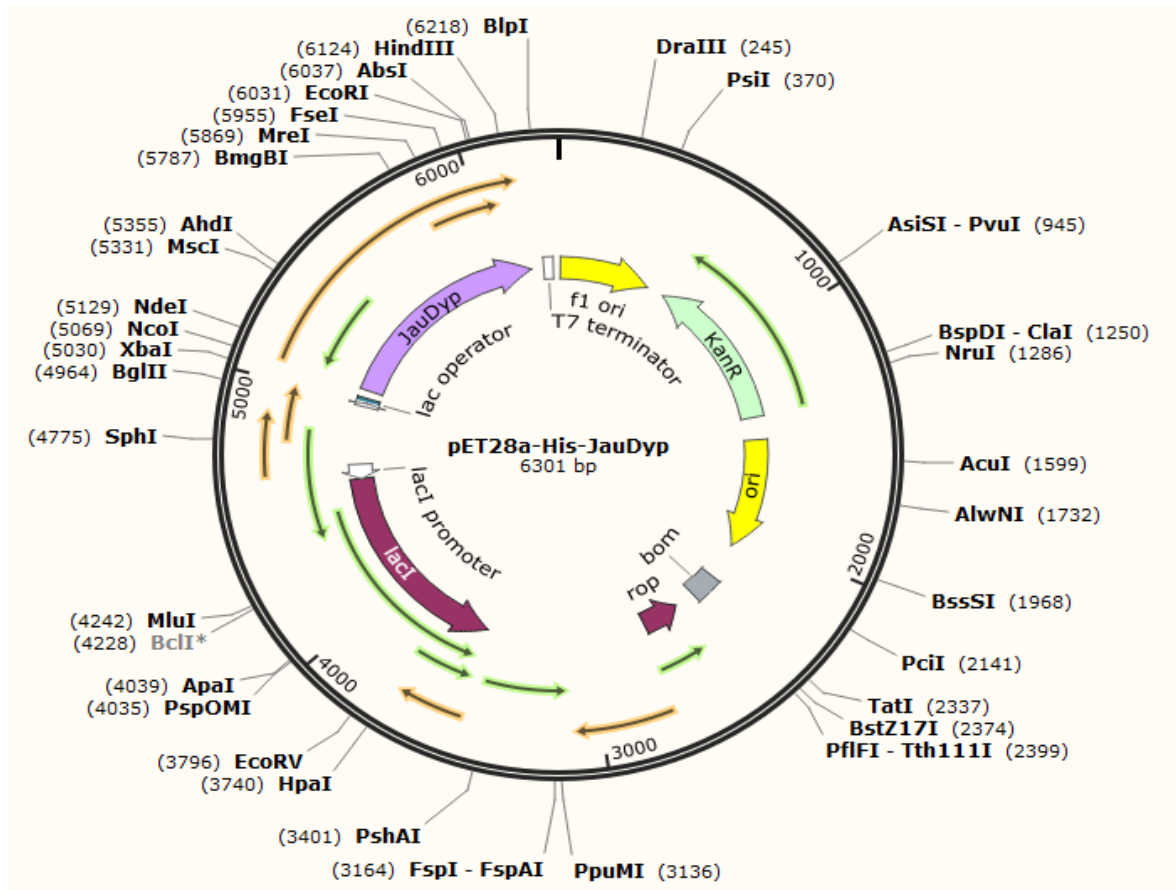
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACC
 GATCCCGTGACGCCGAGGCAGTGCTCGGGCCACTGACCGAGGCCGCGATCTTCCTGGTCGTCACG
 GTCGACGACGGTGGTGAGGACGTCGCACGCAACCTGCTGGCCGACGTCTCCGGAAGTACCAGGGCG
 GTCGGCTTCCGACGCTCGAGGACAACCTGACCTGCATCGCCGGCATCGGCGCCGGTGCGTGGCCA
 CGGCTGGTGGCGGGCGACCCGCCGTCAGGCTGCACCCGTTCCAGGAGATCGCCGGCCGCAAGCAC
 ACCGCCGTCACCACCCGGGCGACCTGATGTTCCACATCCGGGCGCGGCGCATGGACCTGTGCTTC
 GAGCTGGCGACGCTGATCGCCGGGCGGCTGGCCGGCGCGGTACCGTCGTCGACGAGGTGCCGGGG
 TTCCGGTACTTCGACAGCGCGACCTGCTGGGGTTTCGTCGACGGGACGGAGAACCCGACCGGCGCC
 GCGGCGGCCGCGGCCGTCCTCTCCGACGAGCCGGGGTTTCGAGGGCGGCAGCTACGTCGTCGTGCAG
 AAGTACCTGCACGACATGGACGCCTGGAACGCGCTGCCCGTCGAGGAGCAGGAGCGGGTCATCGGC
 CGCCGCAAGCTGTCCGACATCGAACTGTCCGACGCCGAGCAACCGAGCAACTCGCACGTCGCGCTG
 ACCACGATCACCGACGACGATGGCGAAGAGCTGGAGATCCTGCGCGACAACATGCCGTTCCGGGCGA
 CCGGGCGCCGGCGAGTTCGGCACCTACTTCATCGGCTACGCCGCCACCCGACGTCATCGAGCAG
 ATGCTCGTCAATATGTTTCGTCGGCCGGCCGCCGCAACTATGACCGCATCCTCGACTTCTCCGTC
 GCGGTCACCGGCGCGCTGTTCTACGTGCCACCGTGGAAATTCCTCGAGGGCCTCGCCGATCCGCCC
 AGTCCGACGCCCGCGACCGACGGCAGCCTGAACGTCGGCAGTCTCAAGAGGAGCGACGACTCAAAG
 CTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

