

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SALDA GÖLÜNDEN İZOLE EDİLEN ALKALİFİLİK BAKTERİ
SUŞLARININ SİKLODEKSTRİN GLUKOZİLTRANSFERAZ (SGT_{az}) ENZİMİ
ÜRETME YETENEKLERİ VE SGT_{az} GENİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Eda KABACAOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2013

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SALDA GÖLÜNDEN İZOLE EDİLEN ALKALİFİLİK BAKTERİ
SUŞLARININ SİKLODEKSTRİN GLUKOZİLTRANSFERAZ (SGT_{az}) ENZİMİ
ÜRETME YETENEKLERİ VE SGT_{az} GENİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Eda KABACAOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 2011.01.0102.008 nolu proje ile desteklenmiştir.**

2013

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SALDA GÖLÜNDEN İZOLE EDİLEN ALKALİFİLİK BAKTERİ
SUŞLARININ SİKLODEKSTRİN GLUKOZİLTRANSFERAZ (SGT_{az}) ENZİMİ
ÜRETME YETENEKLERİ VE SGT_{az} GENİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Eda KABACAOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 21/01/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ:

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ (Danışman) _____

Doç. Dr. Mehmet İNAN _____

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN _____

ÖZET

SALDA GÖLÜNDEN İZOLE EDİLEN ALKALİFİLİK BAKTERİ SUŞLARININ SİKLODEKSTRİN GLUKOZİLTRANSFERAZ (SGTaz) ENZİMİ ÜRETME YETENEKLERİ VE SGTaz GENİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Eda KABACAOĞLU

Yüksek lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ

Ocak 2013, 108 Sayfa

Siklodekstrin glikozil transferaz (SGTaz) enzimi siklodekstrinlerin endüstriyel üretimi amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca SGTaz'ın katalitik fonksiyonu bazı gıda katkı maddelerinin modifikasyonunda değerlendirilmektedir. Bu çalışma ile Türkiye'de bulunan sodalı göllerden SGTaz üretebilen suşların izolasyonu, ilgili genin izolasyonu, *Pichia pastoris* mayasına klonlanmasıyla rekombinant üretimi ve saflaştırılan enzimin karakterize edilmesi hedeflenmiştir.

Öncelikle Salda ve Van göllerinden SGTaz üretme kapasitesine sahip yeni alkalifik bakteri suşları izole edilmiştir ve bunlar SG2, SG3, V3, SD5 şeklinde kodlanmıştır. İzolatların Gram(+) bakteriler olduğu ve 16S rDNA dizi analizi bakterilerin *Bacillus* cinsinden ve veri tabanlarında yer alan organizmalardan farklı olduğunu göstermiştir. İzolatlar arasından seçilen SD5 suşundan SGTaz enzimini kodlayan gen izole edilerek *P. pastoris* mayasına aktarılmıştır. SGTaz enzimini kodlayan gen bölgesini çoğaltmak ve/veya modifiye etmek üzere farklı primer çiftleri ile 3 farklı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA parçalarının gen dizisi belirlenmiş, metanol tetiklemeli protein üretimini ve proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan pPICZαA vektörü ile *Pichia pastoris* X33 konukçu suşuna aktarılmıştır. Böylece (doğal gen dizisini içeren) N2, (gene ilave c-myc epitope ve polihistidin kuyruğu kodlayan) S3, ve (gen ve polihistidin kuyruğu kodlayan) M5 şeklinde kodlanan üç farklı rekombinant maya elde edilmiştir. Geliştirilen 3 maya

suşuyla fermantasyon gerçekleştirilerek kültür sıvılarında SGTaz aktiviteleri izlenmiştir. Salgılanan rekombinant enzimlerin moleküler ağırlıklarının ~85kDa olduğu belirlenmiştir. M5 suşuyla üretilen polihistidin etiketli SGTaz enzimi afinite kromatografisiyle saflaştırılmış ve optimum aktiviteyi 50 °C’de ve pH 6’da sergilediği ve γ - β -siklodekstrin üreticisi olduğu belirlenmiştir. Enzimin, ısı ve pH kararlılığı araştırılmış ve aktivitesini 30 dk süreyle 30-50°C, %100, pH 9’da %99,4 oranında koruduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Alkalifilik *Bacillus*, *Bacillus oshimensis*, Siklodekstrin glukano transferaz, moleküler klonlama, *Pichia pastoris*

JÜRİ:

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ (Danışman)

Doç. Dr. Mehmet İNAN

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ABSTRACT

STUDIES ON THE CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE (CGTase) PRODUCTION CAPACITY OF ALKALIPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM SALDA LAKE and ON THE CGTase GENE

Eda KABACAOĞLU

M.Sc. in Food Engineering

Adviser: Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ

January 2013, 108 Pages

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) enzyme is used industrially to obtain cyclodextrins. Also, this enzyme has a catalytic function which is utilized in the modification of some food additives. This study aims to isolate potential bacterial strains from the soda lakes in Turkey, amplification of the respective gene, cloning into *Pichia pastoris* for recombinant production and characterization of the enzyme.

Four novel CGTase producing alkalophilic bacteria were isolated from lakes Salda and Van and coded SG2, SG3, V3, SD5. The isolates were Gram(+) rods and 16S rDNA sequencing revealed these were novel *Bacillus* strains. The gene encoding for CGTase was amplified using the DNA of the SD5 strain and cloned into the yeast *P. pastoris*. PCR was conducted separately with three different sets of primers in order to amplify and/or modify the gene sequence. The fragments obtained were sequenced and cloned into *P.pastoris* X33 host strain using the pPICZαA vector allowing for methanol induced expression and extracellular secretion of the protein. Thus, three recombinant strains were obtained; N2 (with natural gene sequence), S3 (also encoding the c-myc epitope and polyhistidine tail) and M5 (encoding the polyhistidine tail). Extracellular CGTase activity was monitored throughout fermentation for each strain. The molecular weight of the enzymes were ~85 kDa. The CGTase enzyme obtained from the M5 strain was purified and displayed optimum activity at 50 °C and pH 6, producing γ - β -

cyclodextrin. Investigation of the thermal and pH stability of showed that the enzyme retained about 100% activity after 30 minutes at 30-50 °C and pH 9.

KEY WORDS: Alkaliphilic *Bacillus*, *Bacillus oshimensis*, Cyclodextrin
glukanotransferase, molecular cloning, *Pichia pastoris*

COMMITTEE:

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ (Supervisor)

Doç. Dr. Mehmet İNAN

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ÖNSÖZ

Yerel kaynaklardan biyoteknolojik üretim kapasitesini geliştirmek ulusal önceliklerimizden biridir. Bu bağlamda kıymetli kimyasalların eldesinde kullanılan siklodekstrin glukozil transferaz enziminin yerel kaynaklardan elde edilmesi ve moleküler biyoleji teknikleri uygulanarak sanayiye uyarlanabilecek şekilde üretimi bu çalışmanın temel hedefi olmuştur. Üretilen rekombinant enzim karakterize edilerek potansiyel uygulama alanlarına yönelik bilgiler elde edilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışması süresince öncelikle bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren ve destekteğini hiç esirgemeyen hocamlarım Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ, Doç. Dr. Mehmet İNAN ve Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e gösterdikleri emek ve sabır için çok teşekkür ederim. Bu çalışmanın bir kısmını Helsinki Üniversitesinde gerçekleştirme olanağını veren ve çalışmalarına sağladığı katkılardan dolayı sayın hocam Prof. Dr. Per Saris'e ayrıca teşekkür ederim. Son olarak desteğini ve yardımını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Fidan ERDEN, Mert KARAOĞLAN ve Semiramis GEREDELİ'ye ve maddi, manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili babam Enver, annem Ayşe ve kardeşim Derya KABACAOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	3
2.1. Mikroorganizma	3
2.1.1. Alkali Ortamlar, Alkalifilik Mikroorganizmalar ve Enzimler	3
2.1.2. <i>Bacillus</i> cinsi ve sınıflandırılması	5
2.1.3. Konukçu Suş Olarak <i>Pichia Pastoris</i>	6
2.2. Siklodekstrin Glukanotransferaz (SGTaz) Enzimi	7
2.2.1. SGTaz’ların özellikleri ve kaynakları	7
2.2.2. SGTazların katalizlediği reaksiyonlar	9
2.2.3. SGTaz geninin klonlanması ve SGTaz enzimi üretimi	10
2.3. Siklodekstrinler.....	11
2.3.1. Siklodekstrinlerin özellikleri	11
2.3.2. Siklodekstrinlerin uygulamaları	13
3. MATERYAL ve METOT	17
3.1. Bakteriyel Suşlar ve izolasyonları	17
3.2. Konukçu Suşlar ve Taşıyıcı Plazmidler	18
3.3. Kimyasallar ve restriksiyon enzimleri.....	20
3.4. Besiyerleri.....	20
3.4.1. Horikoshi sıvı ve katı besiyeri.....	20
3.4.2. Luria-bertani sıvı ve katı besiyerleri	20
3.4.3. YPD sıvı ve katı besiyerleri	21
3.4.4. Nişastalı MM katı besiyeri	21

3.4.5. BMMY BMGY sıvı besiyerleri	22
3.4.6. Gliserollü Stokların Hazırlanması	22
3.5. Hücre Yoğunluğunun Belirlenmesi	22
3.6. Genel DNA Teknikleri	23
3.6.1. DNA izolasyonu	23
3.6.2. Agaroz jel hazırlanışı	24
3.6.3. DNA Miktarının Tayini.....	24
3.6.4. PZR.....	25
3.6.5. Plazmid DNA İzolasyonu.....	26
3.6.6. DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarınca Sindirilmesi	26
3.6.7. DNA Ligasyonu ve Defosforilasyonu	27
3.6.8. Primerlerin Sentezlenmesi ve Dizi Analizi	27
3.6.9. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması.....	28
3.6.10. E. coli XL-1 Blue and Pichia pastoris X33 Hücrelerine Transformasyon.....	29
3.6.11. Transformantların Görüntülenmesi	30
3.6.12. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	30
3.6.13. SDS-PAGE ve Western blot Analizi.....	30
3.7. Diğer Biyokimyasal Analizler	32
3.7.1. SGTaz aktivitesinin tayini	32
3.7.2. Protein miktar analizi	33
3.8. SGTaz Geni İzolasyon Çalışmaları	34
3.8.1. SGTaz geni bölgesinin PCR yolu ile çoğaltılması	34
3.8.2. PCR ürünlerinin <i>E.coli</i> 'de klonlarak çoğaltılması ve dizi analizi	34
3.8.3. SGTaz geninin pichia pastoris'e aktarımı	35
3.8.4. <i>Pichia pastoris</i> 'de ekspresyon	36
3.9. SGTaz enziminin karakterizasyonu.....	37
3.9.1. Polihistidin etiketli SGTaz enziminin üretilmesi ve Saflaştırılması ..	37
3.9.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkisi	38
3.9.3. pH'nın enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkisi.....	38
3.10. HPLC analizi ile hidroliz ürünlerinin belirlenmesi	39
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	40

4.1. İzolasyon çalışmaları	40
4.1.1. Bakterilerin İzolasyonu ve SGTaz Üretme Potansiyellerinin Kontrolü.....	40
4.1.2. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının SGTaz Enzimi Salgılama Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	42
4.2. Klonlama Çalışmaları	47
4.2.1. DNA izolasyonu	47
4.2.2. 16S rDNA dizi analizi değerlendirmesi	48
4.2.3. <i>Bacillus</i> sp. SD5 SGTaz geninin PCR yolu amplifikasyonu	51
4.2.4. PZR yoluyla çoğaltılan <i>Bacillus</i> sp. SD5 SGTaz geninin klonlanması	52
4.2.5. <i>Bacillus</i> sp. SD5 SGTaz genine ait nükleotid dizisi.....	53
4.2.6. SGTaz Geninin Farklı Primerlerle Çoğaltılması, Ürünlerin pPICZαA Vektörüne Bağlanması ve Vektörün Kontrolü	56
4.2.7. Konukçu <i>Pichia pastorise</i> 'e transformasyonu ve rekombinant klonların eldesi	61
4.2.8. Klonların SGTaz salgılama yeteneklerinin belirlenmesi	63
4.3. SGTaz enziminin karakterizasyonu.....	66
4.3.1. Rekombinant SGTaz enziminin saflaştırılması.....	67
4.3.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkileri	69
4.3.3. pH'nın enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkileri	72
4.3.4. HPLC analizi	75
5. SONUÇ	79
6. KAYNAKLAR	81
7. EKLER.....	88
Ek. 7.1. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları	88
Ek. 7.2. Çalışmada kullanılan primerler	90
Ek. 7.3. Toplam Protein Tayini Kalibrasyon Eğrisi	91
Ek. 7.4. HPLC için oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve verileri.....	92
Ek. 7.5. Enzim Aktivitesi Tablosu.....	95
Ek. 7.6. 16S rDNA Spacer Bölgesine Ait Bazı Özellikler ve Nükleotid Dizisi.....	96
Ek. 7.7. Filogenetik Değerlendirme Sonucu	98