1092 nt

Jiangella aurantiaca 8K307'ya ait Dyp'nin amino asit dizisi aşağıda verilmiştir.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTDPVTPQAVLGPLTEAAIFLVVTVDDGGEDVARNLLADVSGLTRA
 VGFRSVEDNLTICIAGIGAGAWPRLVGGDPPSELHPPQEIAGRKHTAVTTPGDLMFHIRARRMDLCF
 ELATLIAGRLAGAVTVVDEVPGFRYFDQRDLLGFVDGTENPTGAAAAAVALSDEPGFEGGSYVVVQ
 KYLHMDAUNALPVEEQERVIGRRKLSDIELSDAEQPSNSHVALTTITDDDGEELIILRDNMPFGR
 PGAGEFGTYFIGYAAHPDVIEQMLVNMVGRPPGNYDRILDFSVAVTGALFYVPTVEFLEGLADPP
 SPTPATDGSLNVGSLKRSDDSKLAAALEHHHHHHH

364 amino asit



Ek-3

Anoxybacillus ayderensis A9'e ait oligo-1,6- α -glukosidaz geninin DNA dizisi aşağıda verilmiştir.

ATGgAACGGACATGGTGGAAAGAAGCCGTCGTATATCAAGTGTATTGGCGCAGCTTTTTTGA CTCA
AATGGTGATGGGTATGGCGATTTAGAAAGGGCTTATTCAAAAAC TCGATTACATTCGCGACTTAGGG
GTGGATGTCATTTGGCTGAATCCGTGCTATGAGTCGCGCTGATAAAGATAACGGATACGACATTTCT
GATTACTATCGCATCATGGATAAAGCAGGGGATATGGAGACGTTTGACCGCTTGCTGAACGAGGTG
CATAAACGTGGAATGAAATTAATTATGGACCTTGTCGTGAACCATA CATCTGATCAACATCCTTGG
TTTATTGAATCTCGTTCGTCAAAAGACAATCCGAAACGCGATTGGTACATATGGCGCGACAAACCG
AATAACTGGCGCTCGTACTTTACTCCATCCGCATGGGAATATGATGAAAAACAGGACAGTATTAT
TTCCATTTCGTTTGCGGTAGAACAGCCAGATTTGAACTGGGAAAACGAAGAAGTTCGTGAAGAAATT
TATAAAATGATGCGTTTTTGGTTAGATAAAGGGATCGATGGGTTCCGTTTAGATGCGATTGCCTTA
CTAGCCAAACCTGAAGGATTCCCAGATGCCGAAAACCCGTATGACATTCGTTATTTAACAAACAAT
CCAGGCGTG CATGATTATTTACAAGAAATGCACGAAAAAGTATTAAACATTATGATATTTTCACC
GTCGGAGAAGTCGCTTTTCGTATCGCCAGAGGAAGGATTAAAATATGTCGGAGAAGACCGAAACGAA
CTACATACTTTGTTCCACTTTGAAGTGTGCGACGAAATGCCGACATGGGATCCGATTCGTTTTAAA
CAAATTCAAAAACGTTGGTACGAAGGATTGTGGGGCAAAGGGTGGA ACTCGCAGTTTTTAAACAAT
CACGACCATACGCGACAAGTGACGCGCTACGGAAACGATAAACAGTTCCGCGTCGAATCAGCAAAA
TTGCTCGCTACGCTCGTGCATACGTTGCCGGGAACCCCATATATTTATCAAGGTGAAGAAATTGGC
ATGACTGGCGTCAAGTTCGACACGATCGAAGACTATAACGACATTGCGATGAAAAATAAATATGCA
GAAGAAGTCGCAAAAGGTGCGATCCGAAAGAAGTGCTTGAAAGCTTG CAGCTACTGAGCCGAGAT
AACTCGCGTACACCAATGCAGTGGGATGATAGCGAACATGCTGGATTTACAACAGGAACACCTTGG
CTAAAAGTGAATCCGA ACTATAAAGAAATCAATGTAAAACAAGCATTAGCGGATCCGA ACTCTGTA
TATTATTACTATAAAAAGCTCATTCAATTGCGCAAGCAACATGCCGTTATGGTGTACGGAACGTTT
CGCGATTTTTTCGGA AAATGATCCGTACATTTACGCTTACACGCGGAGCTCGATGGCGTTTCGTTGG
CTCATCGTCTTAAACCATTGCGACAACGACAACGTATATGAGTTGCCAGAAGAGCTTGCTTCGGCT
CACCGCCATCTTTTGCTCGGCAATTATACAGATGTAAAAGAAGAAGGCACAACGCTTTATATGCGT
CCGCACGAAGCAAGAATgTATGCATTACAATGA

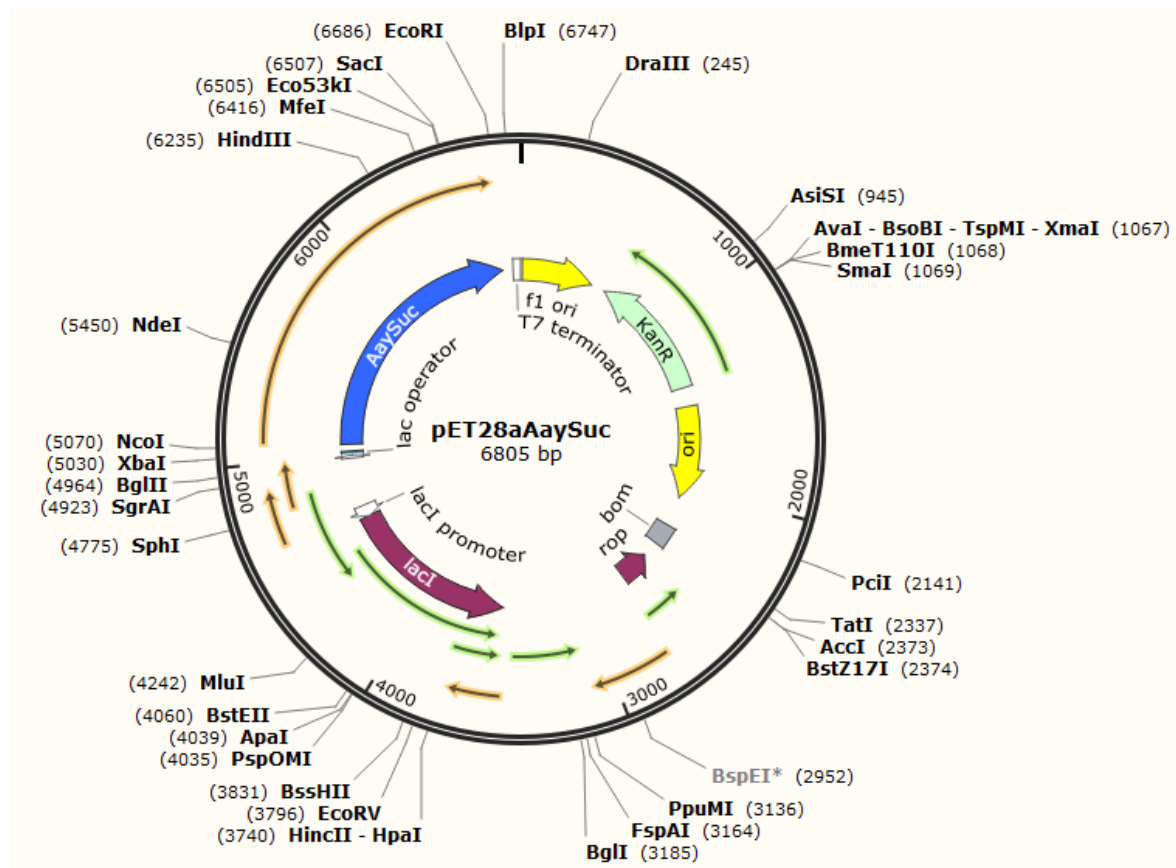
1620 nt

Anoxybacillus ayderensis A9'e ait oligo-1,6- α -glukosidazın amino asit dizisi aşağıda verilmiştir.

MERTWWKEAVVYQVYWRSFFDSNGDGYGDLEGLIQKLDYIRDLGVDVIWLNPCYESPKDNGYDIS
DYYRIMDKAGDMETFDRLLENVHKRGMKLIMDLVVNHTSDQHPWFIESRSSKDNPKRDWYIWRDKP

NNWRSYFTPSAWEYDEKTGQYYFHSFAVEQPDNLWENEEVREEIYKMMRFWLDKGIDGFRDLDAIAL
 LAKPEGFPDAENPYDIRYLTNNPGVHDYLQEMHEKVLKHYDIFTVGEVAFVSPEEGLKYVGEDRNE
 LHTLFHFVEVCDemptWDPIRFKQIQKRWYEGLGWKGWNSQFLNNHDHTRQVTRYGNDKQFRVESAK
 LLATLVHTLPGTPYIYQGEEIGMTGVKFDTIEDYNDIAMKNKYAEEVAKGRDPKEVLESLLSRD
 NSRTPMQWDDSEHAGFTTGTPLKVNPNYKEINVKQALADPNSVYYYYKKLIQLRKQHAVMVYGT
 RDFSSENDPYIYAYTRELDGVRWLIVLNHCNDNDVYELPEELASAHRLHLLGNYTADVKEEGTTLYMR
 PHEARMYALQ

538 amino acid



Ek-4

C-teminalinde *Jiangella aurantiaca* 8K307 kaynaklı Dyp'ye ait kargo yükleyici peptiti (CLP) kodlayıcı dizisini bulunduran, *Anoxybacillus ayderensis* A9'e ait oligo-1,6- α -glukosidaz geninin DNA dizisi aşağıda verilmiştir.