Ek. 7.8. SGTaz Geni Filogenetik Değerlendirme Sonucu.....	99
Ek. 7.9. SGTaz Geni Dizisinin NCBI Veritabanında Diğer Suşlara Ait Gen Dizileriyle Karşılaştırılması	100
Ek. 7.10. Salt Nişasta İçeren Bir Çözeltiye Ait Kromatogram.....	105
Ek. 7.11. HPLC Analizi Sonuçları	106
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Å	10^{-10} m
bç	Baz çifti
Bknz	Bakınız
dev/dk	rpm (Revolutions per minute)
dk	Dakika
EC.	Enzyme code
FU	Floreasans ünitesi
<i>g</i>	Göreceli santrifüj kuvveti (relative centrifugal force, rcf)
kbç	Kilo baz çifti
L	Litre
m	Mili (10^{-3})
M	Molar
n	Nano (10^{-9})
OD	Optik yoğunluk (optical density)
Örn.	Örneğin
ppm	mg/L (milyonda bir)
sa	Saat
sn	Saniye
t	Süre (saat cinsinde)
Tm	Erime sıcaklığı (melting temperature)
U	Ünite
w/v	ağırlık/hacim (weight/volume)
X	kat-derişim
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro (10^{-6})

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADI	Günlük kabul edilebilir alım miktarı (Acceptable Daily Intake)
Amp	Ampisilin
BMGY	Tamponlanmış karmaşık gliserol besiyeri (Buffered Glycerol Complex Medium)
BMMY	Tamponlanmış karmaşık metanol besiyeri (Buffered Methanol Complex Medium)
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
FAO	Birleşmiş Milletler gıda ve tarım örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FDA	ABD Gıda ve ilaç Dairesi (Food and Drug Administration)
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Regarded as Safe)
JECFA	Gıda katkı maddeleri uzman komitesi ortaklığı (Joint Expert Committee On Food Additives)
LB	Luria-Bertani
MA	Molekül ağırlığı
MBS	Maltoz Bağlama Alanlarından (Maltoz Bindin Sites)
MM	Temel metanol (Minimal Methanol)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Tuzlu fosfat tamponu, (Phosphate- Buffered Saline)
PZR	Polimeraz zincir tepkimesi (PCR-polymerase chain reaction)
RID	Refraktif İndeks Dedektörü
SD	Siklodekstrin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SGTaz	Siklodekstrin Glukanotransferaz, Siklodekstringlikoziltransferaz, Siklomaltodekstrin Glukanotransferaz, Siklomaltodekstrin Glikoziltransferaz
SSC	Tuzlu sodyum sitrat (Saline Sodium Citrate)
TAE	Tris-asetat-EDTA

TE	Tris-EDTA
WHO	Dünya sağlık örgütü (World Health Organization)
YNB	Maya azot kaynağı (Yeast Nitrogen Base Sulfate without Amino Acid)
YPD	Maya pepton dekstrozu (Yeast Peptone Dextrose)



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Bacillus circulans</i> 251 suşunun SGTaz enzimi yapısının çizimle gösterimi. A-E bölgeleri ve üç adet olan maltoz bağlama alanlarından (MBS) 1 ve 2 gösterilmektedir (van der Veen vd 2000a).....	8
Şekil 2.2. SGTaz enziminin kataliz ettiği reaksiyonların şematik sunumu. Siyah daireler glikoz residülerini beyazlar ise indirgen şeker uçlarını simgelemektedir. Reaksiyon (a), (b), (c), ve (d) sırasıyla halkasallaştırma, birleştirme, orantısızlaştırma ve hidroliz reaksiyonları (van der Veen vd 2000b).....	10
Şekil 2.3. α -, β -, γ -siklodekstrinlerin (SD) yapısı. Buradaki kafes benzeri boşlukta konukçu organik moleküller hapsedilir (van der Veen vd 2000a).....	12
Şekil 3.1. Küt uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pJET 1.2 plazmidi	19
Şekil 3.2. Protein ekspresyonu için kullanılan PPICZ α A plazmidi	19
Şekil 3.3. Siklodekstrin standart kurvesi	33
Şekil 4.1. a) Salda ve Van göllerinden alınan toprak ve su örnekleri. b) İzole edilen mikroorganizmaların petri plakalardaki görüntüsü	41
Şekil 4.2. a) SD5 izolatının fenolftaleyn indikatörlü HM agar plakası üzerindeki görüntüsü b-d) Sırasıyla SG2, SG3 ve V3 izolatlarının fenolftaleyn ve metil oranj indikatörlü HM agar plakaları üzerindeki görüntüsü.....	41
Şekil 4.3. a)SD5 b)SG2 c)SG3 d)V3 izolatlarının HM agar petri plakaların üzerinde meydana getirdiği koloni yapıları.....	41
Şekil 4.4. İzolatların mikroskop görüntüleri (1000X büyütme oranı); a) SD5 b) SG2 c) SG3 d) V3	42
Şekil 4.5. Göllerden elde edilen bakteri izolatlarının Horikoshi besiyerinde izlenen gelişimi.....	43
Şekil 4.6. Horikoshi besiyerinde geliştirilen bakteri izolatlarının hücre dışı SGTaz enzimi aktiviteleri.....	43
Şekil 4.7. SD5 suşunun zamana göre OD ve enzim aktivitesi değişim grafiği	44
Şekil 4.8. SG2 suşunun zamana göre OD ve enzim aktivitesi değişim grafiği	45
Şekil 4.9. SG3 suşunun zamana göre OD ve enzim aktivitesi değişim grafiği	46
Şekil 4.10. V3 suşunun zamana göre OD ve enzim aktivitesi değişim grafiği	46
Şekil 4.11. <i>Bacillus sp.</i> SD5 suşu genomik DNA agaroz jel görüntüsü.....	48
Şekil 4.12. SD5 suşunun diğer suşlar ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç	49
Şekil 4.13. SG2 suşunun diğer suşlar ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç	50
Şekil 4.14. SG3 suşunun diğer suşlar ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç	50
Şekil 4.15. V3 suşunun diğer suşlar ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç.....	51

Şekil 4.16. PZR ile elde edilen SGTaz geninin agaroz jel görüntüsü; a) saflaştırma öncesi farklı bağlanma sıcaklıkları ile elde edilen PZR ürünleri, b) PZR ürünleri saflaştırıldıktan sonra yürütülen jelin görüntüsü	52
Şekil 4.17. SGTaz geninin transforme edildiği <i>E. coli</i> DH5α hücrelerinden rastgele 10 adet seçilen kolonilerden izole edilen plazmidlerin BglII enzimi ile kesimi sonrasında yürütülmesi ile elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	53
Şekil 4.18. SGTaz gen dizisinin belirlenmesi ve kullanılan primerlerin şematik gösterimi.....	56
Şekil 4.19. Ekspresyon için tasarlanan primerler ve bazı özellikleri	58
Şekil 4.20. <i>P. pastoris</i> ’te ekspresyon için tasarlanan primerler ve PZR ile elde edilen SGTaz geni; a) N primerleri b) S primerleri c) M primerleri.....	58
Şekil 4.21. Sindirme reaksiyonları sonrasında transformasyonda kullanılacak gen parçalarının ve lineerize vektörlerin yürütüldüğü agaroz jel görüntüsü; a) S primerleri ürünü b) M primerleri ürünü c) ve d) sırasıyla S ve M primerleri ile elde edilen ürünlerin bağlanacağı doğrusallaştırılmış pPICZαA vektörleri.....	59
Şekil 4.22. Zeosinli LB Lennox agar üzerinde geliştirilen transformantlar	60
Şekil 4.23. Transformasyon işlemi sonrası seçilen kolonilerden izole edilen plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kontrolü	61
Şekil 4.24 a), b), c) sırasıyla lineer hale getirilmiş pPICZαA-N-2, pPICZαA-S-3, pPICZαA-M-5 plazmidleri. d), e), f) enzimle lineer hale getirilmemiş plazmidler.....	62
Şekil 4.25. Nişastalı MM katı besiyerinde <i>Pichia pastoris</i> transformantlarının oluşturduğu hidroliz aktivitesi.....	63
Şekil 4.26. SGTaz genini içeren <i>Pichia pastoris</i> klonlarının optik yoğunluk (OD) değerleri.....	64
Şekil 4.27. SGTaz genini içeren <i>Pichia pastoris</i> suşu klonlarının SGTaz enzimi üretimi	64
Şekil 4.28. SDS-PAGE analizi ve klonların 24. saat fermantasyon sıvılarında protein karşılaştırılması, M: protein standardı	65
Şekil 4.29. SGTaz genini içeren <i>Pichia pastoris</i> M5-1 suşu klonunun SGTaz enzimi üretimi ve OD değerleri	66
Şekil 4.30. SDS-PAGE analizi. M: protein standardı, 1: <i>Pichia pastoris</i> X33, 2: <i>Pichia pastoris</i> X33-EGFP, 3: <i>Pichia pastoris</i> M5-1, 4: Flow through, 5: Wash I, 6: Wash II, 7: Wash III, 8: Elüsyon I, 9: Elüsyon II, 10: Elüsyon III, 11,12: Amonyum sülfat ile daha önce kısmen saflaştırılmış örnekler 13: daha önce yapılan Histag purifikasyonundan elde edilen elüsyon	68
Şekil 4.31. Western blot analizi. M: protein standardı, 1: <i>Pichia pastoris</i> X33, 2: <i>Pichia pastoris</i> X33-EGFP, 3: <i>Pichia pastoris</i> M5-1, 4: Flow through, 5: Wash I, 6: Wash II, 7: Wash III, 8: Elüsyon I, 9: Elüsyon II, 10: Elüsyon III, 11,12: Amonyum sülfat ile daha önce kısmen saflaştırılmış örnekler 13: daha önce yapılan Histag purifikasyonundan elde edilen elüsyon	68

Şekil 4.32. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflastırılan SGTaz enzimin çeşitli sıcaklıklarda gösterdiği enzim aktivitesi ve bağıl aktivite değerleri.....	70
Şekil 4.33. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflastırılan SGTaz enziminin pH 6'de ve değişen sıcaklık koşullarında sergilediği enzim aktivitesi ve kalıntı aktivitesi değerleri.....	71
Şekil 4.34. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflastırılan SGTaz enziminin çeşitli pH'larda gösterdiği enzim aktivitesi ve bağıl aktivite değerleri.....	73
Şekil 4.35. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflastırılan SGTaz enziminin değişen pH koşullarında sergilediği enzim aktivitesi ve kalıntı aktivitesi değerleri.....	74
Şekil 4.36. Siklodekstrinleri 250 ppm konsantrasyonda içeren standarda ait kromatogram	76
Şekil 4.37. <i>Pichia pastoris</i> X33-M5-1 suşunun 10 dk'da üretmiş olduğu SD üretiminin HPLC analizi kromatogramı.....	78
Şekil 4.38. <i>Pichia pastoris</i> X33-M5-1 suşunun 24 saatte üretmiş olduğu SD üretiminin HPLC analizi kromatogramı.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Bacillus</i> türlerinden günümüze kadar izole edilen yabani tipteki veya rekombinant SGTaz genleri.	11
Çizelge 2.2. α -, β -, γ -siklodekstrinlerin özellikleri (Van der Veen 2000).	12
Çizelge 3.1. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları.....	26
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> sp. SD5 suşunun SGTaz geni bölgesi için belirlenen baz ve kodladığı aminoasit dizisi.	54
Çizelge 4.2. Rekombinant SGTaz enzimini kısmen saflaştırmak için uygulanan işlemlerden elde edilen bazı değerler.....	69
Çizelge 4.4. <i>Pichia pastoris</i> X33-M5-1 suşunun SD üretimi HPLC analizi sonucu.....	76

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Moleküler biyoloji ve mikrobiyoloji uygulamaları diğer birçok alanda olduğu gibi gıda sektöründe de önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bu uygulamalar günümüzde, biyoteknolojik gelişmelere ve gıda alanında hala devam etmekte olan çok yönlü birçok araştırmaya zemin hazırlayarak insanlığın gereksinimlerine hızla cevap verme olanağı sağlamaktadır. Mikrobiyoloji uygulamaları ile yeni kaynak mikroorganizmalar ekstrem çevre koşullarına sahip ortamlardan izole edilerek, farklı uygulamalardaki gereksinimlere göre çok yönlü olarak araştırılmaktadır. Bu mikroorganizmalar, farklı sektörlerde ihtiyaç duyulan özellik ve verimde ürünlerin veya işlem yardımcılarının elde edilmesi için kullanılarak, endüstriyel alanda çok önemli bir katkı sağlamaktadır. Ülkemizde bu alanda, özellikle araştırma potansiyeli, sektörde uygulanabilirliği, üretim hacmi ve verimi gibi bazı konularda sürdürülen çalışmalar devam etse de halen istenilen düzeye gelinebilmiştir. Bu çalışma ile yerel kaynaklardan izolasyon yapılmış ve çeşitli genetik teknikler uygulanarak üretim sektöründe değerlendirilebilecek yeni gen kaynağı organizmalar araştırılmıştır.

Siklodekstrin glokoziltransferaz (SGTaz) enzimi (EC 2.4.1.19) molekül içi transglikozilasyon reaksiyonlarını katalize ederek oluşturduğu α -(1,4) glikozidik bağlar yardımı ile halkalı yapıda oligosakaritleri sentezleyebilen endüstriyel öneme sahip bir enzimdir. Bu şekilde substrat olarak kullandığı nişasta moleküllerinden 6, 7 ve 8 glikoz birimli ve sırasıyla α -, β - ve γ - siklodektrin (SD) olarak adlandırılan moleküllerin oluşmasını sağlar. Siklodekstrinler gıda, kozmetik, çevre, tarım, eczacılık ve kimya gibi birçok endüstriyel alanda kullanılan katkı maddeleridir ve bunlara olan talep her geçen gün artmaktadır.