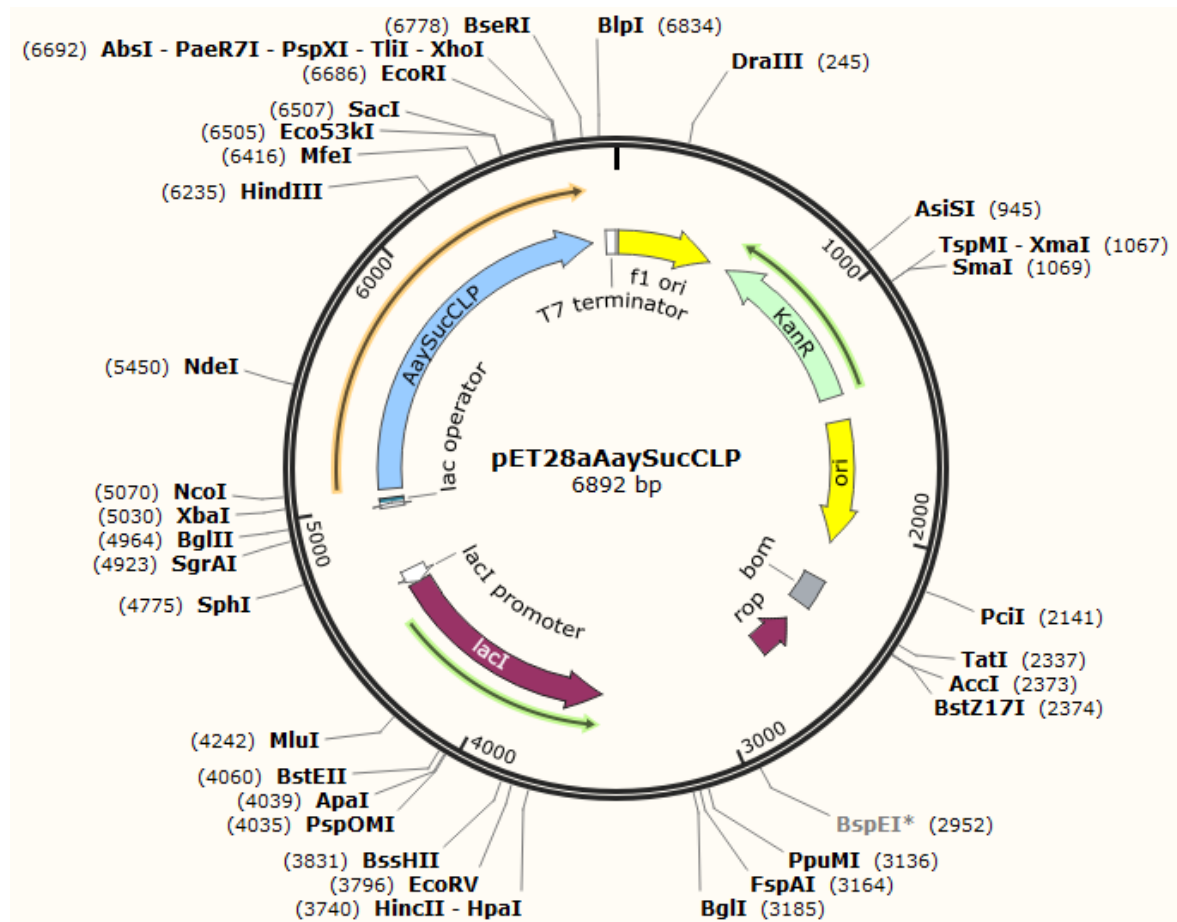
ATGGAACGGACATGGTGGAAAGAAGCCGTCGTATATCAAGTGTATTGGCGCAGCTTTTTTGA CTCA
AATGGTGATGGGTATGGCGATTTAGAAAGGGCTTATTCAAAACTCGATTACATTCGTGACTTAGGG
GTGGATGTCATTTGGCTGAATCCGTGCTATGAGTCGCCTGATAAAGATAACGGATACGACATTTCT
GATTACTATCGCATCATGGATAAAGCAGGGGATATGGAGACGTTTGACCGCTTGCTGAACGAGGTG
CATAAACGTGGAATGAAATTAATTATGGACCTTGTCGTGAACCATAACATCTGATCAACATCCTTGG
TTTATTGAATCTCGTTCGTCAAAAGACAATCCGAAACGCGATTGGTACATATGGCGCGACAAACCG
AATAACTGGCGCTCGTACTTTACTCCATCCGCATGGGAATATGATGAAAAACAGGACAGTATTAT
TTCCATTCGTTTGCGGTAGAACAGCCAGATTTGAACTGGGAAAACGAAGAAGTTCGTGAAGAAATT
TATAAAATGATGCGTTTTTGGTTAGATAAAGGGATCGATGGGTTCCGTTTAGATGCGATTGCCTTA
CTAGCCAAACCTGAAGGATTCCCAGATGCCGAAAACCCGTATGACATTCGTTATTTAACAAACAAT
CCAGGCGTGCATGATTATTTACAAGAAATGCACGAAAAAGTATTAAAAACATTATGATATTTTCACC
GTCGGAGAAGTCGCTTTTCGTATCGCCAGAGGAAGGATTAAAATATGTCGGAGAAGACCGAAACGAA
CTACATACTTTGTTCCACTTTGAAGTGTGCGACGAAATGCCGACATGGGATCCGATTCGTTTTAAA
CAAATTCAAAAACGTTGGTACGAAGGATTGTGGGGCAAAGGGTGGAACCTCGCAGTTTTTTAAACAAT
CACGACCATACGCGACAAGTGACGCGCTACGGAAACGATAAACAGTTCCGCGTCGAATCAGCAAAA
TTGCTCGCTACGCTCGTGCATACGTTGCCTGGGACACCGTACATTTATCAAGGTGAAGAAATTGGC
ATGACTGGCGTCAAGTTCGACACGATCGAAGACTATAACGACATTGCGATGAAAAATAAATATGCA
GAAGAAGTCGAAAAGGTGCGATCCGAAAGAAGTGCTTGAAAGCTTGCGAGCTACTGAGCCGAGAT
AACTCGCGTACACCAATGCAGTGGGATGATAGCGAACATGCTGGATTTACAACAGGAACACCTTGG
CTAAAAGTGAATCCGAACATAAAGAAATCAATGTAAAACAAGCGTTAGCGGATCCGAACCTCTGTA
TATTATTACTATAAAAAGCTCATTCAATTGCGCAAGCAACATGCCGTTATGGTGTACGGAACGTTT
CGCGATTTTTTCGGAACATGATCCGTACATTTACGCCTACACACGCGAGCTCGATGGCGTTTCGTTGG
CTCATCGTCTTAAACCATTGCGACAACGACAACGTATATGAGTTGCCAGAAGAGCTTGCTTCGGCT
CACCGCCATCTTTTGCTCGGCAATTATACAGATGTAAAAGAAGAAGGTACAACGCTTTATATGCGT
CCGCACGAAGCAAGAATGTATGCATTACAAGAAATTCCTCGAGGGCCTCGCCGATCCGCCCAGTCCG
ACGCCCCGCGACCGACGGCAGCCTGAACGTGCGCAGTCTCCAAGAGGAGCGACGACTCATGA