Bacillus macerans kaynaklı SGTaz enzimi 1965'te ticari olarak ilk kez kullanılmıştır. Ancak, daha sonra alkalifilik başka bir Bacillus izolatından elde edilen SGTaz üretiminin avantajlı olması (Horikoshi 1999), kaynak organizma olarak araştırmacıları alkalifilik organizmaları taramaya yönlendirmiştir. Mikrobiyolojik ve

biyoteknolojik alanlarda potansiyel olarak çok büyük faydalar sağlayan alkalifil organizmalar son yıllarda hücre dışı enzimleri bakımından ilgiyle araştırılan, hiper enzim üretimi için çok iyi bir gen kaynağı olan eşsiz organizmalardır (Horikoshi, 1999). SGTaz üreticisi kaynak suş arayışı, yapılan pek çok çalışma ile birçok ülkede halen sürdürölmektedir (Atanosova vd 2008; Puwei vd 2008; Mendoca vd 2004; Higuti vd 2003, Dobrevva vd 2000). Ülkemizde konu ile ilgili yapılmış olan bir çalışmada Avcı ve Dönmez (2009) petrol üretim alanından izole ettikleri yeni bir SGTaz üreticisi suşu (*Thermoanaerobacter kivui*) bazı biyokimyasal, morfolojik ve filogenetik özellikleri açısından karakterize ederek bu suşun optimum SGTaz üretim koşullarını araştırmıştır.

Bu çalışmada ülkemiz yerel alkali kaynaklarında olan, suyu sodalı Salda ve Van gölünden ekstrem koşullara adaptasyon sağlamış mikroorganizmlar izole edilmesi ve SGTaz üretme yetenekleri araştırılması amaçlanmıştır. Bu enzimi kodlayan gen, yüksek üretim oranı sağlayan ve enzimin saflaştırılması aşamasında avantaj sağlayabilmesi açısından yüksek potansiyele sahip olan metilotrofik bir maya hücresine aktarılmış ve karakterize edilmiştir. Bu araştırmanın ileride yapılacak diğer araştırmalara katkı sağlayabilmesini ve ülkemiz gıda sanayinin gelişimine ve rekabet gücüne katkı sağlamasını dilerim

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Mikroorganizma

2.1.1. Alkali Ortamlar, Alkalifilik Mikroorganizmalar ve Enzimler

Alkalifil terimi (alkali tolerant) mikroorganizmaların pH 9'un üzerindeki koşullarda optimum ya da çok iyi gelişim göstermesi demektir. Fakat bu mikroorganizmalar pH'nın 6,5 olduğu nötr değerlerde genel olarak gelişim göstermez ya da yavaş gelişim göstermektedirler. Alkalifilik mikroorganizmalar fizyolojik olarak alkalifiller ve halofiller olmak üzere başlıca iki gruba ayrılmaktadırlar. Alkalifiller pH 9 üzerinde gelişim gösterebilirlerken optimum gelişimleri pH 10 civarındadır. Halofiller ise pH 9 ve yüksek tuz konsantrasyonunun bulunduğu (%33 kg/L'e kadar NaCl) ortamlarda gelişim gösterebilmektedirler. Alkalifiller nötr ortamlardan izole edilebildikleri gibi bazen asidik toprak örneklerinden ya da gübreden de izole edilebilmektedirler. Halofiller ise soda gölleri gibi aşırı alkali ve tuzlu ortamlardan izole edilebilmektedirler (Horikoshi 1999).

Günümüze kadar birçok alkalifilik mikroorganizma çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir. Bunlar aerobik sporlu formlar, anaerobik sporlu formlar, halofiller, arkealarında içinde bulunduğu termofiller, psikrofiller, mezofiller gibi grupları içermektedirler. Özellikle bir çok alkalifilik *Bacillus* suşlarının toprak gibi makul ortamların yanı sıra derin deniz, alkali göller, yeraltı örnekleri gibi bazı ekstrem ortamlardan izole edildiği rapor edilmiştir (Horikoshi 2006).

Alkalifilik mikroorganizmaların endüstriyel uygulamaları üzerine yoğun araştırmalar yapılmıştır. Alkalın proteaz, amilaz, selüloz ve ksilinaz gibi bazı enzimler günümüzde endüstriyel ölçekte kullanılmaya başlanmıştır. Alkalifiller belirli ortamlarla başa çıkabilmek için genlerinde çok miktarda bilgi ve yetenek geliştirmiştir. Bu nedenle alkalifilik mikroorganizmaların genleri keşfedilmeyi bekleyen çok değerli bilgi kaynaklarıdır (Horikoshi 2006). Katalaz, siklodekstrin glukano transferaz (SGTaz), şitina z, lipaz, pektina z ve pullulanaz üretilen diğ er enzimlerdir (Horikoshi 1999).

Sodali göllerden izole edilen isolatlar ticari öneme sahip birçok hücre dışı enzim salgırlar, çünkü bu enzimler yüksek pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda işlev yeteneği gösterebilmektedirler. Özellikle çamaşır deterjanları, alkalifilik *Bacillus* suşlarından üretilen alkaline selüloz ve/veya alkalın proteaz gibi enzimler içermektedir. Aktivitelerini pH 8 ile pH 10,5 arasındaki alkalın çözeltielerde gösterebilme kabiliyetinde olan alkalifilik enzimlerin birtakım proseslerde kullanımı bazı avantajlar sağlamaktadırlar. Örnek olarak deterjan katkıları içinde uzun süre stabilitelelerini korumaları, yıkama sıcaklığının düşmesi nedeni ile enerji maliyetinden tasarruf sağlanması yanı sıra daha hızlı ve güvenilir bir ürün elde edilmesini sağlamalarından dolayı atık problemini azaltmaları bu enzimlerin seçilmesinin ana nedenleri arasında gösterilebilmektedir (Ulukanlı ve Diğrak 2002, Horikoshi 1999). Endüstriyel düzeyde siklodekstrin üretiminde alkalın SGTaz enzimi kullanımı üretim maliyetini azaltmakta ve siklodekstrinin gıda maddeleri kimyasallar ve ilaç sektöründe büyük miktarda kullanıldığı yeni pazarlar meydana getirmektedir (Horikoshi vd 2011).

Ülkemizde bulunan yerel alkalın ortamlardan biri olarak değeriendirilen Burdur'a bağlı Yeşilova ilçesinde bulunan Salda gölü, sodali ve Mg iyonlarınca zengin (pH 9'un üzerinde olan), yaklaşık 44 km² büyüklüğünde, derinliğin yer yer 185 metreye ulaştığı doğal sit alanında bulunan bir göldür (Braithwaite ve Velsel 1996). Özcan vd (2006) yaptıkları bir çalışmada Salda gölü de dahil olmak üzere toplam 6 gölden yaptıkları bir izolasyon çalışmasında halofil *Archea* türlerini izole ederek bunları biyolojik özellikleri bakımından karakterize etmişlerdir. Bir diğeri yerel kaynak olan Van Gölü ise, Bitlis ili sınırları içerisinde bulunan, yüzölçümü 3.570 km², maksimum derinliği 450 m, suları tuzlu ve sodali olan Türkiye'nin en büyük gölü, dünyanın ise 4. en büyük uç gölüdür. Ayrıca 9,7-9,8 pH ve %21,7 tuzluluk oranına sahip dünyadaki en büyük göldür. Tuzluluğa büyük oranda NaCl ve sodyum karbonat neden olmakla birlikte, suları az oranda sülfat, potasyum ve magnezyum, çok az oranda ise kalsiyum ihtiva etmektedir. Yapılan bir çalışmada Van Gölü suyu ve çevresindeki topraklardan izole edilen toplam 17 yerel alkalofilik *Bacillus* izolatu protein profillerine göre tanılanmış ve fenotipik özelliklerine göre tümünün Gram pozitif, aerobik, endospor oluşturan, hareketli ve fakültatif alkalofilik *Bacillus* cinsine ait türler olduğu belirlenmiştir (Berber ve Yenidünya 2005).

2.1.2. *Bacillus* cinsi ve sınıflandırılması

Bacillus cinsi 1935 yılında Christian Gottfried Ehrenberg tarafından çubuk şeklinde bakteriler olarak tanımlanmıştır. Ardından Ferdinand Cohn spor formlarını keşfetmiş ve Gram pozitif, çubuk şeklinde spor oluşturabilen bakteriler olarak değiştirmiştir (Madigan vd 2003).

Bacillus cinsi, firmicutes bölümünün üyesi olan Gram pozitif, çubuk şeklinde bakterilerdir. *Bacillus* türleri aerob ya da fakültatif anaerob olabilmekle birlikte katalaz enzimi için pozitifdir. *Bacillus* hücreleri stresli ortam şartlarında oval endosporlar üretme yeteneğinde olup uzun süre uykuda kalabilmektedirler. (Madigan vd 2003). Vejetatif hücreler tek ya da zincir şeklinde bulunabilmekle birlikte 0,5x1, 2 µm ile 2.5 x 10 µm çapındadır (Rosovitz vd 1998). Optimum gelişme sıcaklığı 25°C'ten 37 °C'ye değişmekle birlikte bazı termofilik türlerin 75 °C den yüksek ve bazı psikrotrofik türlerin 3 °C den daha düşük sıcaklıklarda da gelişebildiği bildirilmiştir (Sneath vd 1986).

Bacillus bakterisi toprakta, hayvan gübresinde ve bitkisel ürünlerde sıkça bulunabilmektedir. Bu cinsin birçok üyesi sağlığa zararsız olması, kolay izole edilebilme ve tanılanabilme, hızlı gelişme oranı ve kısa fermantasyon süresi gibi bazı sebeplerden dolayı dikkat çeken endüstriyel organizmalardır (Aygan 2008)

Alkalifilik *Bacillus* türlerinin yüksek pH'lara sahip alkaline ortamlara nasıl adapte olduğu halen araştırılmaktadır. Bu bakterilerin karakteristik özellikleri türe göre farklılıklar göstermektedir. Burada en önemli nokta alkalifilik bakterilerin taksonomik gruplarının ve filogenetik ilişkilerinin hesaplanmasıdır. Filogenetik analizler 16S rDNA gen dizisine göre yapılmakta olup türler filogenetik ağaç içinde üç ana grup altında toplanmaktadır (Yumato vd 2005).

2.1.3. Konukçu Suş Olarak *Pichia Pastoris*

Metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris* günümüzde heterolog proteinlerin ekspresyonunda çok yönlü ve en etkili sistemdir (Potvin vd 2010). *Pichia pastoris* üzerine ilk olarak 1970'lerde Philips Petroleum Company tarafından metanolün tek hücre proteini üretiminde kullanılması amacıyla çalışmıştır (Cregg vd 1987, Wagner 1983). *Pichia pastoris* AOX1 promotörü ile rekombinant protein üretiminde popüler ve geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu promotör, *Pichia pastoris* hücreleri glikoz yada gliserol üzerinde gelişim gösterirken baskılanmaktadır. Bununla birlikte eğer metanol ortamında gelişime bırakılırsa 1000 kata kadar güçlü bir şekilde indüklenebilmektedir. Yabancı protein salgılanmasının baskılanması yeteneği, hücre için toksik olması durumunda yararlı bir durumdur (Cereghino vd 2002). Yabancı bir genin *P. pastoris*'de ekspresyonu genel olarak genin ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi, vektörün *P. pastoris* genomuna entegrasyonu, ve elde edilen suşlarının yabancı ürün üretimi bakımından taranması olarak 3 aşamada gerçekleştirilir (Cereghino vd 2001).

Bu ekspresyon sisteminin kullanım nedenleri şu şekilde sıralanabilir: (1) uygulanan moleküler biyoloji teknikleri üzerinde çok geniş çalışılmış olan *Saccharomyces cerevisiae* ile aynı olması (2) yabancı proteinleri hücre dışı ya da hücre için olarak yüksek oranda ekspres etme yeteneğinde olması (3)Glikolizasyon, disülfid bağlarının oluşumu ve proteolitik prosesleri gibi bazı posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilme yeteneğinde olması (4) bir ekspresyon sistemi olarak ticari kit şeklinde bulunabilmesi (5) verimli ve sıkı bir şekilde denetlenebilen alkol oksidaz 1 (AOX1) promatörü karbon kaynağı olarak metanol kullanılması ile 1000 kat indüklenebilmektedir (6) yüksek hücre yoğunluğu (7) genlerin çoklu kopyalar halinde entegrasyonu sağlanarak kararlı yapıda trasformantlar meydana getirebilmesi (8) yüksek hücre yoğunluklu üretime uygun olup ölçek büyütmenin kolay olması (9) yüksek ölçekli üretimlerde gelişim sırasında fermantatif moddan ziyade solunumu tercih etmesidir (Cereghino ve Cregg 2000, Cereghino vd 2002, Demain 2005).