1704 nt

C-teminalinde *Jiangella aurantiaca* 8K307 kaynaklı Dyp'ye ait kargo yükleyici peptiti (CLP) bulunduran, *Anoxybacillus ayderensis* A9'e ait oligo-1,6- α -glukosidazın amino asit dizisi aşağıda verilmiştir.

MERTWWKEAVVYQVYWRSFFDSNGDGYGDLEGLIQKLDYIRDLGVDVIWLNPCYESPDKDNGYDIS
 DYYRIMDKAGDMETFDRLNEVHKRGMKLIMDLVVNHTSDQHPWFIESRSSKDNPKRDWYIWRDKP
 NNWRSYFTPSAWEYDEKTGQYYFHSAVEQPDNLWENEEVREEIYKMMRFWLDKGIDGFRDLDAIAL
 LAKPEGFPDAENPYDIRYLTNNPGVHDYDLQEMHEKVLKHYDIFTVGEVAFVSPEEGLKYVGEDRNE
 LHTLFHFVEVCDMPYDPIRFRKQIQRWYEGWLGKGNWSQFLNNHDHTRQVTRYGNDKQFRVESAK
 LLATLVHTLPGTPYIYQGEEIGMTGVKFDTIEDYNDIAMKNKYAEVAKGRDPKEVLESLLQLLSRD
 NSRTPMQWDDSEHAGFTTGTPLKVNPNYKEINVQALADPNSVYYYYKKLIQLRKQHAVMVYGT
 RDFSEHDPYIYAYTRELDGVRWLIVLNHCNDNDVYELPEELASAHRLLLGNYTDVKEEGTTLYMR
 PHEARMYALQEFLEGLADPPSPPTPATDGSINVGSLQEERLM

570 amino acid



ÖZGEÇMİŞ

2008-2013 yılları arasında, KTÜ, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimi aldı. 2013-2016 yılları arasında, KTÜ, Biyoloji Bölümü'nde, Moleküler Biyoloji laboratuvarında, Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında, TÜBİTAK-TBAG 113Z741 Projesi kapsamında "Lakkazın kızılcım kraft ve atık kağıt hamuru üzerindeki etkilerinin araştırılması" başlıklı tez ile yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı sene KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsünde Doktora programına başladı. 2022'de, 9 aylık OeAD, Ernst Mach Grant – worldwide bursu kazanarak Viyana Üniversitesi, Biyokimya Enstitüsünde "hTFF2'nın ekspresyonu ve izotopik işaretlenmesi" üzerine çalışmalar yaptı. 9 aylık sürenin ardından, Viyana Üniversitesi, Biyokimya Enstitüsü desteği ile bilimsel araştırmacı olarak, 3 ay daha "Gut peptides" adlı projede yer aldı.