2.2. Siklodekstrin Glukanotransferaz (SGTaz) Enzimi

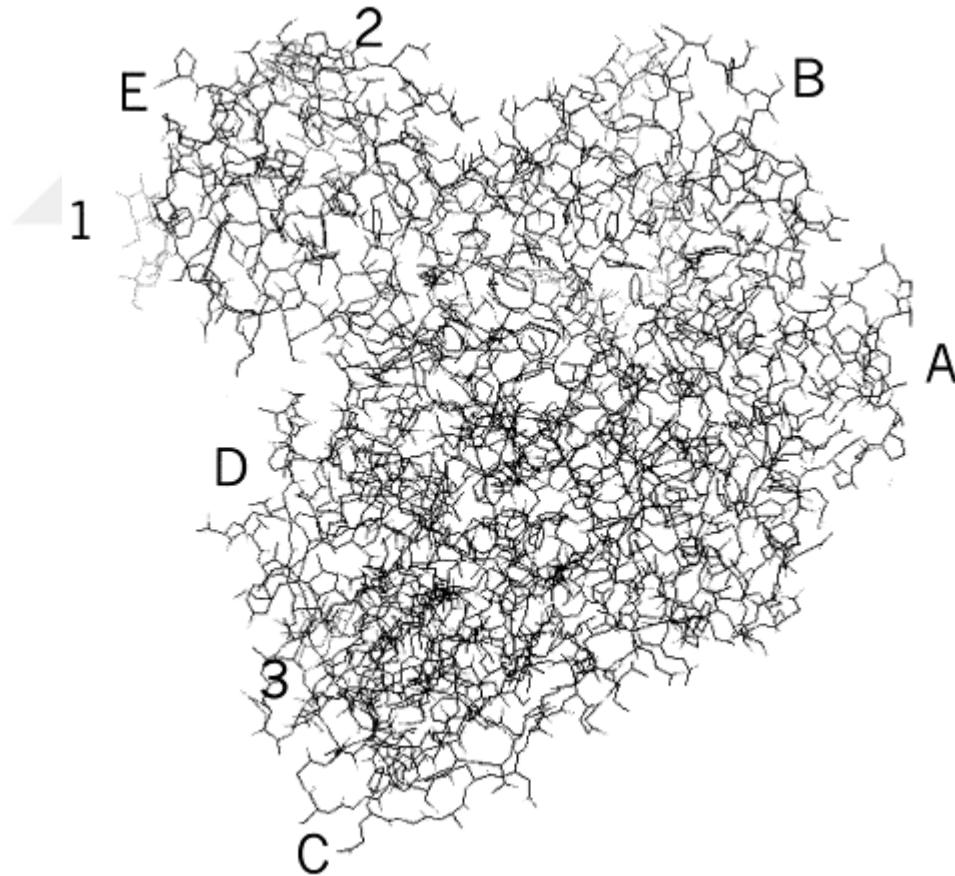
SGTaz hücre dışı bir enzimdir ve genellikle *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedirler (Endo vd 2002). Sistematik adı 1,4- α -D-glukan 4- α -D-(1,4- α -D-glukano)-transferaz olan SGtaz, siklodekstringlikoziltransferaz, siklomaltodekstrin glukanotransferaz ya da siklomaltodekstrin glikoziltransferaz olarakta isimlendirilmektedir. SGTaz transferaz grubu enzimlerin üyesi olan bir hekzoziltransferazdır (EC 2.4.1.19). SGTaz başlıca transglikozilasyon reaksiyonlarını katalize etmektedir. Bu enzimin asıl özelliği halkasal ürünler (siklodekstrin) meydana getirmesidir (Qi ve Zimmermann 2005).

2.2.1. SGTaz'ların özellikleri ve kaynakları

SGTaz alfa amilaz süper familyasına ait, nişasta moleküllerini α -1-4 bağlarından kesen ve glikozidik bağların sonundaki indirgen ve indirgen olmayan uçları bağlayarak dairesel moleküller üretebilen bir enzimdir (Bovetto vd 1992, Qui ve Zimmermann 2002). SGTaz enziminin moleküler ağırlığı 60-100 kDa arasında değişmekle birlikte yaklaşık 700 aminoasitten meydana gelmektedir (Bovetto vd 1992). Hafif asidik pH aralığı olan pH 4.5-7.0 değerlerinde aktivite gösterebilirken, alkalifilik SGTaz ın aktif olduğu optimum pH 9-10 değerleri arasındadır (Tao 1991). Birçok bakteriyel SGTaz maksimum 40-85 °C sıcaklık aralığında aktiftir. Genellikle Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Fe^{2+} iyonları tarafından kuvvetli biçimde inhibe edilir (Tonkova 1998).

Transglikolizasyon reaksiyonu SGTaz enziminin ana reaksiyonudur ancak nişastanın hidrolizasyonu reaksiyonlarında katalize etmektedirler. Nişastadan meydana getirdikleri halkasal ürünler yani siklodekstrinler (SD) α -, β -, γ -SD (SD6, SD7, SD8) olarak adlandırılmakta ve sırasıyla 6, 7, 8 glikozil ünitesi içermektedir. Buna bağlı olarak SGTazlar oluşturdukları ürüne göre içlerinde α -, β -, γ -SGTaz olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır (Qi ve Zimmermann 2005). Sonuç olarak SGTaz üreticisi mikroorganizmalarda ürettikleri başlıca SD tipine bağlı olarak α -SGTaz, β -SGTaz, γ -SGTaz üreticisi olarak sınıflandırılabilirler.

α -Amilazlar genellikle 3 yapısal bölge içerirler (A,B ve C), ancak SGTazlar bu bölgelere ek olarak C-terminusunda D ve E bölgelerini de içerirler (van der Veen vd 2000a). SGTazlarda bulunan bu bölgeler Şekil 2.1’de gösterilmektedir. A bölgesi $a(\beta/\alpha)_8$ fiçisi ya da TIM fiçisi formundadır ve tüm α -amilaz ailesi üyelerinde bulunur (Janecek 1994). Katalitik (amilolitik) ve substrat bağlama kısımları A bölgesi içinde β -dizisi-ipliklerinin (strands) C-termininde lokalize olmuşlardır ve ayrıca korunmuş kısımlardır (van der Veen 2000a). B ve C bölgeleri substrat bağlamadan ve katalitik bölgenin stabilitesinden sorumludur (Knegtel vd 1996, Penninga vd 1996). Neredeyse sadece SGTazlarda bulunan D bölgesinin fonksiyonu halen bilinmemektedir. Buna karşın E bölgesini inceleyen mutasyon çalışmaları bu bölgenin ham nişastayı bağlamada önemli olduğunu göstermiştir (Penninga vd 1996).



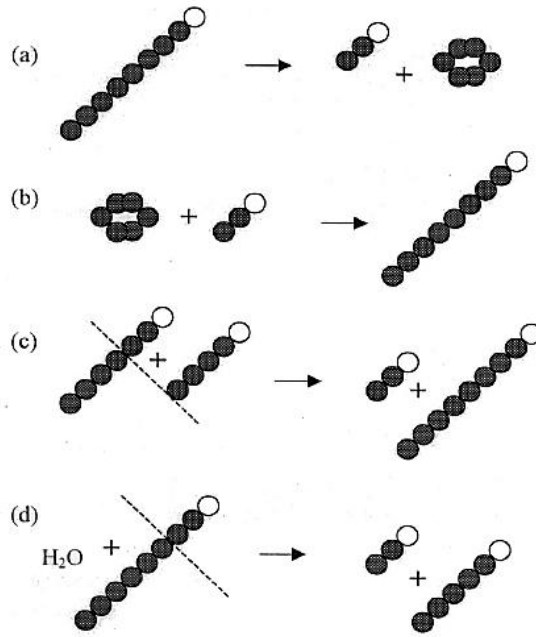
Şekil 2.1. *Bacillus circulans* 251 suşunun SGTaz enzimi yapısının çizimle gösterimi. A-E bölgeleri ve üç adet olan maltoz bağlama alanlarından (MBS) 1 ve 2 gösterilmektedir (van der Veen vd 2000a)

Bacillus macerans suşunun nişastadan SD ürettiğine ilişkin ilk rapordan beri birçok SGTaz enzimi *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. ohbensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. firmus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *M. varians*, *Clostridium* spp., *Thermoanaerobacter* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Anaerobranca gottschalkii* gibi bakterilerden saflaştırılmış ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Biwer vd 2002, Qi ve Zimmermann 2005).

2.2.2. SGTazların katalizlediği reaksiyonlar

SGTaz birbirinden farklı dört reaksiyon katalizlemektedir; bunlardan üçü transglükolizasyon reaksiyonları olarak bilinen disproporsiyonlaşma (orantısızlaştırma), siklizasyon (halkasallaştırma), kaplin (birleştirme) reaksiyonu ve diğeri hidroliz reaksiyonudur (van der Veen vd 2000a).

Orantısızlaştırma reaksiyonunda lineer maltooligasakkaritler sindirildikten sonra oluşan ürünler başka bir akseptör substrata transfer edilir. Halkasallaştırma reaksiyonu ise molekül içi transglükolizasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyonda maltooligasakkaritlerin indirgen olmayan uçları aynı oligosakkarit zincirinin indirgen ucuna transfer edilir. Siklodekstrinler bu reaksiyonla oluşmaktadır. Birleştirme reaksiyonu halkasallaştırma reaksiyonunun tam tersi reaksiyondur. Bu reaksiyonda siklodekstrin halkası açılır ve lineer oligosakkarit zincirine transfer edilir. Son olarak hidroliz reaksiyonları ise lineer oligosakkaritlerin suya transfer edildiği reaksiyonlardır, yani oluşan indirgen uç suya transfer edilmektedir (Davies vd 1997). Reaksiyonlar şematik olarak Şekil 2.2’de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. SGTaz enziminin kataliz ettiği reaksiyonların şematik sunumu. Siyah daireler glikoz residülerini beyazlar ise indirgen şeker uçlarını simgelemektedir. Reaksiyon (a), (b), (c), ve (d) sırasıyla halkasallaştırma, birleştirme, orantısızlaştırma ve hidroliz reaksiyonları (van der Veen vd 2000b).

2.2.3. SGTaz geninin klonlanması ve SGTaz enzimi üretimi

SGTaz siklodekstrin üretiminde kullanılan endüstriyel öneme sahip bir enzimdir. SGTaz endüstriyel seviyede birçoğu doğal tipte ya da genetik olarak modifiye edilmiş bakteriyel suşlardan üretilmektedir (Qi ve Zimmermann 2005).

SGTaz üretimini arttırmak için birkaç metot uygulanmaktadır. Yöntemlerden biri SGTaz üreten bakteriyel suşların yetiştirme koşullarının ve yetiştirme ortamının optimizasyonunu kapsamaktadır (Gawande ve Patker 1999, İlyas vd 2003, Mahat vd 2004, Qi ve Zimmermann 2005). SGTaz geninin farklı kaynaklardan uygun bir konukçuya klonlanarak burada ekspresyonu SGTaz üretimini arttırmada diğer bir yöntemdir. Yabani tipteki SGTaz üreticileri çoğunlukla yüksek miktarda SGTaz üretmezler. SGTaz enziminin aşırı-ekspresyonu enzim üretimini arttırmak için kilit unsurdur. Ticari olarak üretilen SGTaz'ların yaklaşık %50'si heterolog üretim işlemleriyle elde edilmektedir (Qi ve Zimmermann 2005). Çizelge 2.1'de *Bacillus* türlerinden günümüze kadar SGTaz genleri üzerine yapılan çalışmalar özetlenmektedir.

Çizelge 2.1. *Bacillus* türlerinden günümüze kadar izole edilen yabancı tipteki veya rekombinant SGTaz genleri.

Bakteri	SGTaz tipi	Kaynak
<i>Alkalophilic Bacillus agaradhaerens</i> LS-3C	β	(Martins ve Hatti-Kaul 2002)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. 1-1	β	(Schmid vd 1988)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. 17-1	β	(Kaneko vd 1988)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. 38-2	β	(Hamamoto ve Kaneko 1987)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. 1011	β	(Kimura vd 1990)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. A2-5a	β	(Ohdan vd2000)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. G-825-6	γ	(Hirano vd 2006)
<i>Bacillus circulans</i> 8	β	(Nitschke vd 1990)
<i>Bacillus circulans</i> 251	β	(Lawson vd 1994)
<i>Bacillus clarkii</i> 7364	γ	(Takada vd 2003)
<i>Bacillus licheniformis</i>	α/β	(Hill vd 1990)
<i>Bacillus macerans</i>	α	(Takano vd 1986)
<i>Bacillus ohbensis</i>	β	(Sin vd 1991)
<i>Bacillus</i> sp. G1	β	(Ong vd 2008)
<i>Bacillus</i> sp. KC201	β	(Kitamoto vd 1992)
<i>Bacillus</i> sp. TS1-1	β	(Rahman vd 2006)
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	β	(Rashid vd 2002)
<i>Paenibacillus</i> sp. T16	$\alpha/\beta/\gamma$	(Charoensakdi vd 2007)

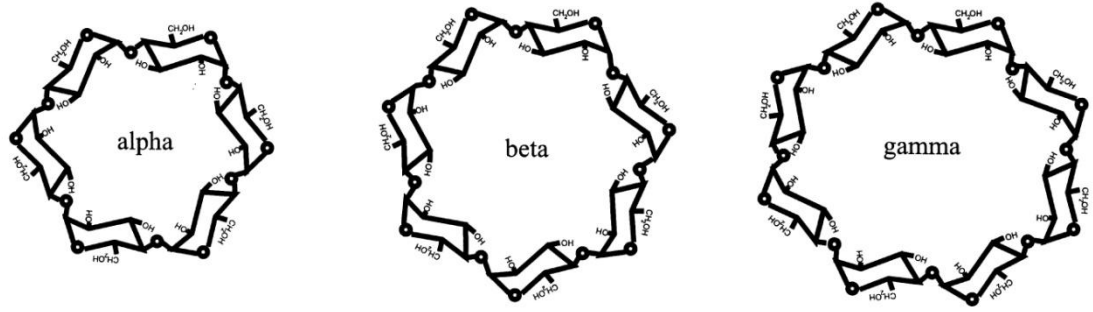
Siklodekstrinler, dünya pazarında büyük talep görmesine ve yaygın uygulama alanına sahip olmasına rağmen, fiyatların yüksek olması sebebiyle kullanımları sınırlıdır. Bu sebeple gen klonlanması ve aşırı ekspresyonla üretim gibi tekniklerle enzim üretim veriminin artırılması kilit önem taşımaktadır. Buna ek olarak uygun konukçu hücre seçimiyle SGTaz enziminin saflaştırılması (down-stream processing) kolayca iyileştirilebilmekte ve üretim maliyetlerini düşürebilmektedir (Schmid 1988).