Yayınlar

1. Khan, S. I., **Sahinkaya, M.**, Colak, D. N., Zada, N. S., Uzuner, U., Belduz, A. O., ve Shah, A. A. (2024). Production and characterization of novel thermostable CotA-laccase from *Bacillus altitudinis* SL7 and its application for lignin degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 172, 110329. (SCI) [doi: 10.1016/j.enzmictec.2023.110329](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110329)
2. Khan S. I., Zada N. S., **Sahinkaya M.**, Colak D. N., Ahmed S., Hasan F., Belduz A. O., Canakci S., Khan S., Badshah M., ve Shah A. A. (2021). Cloning, expression and biochemical characterization of lignin-degrading DyP-type peroxidase from *Bacillus* sp. Strain BL5. *Enzyme and Microbial Technology*, 151, 109917 (SCI) doi:[10.1016/j.enzmictec.2021.109917](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109917)
3. Zada N. S., Belduz A. O., Guler H. I., **Sahinkaya M.**, Khan S. I., Saba M., Inan B. K., Kara Y., Kolayli S., ve Khan S. (2021). Cloning, Biochemical characterization and molecular docking of Novel thermostable β -glucosidase BglA9 from *Anoxybacillus ayderensis* A9 and its application in de-glycosylation of Polydatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193:1898-1909, (SCI-Exp) [doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.021](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.021)
4. Zada N. S., Belduz A. O., Guler H. I., Khan A., **Sahinkaya M.**, Kaciran A., Ay H., Badshah M., Shah A. A., ve Khan S. (2021). Cloning, expression, biochemical characterization, and molecular docking studies of a novel glucose tolerant β -

glucosidase from *Saccharomonospora* sp. NB11. Enzyme and Microbial Technology 148 (2021) 109799. (SCI) doi:[10.1016/j.enzmictec.2021.109799](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109799)

5. **Sahinkaya M.**, Colak D. N., Ozer A., Canakci S., Deniz I., Belduz A. O. (2019). Cloning, characterization and paper pulp applications of a newly isolated DyP type peroxidase from *Rhodococcus* sp. T1. Molecular Biology Reports. 2019;46:569-580 (SCI) <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4509-9>

Bildiriler

1. **Şahinkaya M.**, ve Beldüz A.O. (2023). Enkapsülün Mucizesi. VII. Uluslararası Bilimler Işığında Yaratılış Kongresi. 19-21 Ekim, Bitlis/Türkiye. *Sözlü*
2. Beldüz A.O., **Şahinkaya M.**, ve Şal F. A.. (2023). *Jiangella aurantiaca*'ya ait Peroksidaz(Dyp)-Enkapsülün Sisteminin Karakterizasyonu. 22. Uluslararası Biyoteknoloji Kongresi. 20-22 Ekim, Ankara/Türkiye. *Sözlü*
3. Belduz A.O., Sal F. A., Guler H. I., Yildiz O., Kolaylı S., **Sahinkaya M.**, Demircan O., and Pektas S. (2023). Identification and Characterization pf Inhibitors from Propolis Extracts Againts HIV-1 Reverse Transcriptase. I. Uluslararası Apiterapi ve Doğa Kongresi (IANCO23), 1-3 Haziran. Nahçıvan/Azerbeycan. *Poster*
4. Benammar L., Belduz A. O., Inan B. K., Menasria T., **Sahinkaya M.**, Canakci S., Bedaida I., ve Ayachi A. (2019) Biodiversity of thermophilic bacteria from Algerian hot springs. Eurasian Congress on Molecular Biotechnology (ECOMB), pp.114. September 19-21, Trabzon/Turkey. *Poster*.
5. Colak D.N., Ozer, A., Kacagan M., **Sahinkaya M.**, Belduz A.O., and Canakci S. (2019) Screening of Lignin Degrading Bacteria Derived from Factory Wastewaters. 4th International Conference on Civil and Environmental Geology and Mining Engineeering, pp. 955. April 20-22, Trabzon/Turkey. *Poster*
6. Benammar, L., Ayachi, A., Belduz A.O., Inan B. K., Guler H.I., Colak D.N., **Sahinkaya M.**, and Canakci S. (2018). Biocatalytic Potential of Thermophilic Bacteria Isolated From Algerian Hot Springs. 2nd International UNIDOKAP Black Sea Symposium on Biodiversity. November 28-30. Samsun/Turkey. *Oral&Poster*
7. Kacagan M., Colak D. N., **Sahinkaya Miray**, Belduz A. O., ve Canakci S. (2018). *Salmo trutta* Sindirim Sistemi Mikrobiyal Florasının Proteaz ve Ksilanaz Üretimi Yönünden Taranması. 24. Ulusal Biyoloji Kongresi, pp.41. 10-14 Eylül, Manisa/Türkiye. *Sözlü*

9. Colak D. N., **Sahinkaya M.**, Belduz A. O., Ozer A., ve Canakci S. (2017). Cloning, Characterization and Paper Treatment of a New Lignin Peroxidase Derived From *Acinetobacter calcoaceticus*. Biotechnology Congress, Biotechnology 256S:S17–S43. May 25-27, Dubrovnik/Croatia. *Oral*.
10. Colak D.N., **Sahinkaya M.**, Ozer A., Canakci S., ve Belduz A.O. (2015). Isolation and Determination of lignin degrading bacteria from Soil samples collected from different areas of Trabzon. Microbial Diversity: The Challenge of Complexity, pp. 295-296. October 27-29. Perugia/Italy. *Poster*
11. Colak D.N., **Sahinkaya M.**, Guler H.I, Canakci S., Belduz A.O. Erturac., M. K., ve Erturac., H.O. (2014). Artvin Murgul Bakır Madeninden İzole Edilen *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 Suşu Yaban ve Mutant Demir Okdisaz Genlerinin Klonlanması ve Ekspresyonu. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, pp 1264. 23-27 Haziran, Eskişehir/ Türkiye. *Poster*
12. Colak D.N., **Sahinkaya M.**, Guler H.I, Canakci S., ve Belduz A.O. (2014). Cloning, Expression and Characterizations of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* M1 Wild Type and Mutant Iron Oxidases. 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress 2014, pp. 110. June 2-6, Sarajevo/Bosnia&Herzegovina. *Poster*

Projeler

VIENNA UNIVERSITY, The Institute of Biological Chemistry, Recombinant protein expression of human TFF2, (Yurt Dışı), 01 Ekim- 31 Ocak 2023.

1. TÜBİTAK 120Z860. Beldüz A.O. (Yürütücü). **Sahinkaya M. (Bursiyer)**. *Jiangella aurantiaca* 8K307 Peroksidaz (Dyp)-Enkapsülin Sisteminin Karakterizasyonu ve Sistemin Enzim İmmobilizasyon Potansiyelinin Kargo Proteinini Olarak Sukraz Kullanılarak Araştırılması. 01.02.2021-02.06.2022 54.000,00 TL
2. TÜBİTAK KBAG 117Z932. Beldüz A.O. (Yürütücü), Güler H.İ., Kolaylı S., Yıldız O., Pektaş S. (RTEÜ), Alemdaroğlu E. (Bursiyer), Demircan O. (Bursiyer), **Sahinkaya M. (Bursiyer)**, Özer A. (Doktora Sonrası Bursiyer), ŞAL a. F. (Doktora Sonrası Bursiyer). Propolis Ekstraktlarından HIV-1-Revers Transkriptaz İnhibitörlerinin Tanımlanması ve Karakterizasyonu' 01.06.2018-01.10.2021 514.830 TL
1. (KTÜ-BAP FBA-2015-5182, Temel Araştırma Projesi:BAP01. **Sahinkaya M. (Araştırmacı)**, Özer A., Çolak D. N., Deniz İ., Beldüz A.O. Lignin Peroksidaz Üreticisi *Rhodococcus* sp. İzolasyonu, Lignin Peroksidazının Klonlanması, Karakterizasyonu ve Kağıt Hamuru Ağartılmasında Verimliliğinin Araştırılması. 03.04.2015-08.08.2017 49.999,99 TL

1. TÜBİTAK KBAG 113Z741. Çananakçı S. (Yürütücü), Deniz İ. (Araştırmacı), Özer A. (Bursiyer), Tuncel M. (Bursiyer), **Şahinkaya M. (Bursiyer)**, Beldüz A. O. (Danışman), Bakteriyel Kaynaklı Lignilolitik Üç Enzimin *E. coli*'de Eş Zamanlı veya Füzyon Olarak Üretimi ve Kağıt Hamurunun Ağartılmasında Kullanımlarının Optimizasyonu.
15.03.2014- 15.03.2018 (24 ay) 342.292,00 TL

Ödüller

OeAD, Uluslararası, Ernst Mach Grant- worldwide, araştırma bursu, AVUSTURYA, 01 Şubat 2022-31 Eylül 2022.