2.3. Siklodekstrinler

2.3.1. Siklodekstrinlerin özellikleri

Siklodekstrin ilk defa 1881 yılında Villiers tarafından keşfedilmiştir ve o dönemde selülozin olarak adlandırılmıştır. Sharding, 1911 yılında gıda zehirlenmesine yol açan mikroorganizmalar üzerine yaptığı çalışmalarda izole ettiği *Bacillus macerans*'ın nişasta ihtiva eden besiyerinde selülozin meydana getirdiğini farketmiş ve büyük miktarda üretilen bu kristalin dekstrinleri Sharding dekstrinleri olarak adlandırılmıştır (Szejtli 1998).

SD'ler, nişastanın enzimatik dönüşümüyle meydana gelen, torus yapısındaki bileşiklerdir. Siklodekstrinler α -1,4-glikozidik bağlarla bağlı halkasal yapıdaki oligasakkaritlerdir. Genel olarak altı, yedi ve sekiz glikoz ünitesine sahiptirler ve sırasıyla α -, β -, γ -SD olarak isimlendirilmektedirler (Şekil 2.3). Çizelge 2.2.'de α -, β -, ve γ -SD'lerin bazı özellikleri verilmiştir.



Şekil 2.3. α -, β -, γ -siklodekstrinlerin (SD) yapısı. Buradaki kafes benzeri boşlukta konukçu organik moleküller hapsedilir (van der Veen vd 2000a).

SD'lerin moleküler yapısı kesik koni biçimindedir. İç kısmında bulunan ve “kavite” denilen boşlukları hidrofobiktir. X-ışınlarıyla yapılan yapısal incelemelerde, ikincil hidroksil gruplarının (C2 ve C3) halka yapıdaki çerçevenin daha geniş kenarında bulunurken birincil hidroksil gruplarının (C6) diğer kenarda bulunmasında dolayı SD'lerin torus biçiminin meydana geldiği belirtilmektedir. Bu hidroksil gruplarının ayrıca SD'lerin çözünübilirlik özelliklerinden de sorumlu olduğu saptanmıştır. C3 ve C5 hidrojen atomları ve glikosidik oksijen grupları torus şeklindeki molekülün içinde konumlanmakta ve hidrofobik bir iç bölge meydana getirmektedir. Suda çözünebilir hidrofobik bir dış yüzeyin ve hidrofobik matriks sağlayan apolar boşluğun sonucu olarak CD'ler çok çeşitli hidrofobik konuk molekülle inklüzyon kompleksi oluşturabilmektedir (van der Veen vd 2000a).

Çizelge 2.2. α -, β -, γ -siklodekstrinlerin özellikleri (Van der Veen 2000).

Özellikler	Glikoz ünitesi sayısı	Moleküler ağırlık (g/mol)	Dış çap (Å)	Boşluk çapı (Å)	Suda çözünme (25 °C) (%w/v)	Yaklaşık boşluk hacmi (Å ³)	Halka (torus) yüksekliği (Å)
α -SD	6	972	14,6	4,7-5,3	14,5	174	7,9
β -SD	7	1135	15,4	6,0-6,5	1,85	262	7,9
γ -SD	8	1297	17,5	7,5-8,3	23,2	427	7,9

SD'ler katı, sıvı ve gaz formundaki birçok konukçu molekülle katı formdaki inkülyon kompleksi (konukçu-konuk kompleksi) oluşturabilmektedirler. SD'ler ile moleküler kapsüllemeye kullanılan konuk molekül listesi oldukça geniştir. Düz veya dallı zincir yapısındaki alifatikler, aldehytler, ketonlar, alkoller, yağ asitleri, organik asitler, aromatikler, gazlar, ile halojenler oksiasitler ve aminler gibi polar bileşenler SD yapısı içine yerleşebilmektedir. Oluşan inkülyon kompleksi ile moleküle suda çözünürlük, kimyasal kararlılık ve biyoyararlılık gibi bazı eşsiz karakteristik özellikler kazandırılmaktadır (Schmid 1988, Szejtli 1998).

SD'ler alkali solüsyonlarda ($14 > \text{pH}$) ve asidik ortamlardaki ($\text{pH} > 3$) hidroliz reaksiyonlarında çok stabildir. Genellikle termal stabiliteleri $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ altında olmakla birlikte diğer doğrusal malto oligosakkaritlere göre indirgen ve indirgen olmayan uçlu glikozların varlığından dolayı nispeten daha kararlı bir yapı sergilemektedir (Ong 2005).

SD'lerin endüstriyel üretimindeki saflaştırma işlemleri karmaşık ve pahalı olmakla birlikte çözücü toksisitesi, yanıcılık ve çözücü kazanma işlemlerinde bazı dezavantajlar da söz konusudur. Çözücünün SD'den ayrıştırılması pahalı bir işlemdir bundan dolayı SD ler ilaç ve gıda alanında sınırlı kullanıma sahiptir (Biwer vd 2002). Genetik mühendisliği ve moleküler biyoloji araştırmaları SD üretim işlemlerini basitleştirmeyi ve belirli tipte SD üretimini sağlamayı, böylece pahalı ve çevreye zararlı prosedürlerin yerini alabilecek yöntemleri geliştirmeyi hedefleyen bir çalışma alanıdır (Sian 2002, Sian vd 2005).

2.3.2. Siklodekstrinlerin uygulamaları

SD'lerin uygulama alanları, birçok bileşenle inkülyon kompleksi oluşturabilme yeteneklerinden dolayı çok geniştir. Konuk molekül tamamen SD ile kaplandığında, molekülde kimyasal ve fiziksel olarak avantajlı bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Bu sebeple SD'ler eczacılık, biyodönüşüm ve fermentasyon, çevre, kimya, kişisel bakım, temizlik ürünleri, kozmetik, gıda, paketlenme ve tekstil ürünleri gibi alanlarda geniş kullanım imkanına sahiptir (Singh vd 2002).

SD'lerin kullanımı ile endüstriyel atıklardaki yüksek derece toksik maddeler, inkilüzyon kompleksi oluşumu yardımıyla uzaklaştırılabilmektedir. İnsektisit triklorofon ana sıvısında bulunan toksik yapıdaki kristalize olamayan triklorofon, β -SD kompleksine dönüştürülerek, tek bir uygulamada %90 oranında uzaklaştırılabildiği belirtilmiştir (Szetli 1989). SD'ler, toprağın zenginleştirilmesi işlemleri, organik kontaminantların ve ağır metallerin uzaklaştırılması gibi uygulamalarda çevre bilimleri açısından da önemli bir rol oynamaktadır (Gao and Wang, 1998).

Kimya endüstrisinde SD'ler ve türevleri hem tepkimelerin seçiciliğini geliştirmek için hemde sanayi ölçekli ürünlerin ayrılması ve saflaştırılmasında katalizör olarak kullanılmaktadır (Hedges, 1998).

Kozmetik endüstrisi SD'lerin talep gördüğü diğer bir alandır. Genellikle inkilüzyon bileşenlerinden kokuların kontrollü salınımı yolu ile parfüm, oda kokuları ve deterjanlardaki uçuculuğun baskılanmasında kullanılır. Stabilizasyon, koku kontrolü, sıvı bileşenlerin katı forma dönüştürülmesi üzerinden süreç iyileştirme gibi uygulamalar SD'lerin bu sektördeki en önemi faydalarıdır. Diş macunu, cilt kremleri, katı ve sıvı kumaş yumuşatıcıları, kağıt havlu sektörü, cilt ve koltukaltı koruyucular diğer uygulama alanlarıdır (Del Valle 2003).

İlaç endüstrisinde ise SD'ler ve türevleri kompleks oluşturarak, çözücü yada seyreltici olarak, ilaç bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini geliştirmek veya az çözünen ilaçların biyoyararlılığını arttırmada katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Frömming ve Szejtli 1994).

Gıda endüstrisinde de SD'ler farklı amaçlara yönelik kullanılabilmektedir. SD'ler, oksijen, ışık ve ısı işleme duyarlı lipofilik bileşenlerin korunması, renk maddelerinin ve vitaminlerin çözünebilir hale getirilmesi, kokuların, vitaminlerin, uçucu yağların istenmeyen değişikliklere karşı korunması, kötü koku ve tatların baskılanması ve bazı gıda bileşenlerinin kontrollü salınımını sağlamak amacı ile gıda işleme uygulamalarında ve gıda katkısı olarak çeşitli amaçlarla kullanılabilmektedir (Astray vd 2009).

SD'ler, yağlar aroma ve renk maddeleri gibi çeşitli maddelerle inkilüzyon kompleksi oluşturularak istenmeyen bileşenlerin maskelenmesi ve uzaklaştırılması yada istenen gıda bileşenlerinin kontrollü salınımı için kullanılabilir (Prasad vd 1999). Endüstriyel portakal suyu üretiminde sırasında soruna neden olan limonoidler (başlıca limonin) ve flovonoidler (başlıca naringin) SD'ler ile inkülüzyon kompleksi oluşturularak uzaklaştırılmakta ve böylelikle acı tad azaltılabilmektedir. SD'ler, bitki ve fungal ekstraktlar, yağsız süt hidrolizatları, kavrulmuş çay ve kahvelerde tanenlerin bağlanması ve acılığın giderilmesinde kullanılabilir. En çok kullanıldığı uygulama ise süt ve yumurta gibi hayvansal gıdalardan kolesterolün uzaklaştırılması işlemidir. Ayrıca, SD'ler yağlarda kızartma sırasında oluşan serbest yağ asitlerinin uzaklaştırılmasında da kullanılabilir (Hedges, 1998).

SD'ler gıda formülasyonlarında tat verici ve koruyucu olarak da kullanılabilir. SD'ler toz haldeki tatlandırıcı ve şekerleme maddelerinin kontrollü salınımını sağlar. Böylelikle sakızlarda, tüketici için hayli önemli olan lezzetin uzun süre korunması sağlanır (Mabuchi ve Ngoa 2001). Çoğu doğal ve yapay tatlandırıcılar, uçucu yağlar ya da sıvılardır. Bunların SD'ler ile kompleksleri aromanın korunmasında, geleneksel enkapsülasyon teknolojilerine gelecek vaat eden bir alternatif sunmaktadır. SD'ler dondurma, çözündürme ve mikrodalga gibi gıda işleme metodlarında aromayı koruyarak moleküler enkapsülant olarak hareket etmektedir. Moleküler enkapsülant olarak β -SD aroma kalitesi ve miktarını diğer enkapsülantlara kıyasla büyük ölçüde ve uzun süre koruyarak gıda maderine uzun ömür sağlamaktadır (Munoz-Botella vd 1995).

SD'ler ile aspartam gibi tatlandırıcıların oluşturduğu kompleks tad geliştirici stabilize edici olarak hareket ederler. Ayrıca steviosit, gliserizin ve rubusoside gibi gıda tatlandırıcıların ağızda bıraktığı acı tadı gidermede kullanılmaktadır. SD'nin kendisi de gelecek vaat eden yeni bir tatlandırıcıdır. Viski ve bira gibi alkollü içeceklerde SD'lerin lezzet geliştirici olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Parrish 1988). SD'ler gıda maddelerinin hazırlanmasında farklı amaçlarla kullanılabilir. Örneğin dallı SD'ler, un bazlı noodle, tart hamuru, pizza hamuru ve prinç keklerinde hamura

elastikiyet ve esneklik vermektedir (Fujishima vd 2001). Elma suyu üretiminde ise SD'ler, trans-2-hexanalın içeren antimikrobiyal gıda koruyucularını hazırlanmasında kullanılmaktadır (Takeshita ve Urata 2001).

SD'lerin gıda olarak yasal statüleri ülkeden ülkeye değişmektedir. FAO/WHO ortaklığındaki gıda katkı maddeleri uzman komitesinin (JECFA) β - SD için önerdiği miktar günlük 5 mg/kg'dır. α - ve γ -SD'ler için, toksikolojik profilleri olumlu olduğundan dolayı herhangi bir günlük kabul edilebilir alım miktarı (ADI-Acceptable Daily Intake) belirlenmemiştir (US Federal Register 2005). ABD'de α -, β - ve γ -SD'ler FDA tarafından GRAS statüsünde değerlendirilmektedir ve ticareti yapılabilir. Japonya'da ise α -, β - ve γ -SD'ler doğal ürünler olarak kabul edilir ve ticareti yapılır ancak gıda sektöründe saflığına bağlı olarak kullanımları sınırlandırılabilir. α - ve γ -SD'ler Avustralya'da 2004'te ve Yeni Zelanda'da 2003'te yeni gıdalar (novel foods) olarak değerlendirmeye alınmıştır (Cravotto vd 2006).

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Bakteriyel Suşlar ve izolasyonları

Çalışmada gen kaynağı olarak kullanılan *Bacillus* sp. SD5 ve izole edilen diğer *Bacillus* sp SG1, *Bacillus* sp SG2, *Bacillus* sp V3 suşları sodalı olduğu bilinen Salda ve Van göllerinden izole edilmişti. Salda gölü, Burdur'a bağlı Yeşilova ilçesinde bulunan, suyu sodalı ve Mg iyonlarınca zengin (pH 9'un üzerinde olan), yaklaşık 44 km² büyüklüğünde, derinliğin yer yer 185 metreye ulaştığı doğal sit alanında bulunan bir bazik karakterli göldür. Van gölü ise, Bitlis il sınırlarında bulunan yüzölçümü 3.570 km², maksimum derinliği 450 m, suları tuzlu ve sodalı (%21,7 tuzluluk ve pH 9,8) bir göldür. Bu göllerden Nisan ve Mayıs aylarında, Salda gölünden 20 ve Van gölünden 7 adet göl suyu ile karışım halindeki toprak örnekleri örnek kaplarına alınmış ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Bu izolasyon sırasında SGTaz aktivitesinin kabaca belirlendiği, seçici besin ortamı içeren bir plaka ekim yöntemi kullanılmıştır (Park vd 1989). Bu yöntemde göre fenoltaleyn veya fenoltaleyn ile birlikte metil oranj ihtiva eden Horikoshi katı besiyerleri kullanılmıştır (Bknz bölüm 3.4.). Salda ve Van göllerinden alınan su ve toprak örneklerinden yayma yöntemi ile 1:10 seyreltilerek ve doğrudan ekim yapılmıştır. Plakalar 4 gün süreyle 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Aynı şekilde zenginleştirilmiş HM sıvı besiyerine sporlu bakterilerin çoğalabilmesi amacıyla ekim yapılmıştır. Bir gün sonrasında tekrar HM katı besiyerine aktarılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Etrafında açık sarı zon oluşan kolonilerden taze besiyerine tek koloni düşecek şekilde çizgi ekim yapılmış ve kültürler 37 °C'de geliştirilmiştir.

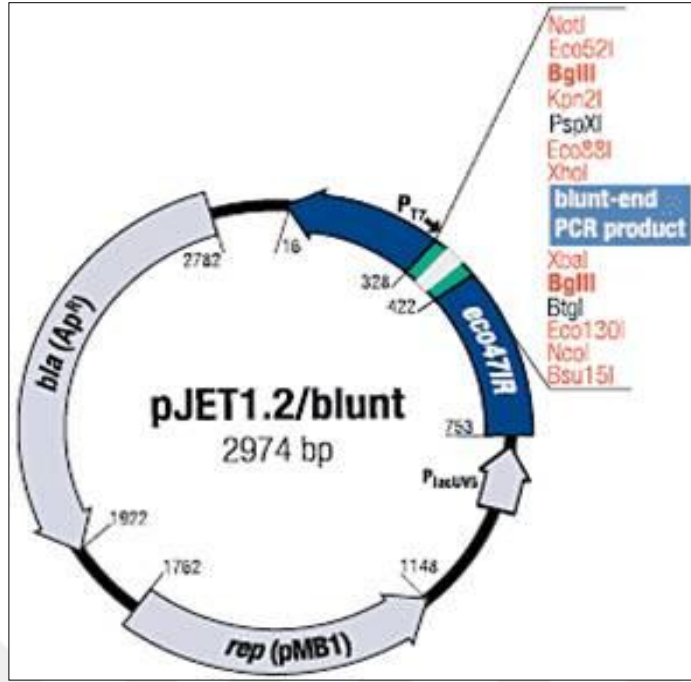
Elde edilen suşlara Gram boyama yapılmıştır. HM agar üzerinde geliştirilmiş genç hücreler öze yardımı ile üzerine bir damla su damlatılmış lam üzerine ince bir film halinde yayılmış ve havada kuramaya bırakılması ardından bunzen bekinden 3 kez geçirilip bakterinin lam üzerinde fiksasyonu sağlanmıştır. Üzerine kristal viyole boyası (0,5 g kristal viole, 100 ml distile su) damlatılıp 1 dk bekletildikten sonra distile su ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırılmış. Ardından lügol çözeltisi (Merck 109261)

damlatılarak 1 dk bekletilmiştir ve yine distile su ile yıkanarak lügol çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Preparat %96'lık etil alkol ile 10 15 dk muamele edilmesi ardından distile su ile yıkanmıştır. Son olarak karşıt boya olarak safranin çözeltisi (10 ml %95 etil alkol içinde çözündürülmüş 0.5 g safranin, 100 ml distile su) ile 15 sn muamele edilip distile su ile yıkanarak kendi halinde kurumaya bırakılmıştır (Temiz 2000). Leica DM750 mikroskop (DM750, Leica Wetzlar, Almanya) altında 100x objektifle üzerine immersiyon yağı (Nikon, Japonya) damlatılarak incelemeye tabi tutulmuştur. Ayrıca HM agar üzerinde gelişen hücrelerin koloni yapıları ve özellikleri mikroskop altında çeşitli objektiflerle incelenmiştir.

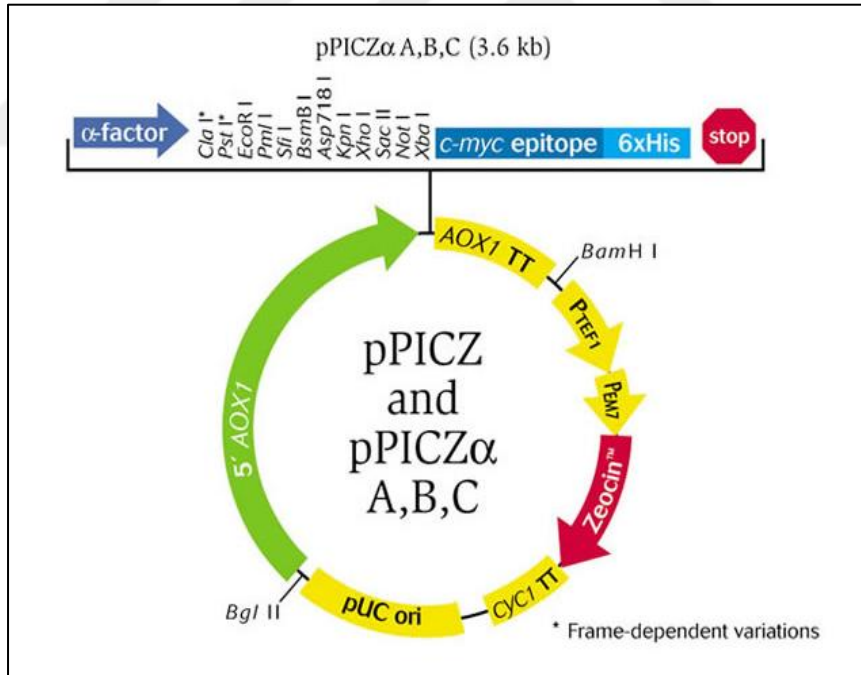
Bakteri kültürleri sıvı Horikoshi besiyesinde (Bknz bölüm 3.6) geliştirilmiş ve 1:1 oranında hacimce %50 gliserol içeren sulu çözelti ile karıştırılarak -80 °C'de depolama yapılmıştır. Suşlar doğal kaynağını belirtecek şekilde harf ve sayı içeren kodlarla isimlendirilmiştir. Horikoshi katı besiyeri üzerinde geliştirilen koloniler ise 4 °C'de korunmuştur.

3.2. Konukçu Suşlar ve Taşıyıcı Plazmidler

Çalışmalarda plazmidlerin çoğaltılması amacıyla konukçu suş olarak kimyasal transformasyona elverişli *Escherischia coli* (*E. coli*) suşları olan, DH5 α (Invitrogen, CA, ABD) ve XL-1 Blue (Stratagene, CA, ABD) kullanılmıştır. SGTazgeni klonlama çalışmaları için *Pichia pastoris* X33 (Invitrogen, CA, ABD) suşu kullanılmıştır. Bazı analizlerde kontrol amaçlı olarak polihistidin kuyruğu ihtiva eden EGFP (green fluorecent protein-yeşil florasın proteini) proteini geni içen *Pichia pastoris* X33-EGFP suşu kullanılmıştır. PZR ürünlerinin klonlanmasında küt uçlu DNA parçalarının bağlanmasına elverişli pJET 1.2 (Fermentas, MD, ABD) vektör-enzim kompleksi kullanılmıştır (Şekil 3.1). Diğer bazı klonlama çalışmalarında pPICZ α A (Fermentas, MD, ABD) vektör plazmidi kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Küt uçlu PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılan pJET 1.2 plazmidi



Şekil 3.2. Protein ekspresyonu için kullanılan PPICZαA plazmidi

3.3. Kimyasallar ve restriksiyon enzimleri

Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazları ve bunların tampon çözeltileri Fermentas (MD, ABD) temin edilmiştir.ve kullanımında üretici firmanın talimatlarına uyulmuştur. Farklı şekilde belirtilmediği takdirde kullanılan kimyasalların tamamı Sigma-Aldrich (MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

3.4. Besiyerleri

3.4.1. Horikoshi sıvı ve katı besiyeri

Horikoshi sıvı besi yeri (HM-broth) %1 çözünebilir nişasta, %0,1(kg/L) KH_2PO_4 , %0,02 (kg/L) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %0,5 (kg/L) pepton, %0,5 (kg/L) maya ekstraktı, %1 Na_2CO_3 ihtiva etmektedir (Kaneoke vd 1988).

Horikoshi katı besiyeri (HM-agar) %0,1 (kg/L) KH_2PO_4 , %0,02 (kg/L) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %0,5 (kg/L) pepton, %0,5 (kg/L) maya ekstraktı, %1 Na_2CO_3 , %1,5 (kg/L) agar ve %0,02 (kg/L) fenoltaleyn %0.01 metil oranj ihtiva etmektedir (Park vd 1989).

Otoklavlama işleminde çözünebilir nişasta ve sodyum karbonat çözeltileri ayrı ayrı sterilize edilmiştir. Ardından sıcaklığın 55 °C'ye inmesi beklenmiş ve 20 ml olacak şekilde petrilere dökülmüştür. Petriler mikrobiyolojik emniyet kabini içinde katılaşarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Daha sonra kullanılacak olan besiyerleri 4 °C'lik dolaplarda muhafaza edilmiştir.

3.4.2. Luria-bertani sıvı ve katı besiyerleri

Luria-Bertani (LB) Miller (Difco™, MD, ABD) katı besiyeri(5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar) ve sıvı besiyeri (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 10 g/L NaCl) üretici firmanın talimatlarına uygun olarak

hazırlanmıştır. LB-ampisilinli katı ve sıvı besiyerleri hazırlanırken, otoklavlama sonrası sıcaklığın 55 °C altına inmesi beklenilmiş ve ardından nihai konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin ilave edilmiştir.

Luria-Bertani (LB) Lennox (Difco™, MD, ABD) katı besiyeri (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L tripton, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar) ve sıvı besiyeri (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L tripton, 5 g/L NaCl) üretici firmanın talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır. LB Lennox-zeosinli katı ve sıvı besiyerleri besiyerleri hazırlanırken, otoklavlama sonrası sıcaklığın 45 °C altına inmesi beklenilmiş ve ardından nihai konsantrasyon 25 µg/ml olacak şekilde zeosin ilave edilmiştir.

Katı besiyerleri sıcak su banyosu içinde 55 °C'ye inmesi beklenmiş ve 20 ml olacak şekilde petrilere dökülmüştür. Petriler mikrobiyolojik emniyet kabini içinde katılarak kullanıma hazır hale gelmesi beklenmiştir. Daha sonra kullanılacak olan besiyerleri 4 °C'lik dolaplarda depolanmıştır.

3.4.3. YPD sıvı ve katı besiyerleri

YPD (Difco™, MD, ABD) katı (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 20 g/L dekstroz, 15 g/L agar) ve sıvı besiyerleri (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 20 g/L dekstroz) üretici firmanın talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır.

3.4.4. Nişastalı MM katı besiyeri

%1,34 YNB, %4x10⁻⁵ biotin, %0,5 metanol, %1,5 agar, %0,4 çözünebilir nişasta otoklavlanarak hazırlanmıştır Katı besiyeri sıcak su banyosu içinde 55 °C'ye inmesi beklenmiş ve 20 ml olacak şekilde petrilere dökülmüştür. Petriler mikrobiyolojik emniyet kabini içinde katılarak kullanıma hazır hale gelmesi beklenmiştir. Daha sonra kullanılacak olan besiyerleri 4 °C'lik dolaplarda depolanmıştır.

3.4.5. BMMY BMGY sıvı besiyerleri

Stok besiyeri (BMXY) hazırlamak üzere %1 maya ekstraktı ve %2 pepton sulu çözelti hazırlanmıştır. Bunun içine, BMGY besiyeri için; %1.34 YNB, %0,2 4×10^{-5} biotin, %1 gliserol, %10 1M fosfat tamponu (pH 6,5). BMMY besiyeri için ise %1.34 YNB, %0,2 4×10^{-5} biotin, %1 metanol, %10 1M fosfat tamponu (pH 6,5) eklenmiştir (İnan vd 2007).

3.4.6. Gliserollü Stokların Hazırlanması

Gen kaynağı bakteri 5 ml Horikoshi sıvı besiyerinde 37 °C geceboyu inkübe edilmiş ve daha sonra 5 ml %50'lik gliserol ile karıştırılmış ve viallere bölüştürülerek -80 °C'de depolanmıştır.

pPICZa-A plazmidi ve hedef geni taşıyan *E. coli* XL-Blue hücreleri tek koloniden alınarak 3 ml Luria-Bertani Lennox sıvı besi yerine ekilmiş, 37 °C'de geceboyu inkübasyona bırakılmış ve yarıyarıya %50'lik gliserol ile karıştırılarak -80 °C'de depolanmıştır.

pJET 1.2 plazmidi ve hedef geni taşıyan *E. coli* DH5a hücreleri tek koloniden alınarak 3 ml Luria-Bertani sıvı besi yerine ekilmiş 37 °C de geceboyu inkübasyona bırakılmış ve %50'lik gliserol ile karıştırılarak aynı şekilde -80 °C'de depolanmıştır.

3.5. Hücre Yoğunluğunun Belirlenmesi

Hücre yoğunlukları saf su ile seyreltilen sıvı kültür örneklerinin 600 nm dalgaboyunda absorbanslarının ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Tek kullanımlık spektrofotometre küvetleri ile Libra S50 (Biochrom, İngiltere) spektrofotometresinde okuma yapılmıştır. Hücre yoğunluğunun belirlenmesi için yürütülen denemeler en az 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6. Genel DNA Teknikleri

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

3.6.1. DNA izolasyonu

Bakterilerin genomik DNA izolasyonunda MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, WI, ABD) ve mayaların genomik DNA izolasyonunda ise MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, WI, ABD) kullanılmıştır.

Genomik DNA izolasyonu öncesi bakteriler Luria-Bertani (LB) Lennox agar üzerinde geliştirilen saf kültürdeki tek koloniden alınarak 3 mL LB Lennox sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (Innova 44R, New Brunswick Scientific, NJ, ABD) tüplerde veya engelli (baffled) erlenlerde 1 gece geliştirilen kültürün santrifüjlenmesiyle elde edilen hücre peleti uygun kit ile muamele edilmiştir. Bunun için öncelikle hücreler enzimle parçalanmış ardından ilave edilen bir çözelti ile proteinleri çöktürülerek uzaklaştırılmış ve peletlenen DNA yıkanarak TE tamponunda çözülmüştür. Bu aşamalarda üretici firmanın sağladığı talimatlara uygun şekilde çalışılmış ve işlemler sırasında >10,000 g kapasiteli Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) ve soğutmalı Allegra 25R (Beckman Coulter, CA, ABD) santrifüj ekipmanları kullanılmıştır. Elde edilen DNA izolatları denemelerde kullanılmak üzere 4 °C'de saklanmıştır.

Maya hücrelerinden DNA izolasyonu için YPD agar üzerinde geliştirilen saf kültürden 1,5 ml YPD besi yerine ekim yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Kültürden alınan 1,5 ml örnek santrifüjlenmiş ve elde edilen hücre pelleti önce maya hücresi duvarını parçalayan enzimi içeren liziz solüsyonu ile muamele edilmiş, daha sonra protein presipitasyon çözeltisi ile proteinler çöktürülüp

uzaklaştırıldıktan sonra süper natantta kalan DNA çöktürülülerek TE tamponunda çözündürülmüştür.

3.6.2. Agaroz jel hazırlanışı

Total genomik DNA izolasyonlarının kalitesi, PZR ürünlerinin varlığı, restriksiyon endonükleazlarının etkisi gibi araştırmalarda örnekler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmıştır. Tüm uygulamalar aksi belirtilmediği takdirde %1'lik agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanırken, 1xTAE tampon çözeltisine (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) %1 oranında agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilmiş ve mikrodalga fırın yardımıyla ısıtılarak çözündürülmüştür. Bu çözeltiye 1 µL/50 mL etidiyum bromür çözeltisi (10 mg/mL, Invitrogen, CA, ABD) ilave edilerek, karışımın uygun ebatta ve sekilde seçilen kalıplara (jel kasedine) dökülmesi ve katılaşmasıyla jel elde edilmiştir. Jel kuyularına yüklenecek örnek 5:1 oranında 6X DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) jel yükleme tamponu ile karıştırılmış, gerekli görüldüğü hallerde ultra saf su ile seyreltilerek toplam 10-20 µL hacimde hazırlanmıştır. Jel 1X TAE tampon içinde tutularak örnekler kuyulara yüklenmiştir ve elektroforez uygulaması ile örnekler jel içinde 120 V doğru akım altında, 40-120 dk süreyle yürütülmüştür. Agaroz jel içinde molekül ağırlıklarındaki farka göre bantlara ayrılan DNA molekülleri etidiyum bromür varlığında UV (312 nm) ışınları altında turuncu ısıma verdiği için kurulan dijital kamera sistemi (Vilber Lourmant E-Box-VX2) ile görüntülenebilmiştir. Bu işlemde aksi belirtilmediği taktirde DNA standardı olarak O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır. Çalışmada elektroforez çalışmalarında kullanılan DNA ve protein standartları Ek. 7.1'de verilmiştir.

3.6.3. DNA Miktarının Tayini

Çift sarmal DNA yoğunluğu (miktarı) Quant-iT™ dsDNA assay kit (molecular Probes®, Invitrogen, CA, ABD) yardımıyla Qubit™ (Invitrogen, ABD) flourometresi kullanılarak belirlenmiştir. Fluorometrede 510 nm uyarma ve 527 nm emisyon filtreleri kullanılmıştır. Tedarikçi firmanın talimatları doğrultusunda öncelikle içinde Quant-iT

reaktifi ve tamponu bulunan çalışma solüsyonu hazırlanmış ve standart olarak 100 ng/ μ L DNA ve 0 ng/ μ L DNA 190 μ L çalışma solüsyunu içinde 10 μ L olacak şekilde iki adet dilüsyon hazırlanmış ve cihaz kalibre edilmiş. Ardından hedef DNA miktarı 199 μ L çalışma solüsyonu içinde 1 μ L DNA olacak şekilde hazırlanan dilüsyon ile tayin edilmiştir.

3.6.4. PZR

PZR için TGradient® (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) thermocycler (ısı döngü cihazı) ve KOD Hotstart DNA polymerase (Stratagene, CA, ABD) enzim kiti kullanılmıştır. Yürütülen çalışmada PZR analizlerinde kullanılan primerler ve bunlara ait bazı özellikler Ek. 7.2’de verilmistir.

PZR cihazında dizilerin uzaması basamağı için verilen asgari süre (elongation), oluşması beklenen parçanın kb cinsinden büyüklüğüne ve DNA polimeraz enzim kitinin kullanım talimatlarına bağlı olarak belirlenmiştir. Kapak sıcaklığı tepkime süresince 99 °C, tepkimeler sonrasında tüplerin bekletileceği sıcaklık ise 4 °C olarak ayarlanmıştır. Kullanılan PZR ısı döngü cihazında tepkimede kullanılacak primer çiftinden en düşük erime sıcaklığına sahip olan primerin bağlanma sıcaklığının (T_m) ± 5 °C olarak programlanmıştır. PZR öncesinde tüplerin sürekli buz üstünde tutulmasına özen gösterilmiştir. PZR denemelerinde kullanılan ısı döngü programı 1 kere 35 döngü içeren düz program olmuştur. Çizelge 3.1’de uygulanan ısı döngüsü programı verilmiştir. Kullanılan cihazın ısıtma bloğu sıcaklık gradienti sağlayabilir özellikte olduğu için PZR denemelerinde $T_m \pm 5$ °C aralığında reaksiyonlar gerçekleştirilerek PZR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. PZR işleminin kontrolü için primer çiftleri ile elde edilen PZR ürünleri %1 agaroz jelde 1X TAE tamponu içinde yürütmüştür. Uygulanan sıcaklık gradientinde en yoğun bandı veren sıcaklık (T_m) optimum bağlanma sıcaklığı olarak belirlenmiş ve daha sonra yapılan PZR uygulamalarında her primer çifti için ayrı olarak belirlenmiş optimum bağlanma sıcaklığı kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Isı Döngü Programı			
Sıra	Sıcaklık	Süre	Döngü komutu
1	94	120	35 kere 2'ye git
2	94	15	
3	(T _m) $\pm$ 5	30	
4	70	30	
5	72	600	
6	4	∞	

PZR ürünleri MinElute PCR Purification Kit (Quiagen, CA, ABD) yardımıyla veya gerekli görüldüğü durumlar da jelde yürütülüp ampikon bandı kesilerek MinElute Gel Extraction Kit (Quiagen, CA, ABD) ile jel ortamından uygun tampon içine özütlenmiştir.

3.6.5. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid izolasyonu QIAprep®Spin Miniprep (Qiagen, CA, ABD) kit ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bunun için bakteriler 37 °C'de 18-24 saat geliştirilmiş ve 1,5-3 mL kültür örneği santrifüjlenerak pelet olarak ayrılan organizmalardan plazmidler izole edilmiştir. Plazmid DNA kalitesi agaroz jelde yürütülerek kontrol edilip ardından DNA miktarı belirlenmiştir.

3.6.6. DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarınca Sindirilmesi

DNA'nın sindirilmesinde Fermentas FastDigest (Thermo Scientific, MA, ABD) restriksiyon enzimleri ve tamponları üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Enzimler plazmid ve ligasyonu yapılacak genin haritalarına bakılarak her biri plazmitten ve diğeri genin içinden olmak üzere 2 bölge belirlenerek seçilmiştir. Sindirim işlemi için, kullanılan DNA'ya bağlı olarak endonükleazın kullanım talimatları doğrultusunda 1-5 µg DNA içeren tüpe toplam hacim 20-50 µl olacak şekilde 10X endonükleaz tamponu ve enzim(ler) ilave edilmiş, karışım 37 °C'de 5-60 dk tutulmuştur. Sindirimin doğrulanmasının kontrolü ve DNA kalitesi agaroz jelde yürütülerek belirlenmiş ve ardından DNA miktarı belirlenmiştir.

3.6.7. DNA Ligasyonu ve Defosforilasyonu

DNA parçalarının ligasyonunda Fermentas Rapid DNA ligation kit (Thermo Scientific, MA, ABD) üretici firmanın talimatlarına göre 20-100 ng plazmid vektör restriksiyon endonükleazları ile sindirilmiş ve vektör/hedef gen DNA parçasının molar oranları 1:3 den 1:5 oranları arasında olacak şekilde hedef gen parçası ve vektör içerisinde T4 DNA ligaz enzimi ve 1X ligasyon tamponu bulunan ve steril su ile 20 µl hacmine getirilen karışımda 10 dk 22 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

DNA parçalarının defosforilasyonu için ise Rapid DNA Dephos&ligation kit (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Restriksiyon endonükleazlarınca kesilen 1µg kadar vektör, içinde 1X tampon ve alkalın fosfataz bulunan ve steril su ile 20 µl hacme getirilen karışım içinde 37 °C'de 10-30 dk arası inkübasyona bırakılmış ardından 75 °C'de 2 dk bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur. Hedef gen parçası ve vektör, vektör/hedef gen oranı 1:1 ile 1:5 arasında olacak şekilde, , içerisinde T4 DNA ligaz enzimi, 1X ligasyon tamponu, 1X DNA dilüsyon tamponu bulunan ve steril su ile 20 µl hacme getirilen karışımda 10 dk 22 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen plazmit daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.8. Primerlerin Sentezlenmesi ve Dizi Analizi

Dizi analizlerinin bir kısmı araştırmanın Helsinki üniversitenin biyoteknoloji enstitüsü bünyesinde bulunan ve DNA dizi analiz merkezince (DNA Sequencing and Genomics Laboratory, Helsinki, Finlandiya), Büyük çoğunluğu ise Orta doğu Teknik üniversitesi yerleşkesinde bulunan dizi analiz merkezince (RefGen-Gen araştırmaları ve biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Bu merkeze 100ng/µL konsantrasyonda gönderilen örneklerde dizi tespiti DNA dizi analizi cihazında konukçu plazmide uygun dizi analiz primer çiftiyle gerçekleştirilmiştir. GenBank veritabanının bulunduğu BLAST tarama motoru kullanılarak elde edilen dizi verileri homolog dizilimlerle kıyaslamalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca dizilim verilerinin incelenmesi, primerlerin tasarlanması gibi bazı araştırmalarda DNAMAN 5.2.2 versiyonu (Lynnon

Corporation, Quebec, Kanada) bilgisayar programından faydalanılmıştır. Tasarlanan primerlerin sentezlenmesi Oligomer labrotatuvarınca (Oligomer Oy, Helsinki, Finlandiya) ve Biolab labotatuvarınca (İstanbul, Türkiye) gerçekleştirilmiştir.

3.6.9. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Escherischia coli XL-blue hücreleri kimyasal olarak kompetent (transformasyon uygun) hale getirilmiştir. Bunun için hücreler LB agar besiyerinde 37 °C’de gece boyu inkübe edilmiş ve tek koloniden 3 ml LB sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon 37 °C’de 250 dev/dk çalkalamalı inkübatörde gece boyu sürdürülmüş ve 0,5 ml kültür karışımı 50 ml LB sıvı besiyerine tekrar ekilmiştir. İnkübasyon, OD₆₀₀ 0,4 oluncaya kadar yaklaşık 3 saat inkübasyona devam edilmiştir. Kültür karışımı 2 adet 50 ml’lik santrifüj tüpüne bölünmüş ve 20 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra 4 °C’de 3000 dev/dk’da 10 dk santrifüj edilmiş ve oluşan pellet 4 °C’ye soğutulmuş 15 ml 0,1 M CaCl₂ içinde çözündürülerek buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler tekrar 4 °C 3000 dev/dk’da 10 dk santrifüj edilerek buzda bekletilmiş 2 ml 0,1 M CaCl₂ içinde %15 gliserol olacak şekilde ayarlanmış 2 ml 0,1 M CaCl₂ karışımı ile çözündürülmüştür. Bu karışım 1,5 ml lik eppendorf tüplere içinde 100 µl olacak şekilde bölüştürülmüş ve -80 °C’de depolanmıştır.

Pichia pastoris X33 hücreleri lityum asetat yöntemi (Wu ve Letchworth, 2004) ile kompetent hale getirilmiştir. Hücreler YPD katı besiyerinde 30 °C’de geceboyu inkübasyona bırakılmış ve seçilen tek koloniden YPD sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. Kültür yaklaşık 12-14 saat 30 °C’de 250 dev/dk hıza ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde OD₆₀₀ 3 değerini geçmeyecek sürede inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kültürden 50 ml YPD sıvı besiyerine içinde OD₆₀₀ 0,005 değerinde olacak miktarda ekim yapılmış ve tekrar 30 °C de 250 dev/dk’da yaklaşık 12 saat OD₆₀₀ 1-1,3 oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. Hücre kültürü 1500 dev/dk ve 4 °C’de 5dk santrifüj edilmiş ve oluşan pelletin üzerine 8 ml Liac çözeltisi (100 mM lityum asetat, 10 mM DTT, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ve 0,6 M sorbitol) eklenerek karıştırılmadan buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu karışım yukarıda verildiği şekilde santrifüj edilmiş ve kalan fermentasyon sıvısı atılmıştır. Oluşan pellet 3 defa 1,5 ml lik eppendorf

tüplere alınarak buz soğukluğunda 1,5 ml 1 M sorbitol ile yıkanmış ve aynı şekilde satrifüjlenmiştir. Son olarak 600 µl, hacimce %20 gliserol içeren 1M sorbitol çözeltisi ile çözündürülerek 1,5 ml'lik ependorflara, herbiri 80 µl olacak şekilde bölüştürölüp -80 °C'de depolanmıştır.

3.6.10. *E. coli* XL-1 Blue and *Pichia pastoris* X33 Hücrelerine Transformasyon

Kimyasal transformasyona uygun bakteri hücrelerine yapılan gen aktarımı için buz üstünde tutulan hücrelere 6-10 µL ligasyon karışımı doğrudan ilave edilmiştir. Tüpe hafifçe vurularak karışma sağlandıktan sonra 20 dk kadar buz üzerinde bekletilmiş ve hücreler ani olarak 42 °C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 60 sn tutulup ısı şokuna maruz bırakılmış, tekrar buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra tüpe 200µl sıvı LB Lennox sıvı besiyeri ilave edilerek 1 saat süreyle 37 °C'de 250 dev/dk çalkalamalı inkübatörde inkübasyon yapılmıştır. Hücre süspansiyonu, 1 saat öncesinden 37 °C'de inkübatöre alınan 25 µg/mL zeosin içeren LB Miller agar petrilere yayma yöntemle ekilmiştir. Petriler bir gece 37 °C'de üremeye bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak gen ihtiva etmeyen plazmid, negatif kontrol olarak ise saf su kullanılarak hücrelere transformasyon yapılmıştır.

Maya hücrelerine yapılacak elektrokimyasal transformasyonda kullanılacak hücreler buz üstünde bekletilerek çözündürölmüştür. Bu süre zarfında, aktarılabak plazmid MssI (PmeI) ile kesilmiş ve hücre içeren tüplere 5-10 µL (5.000-10.000 ng) ilave edilmiştir. Karışım, buz üstünde bekletilen elektroporasyon küvetlerine aktarılmıştır ve 5dk bekletilmiştir. Her bir küvet 1500 V, 5 milisaniye süreyle Eppendorf Eporator® 4309 (Eppendorf, Almanya) aleti ile darbeli akımla muamele edilmiştir. Derhal buz üzerine alınarak 1 mL soğuk 1 M sorbitol çözeltisi ilave edilmiştir. Temiz mikroföj tüplerine alınan karışım 1 saat 30 °C'de inkübe edildikten sonra 100 µg/mL zeosin içeren YPD plakalarına yayma ekim yapılmış ve transformasyon petrilere kolonilerin gelişmesi için 2 gün 30 °C'de bekletilmiştir.

3.6.11. Transformantların Görüntülenmesi

Plazmidlere DNA fragmanlarının aktarımı plazmitte bulunan direnç genleri sayesinde kontrol edilebilmiştir. Aktarılan plazmid sayesinde antibiyotik direnci kazanan (transformasyon +) *E. coli* hücreleri LB besiyerlerinde gelişebilmiştir. Bu amaçla negatif kontrol olarak plazmid transformasyonu yapılmamış *E. coli* hücreleri, pozitif kontrol olarak ise DNA fragmanı aktarılmamış plazmidin transforme edildiği *E.coli* hücreleri kullanılmıştır. Transformantlar ampisilin yada zeosin içeren LB besiyerlerine ekilmiştir.

Pichia pastoris maya hücrelerine yapılan transformasyonun kontrolü ise zeosin direnç geni içeren plazmidlerin mayaya aktarılması sonucu zeosin içeren YPD besiyerinde gelişebilme özellikleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Negatif kontrol olarak transformasyon yapılmamış maya hücreleri kullanılmıştır. YPD katı besiyerine ekilen *Pichia pastoris* hücrelerinde SGTaz enziminin hücre dışına salgılama kabiliyetlerinin kontrol edilmesi amacıyla klonlar %0,4 nişasta içeren MM katı besiyerine ekilmiş ve 30 °C’de inkübasyon yapılmıştır. Kültürlerde indüksiyonun sağlanabilmesi için petri kapağına 2 gün süreyle 24 saatte bir 100 µL metanol ilave edilmiştir. Nişastayı hidroliz edebilme yeteneğinde olan SGTaz enziminin aktivitesinin ön kontrolü için klonların üzerine lügol çözeltisi dökülerek etraflarında berrak alan oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir.

3.6.12. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılması işlemlerinde MinElute PZR purification kit (Qiagen, CA, ABD) kullanılmış olup üretici firmanın talimatları doğrultusunda analiz gerçekleştirilmiştir. Elüsyon işlemi 10-50 µl 10 mM tris (pH 8) ile yapılmıştır.

3.6.13. SDS-PAGE ve Western blot Analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ve Western blot analizi aynı anda yürütülmüştür. Her iki analiz için de Express PAGE gel (Gene Script, ABD) %4-

20'lik hazır jeller kullanılmıştır. Yürütülecek örnekler 50 µL toplam hacimde, 40 µL örnek (supernatant veya protein çözeltisi), 5X örnek tamponu (SDS, gliserol, bromofenolmavisi, tris-baz, merkaptoetanol) ile karıştırılarak 100 °C'de 5 dk bekletilmesi suretiyle denatüre edilmiştir. OWL P8D8 (Thermo Scientific MA, ABD) cihazı içinde bulunan jel yürütme haznesine uygun şekilde hazırlanarak yerleştirilen kullanıma hazır jel kaseti yerleştirilmiş ve haznenin boşlukları yürütme tamponu (Gene Script, ABD) ile doldurulmuştur. Jel kuyucukları şırınga yardımıyla yürütme tamponu ile yıkanmış ve 15'er µL örnek karışımı ilave edilerek 55 dk 140 V doğru akıma tabi tutulmuştur.

Moleküler standart olarak SDS-PAGE analizi için PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) protein standardı aksi belirtilmediği takdirde 5 µL olacak şekilde kullanılmıştır. Yürütme sonrası SDS-PAGE analizi için kasetinden dikkatli bir şekilde çıkarılan jel 15 dk saf su ile yıkanmış ve ardından IRDye™ Blue Protein Strain (Li-Cor Biosciences, NE, ABD) protein boyası ile 1 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Ardından saf su ile yıkayıp Odyssey görüntüleme sisteminde (Li-Cor Biosciences, NE, ABD) görüntülenmiştir.

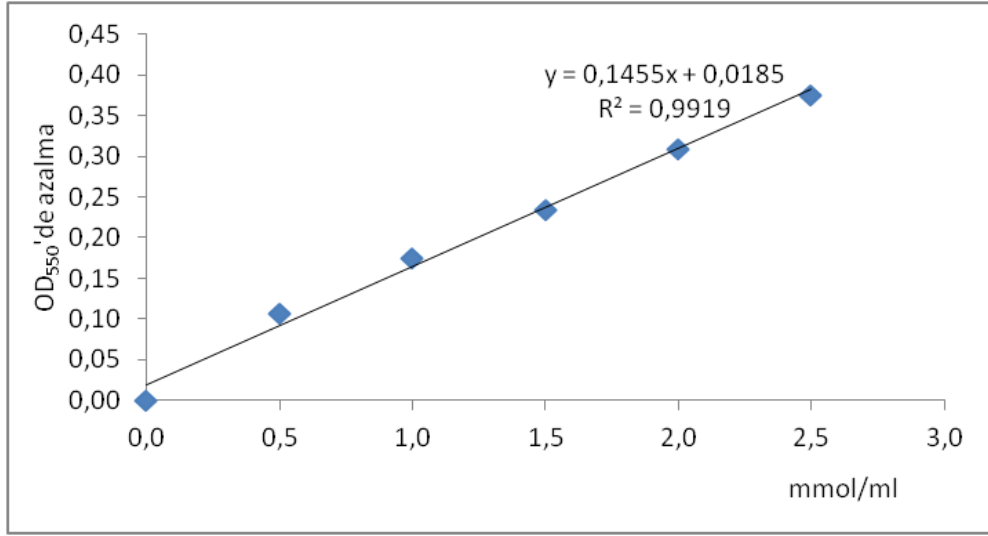
Jeldeki DNA'nın membrana aktarılması için yapılan Western blot analizi için elektroforez işlemi sonrasında jel dikkatlice çıkarılan 15 dk transfer tamponunda (Gene Script, ABD) yıkanmıştır. Bu işlem devam ederken Western blot işleminde kullanılacak filtre kâğıtları transfer tamponunda yıkanmış, PVDF membran (Millipore, ABD) ise metanolle ıslatılıp transfer tamponunda bekletilmiştir. Cihaz üzerine filtre-jel-membran-filtre olacak şekilde yerleştirilen malzemeler, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde roller ile üstünden geçilerek OWL Hep 1 Electrobloetter (Thermo Scientific MA, ABD) cihazına yerleştirilmiştir. Blotlama işlemi 20V akımda 60 dk sürdürülmüştür. Yürütme sonrası dikkatli bir şekilde alınan membran, orbital çalkalayıcı tabla üzerinde, içinde 1X PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) bulunan ışık geçirmeyen kaplar içerisinde 2 kere 10 dk yıkanmıştır. Ardından, membran daha önceden hazırlanan 50 ml kapatma solüsyonu içinde (50 ml 1X PBS, 0,25 gr kazein) çalkalayıcı üzerinde gece boyu bırakılmıştır. Polihistidin etiketli proteine ait bandın tespiti için antikor solüsyonları hazırlanmıştır. Membran, birincil antikor olarak

Penta-His Antibody (Qiagen, Almanya) 1:2000 oranında seyreltilerek hazırlanan solüsyonu (10 µl kapatma tamponu, 10 µl antikor, 10 µl Tween 20) 1 saat çalkalamalı tabla üzerinde bekletilmiştir. Ardından ikincil antikor olarak Goat Anti-Mouse IRDye 800 CW'nin (Li-Cor Biosciences, NE, ABD) 1:20000 oranında seyreltilerek hazırlanan solüsyonu içinde (15 ml kapatma 15 µl tween 20, 20 µl %20'lik SDS, 1 µl antikor) aynı şekilde çalkalanmıştır. Membran iki kez 10'ar dk süreyle, içinde %1 (v/v) Tween bulunan 1X PBS içinde çalkalamalı tabla üzerinde yıkanmış ve son olarak 1X PBS ile durulanıp Odyssey görüntüleme sistemi (Li-Cor Biosciences, NE, ABD) ile görüntülenmiştir. Western blot analizi için 1,5 µL Odyssey Protein Molecular Weight Marker (Li-Cor Biosciences, NE, ABD) protein standardı kullanılmıştır.

3.7. Diğer Biyokimyasal Analizler

3.7.1. SGTaz aktivitesinin tayini

Belirtilen besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden belirli sürelerde alınan örnekler 5500 dev/dk'da 10 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen berrak kültür sıvısının SGTaz aktivitesi Kaneko vd (1987) tarafından belirtilen fenolftaleyn metodu modifiye edilerek ölçülmüştür. Bu metoda göre %4 (w/v) oranında çözülebilir nişastanın pH 6 olan 0.1 M potasyum fosfat tamponunda çözündürülmesi ile hazırlanan karışımdan 250 µl alınıp üzerine 25 µl kültür fermantasyon sıvısı eklenerek (saflaştırılmış SGTaz enzimi için 10 µl saflaştırılmış enzim ve 15 µl saf su kullanılmıştır) tekrar 10 dk 50 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üzerine reaksiyonun durdurulması amacı ile 875 µl 30 mM NaOH ve eklenmiş ve ardından 5mM Na₂CO₃ içinde %0,02 (w/v) oranında fenolftaleyn çözündürülmüş karışımdan 125 µl eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Örneklerin renk yoğunluğu 550 nm'de spektrofotometrede okutulmuştur. Kalibrasyon eğrisi 0,1 M potasyum fosfat (pH 6) tamponunda 0-2,5 mmol β-SD'nin çözündürülmesi ile hazırlanan dilüsyonlar ile oluşturulmuş (Şekil 3.3), analizdeki çözünebilir nişasta ve enzim solüsyonları yerine hazırlanan SD dilüsyonlarından 25 µl kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için yürütülen denemeler aksi belirtilmediği takdirde 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Siklodekstrin standart kurvesi

Bir ünite enzim aktivitesi, belirtilen koşullar altında, 1 dakikada 1 μ mol β siklodekstrin üreten enzim miktarı olarak tanımlanmış ve enzim aktivitesi aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = \frac{\text{Serbestleşen siklodekstrin miktarı } (\mu\text{mol})}{\text{Örnek miktarı (ml)} \times \text{inkübasyon süresi (dk)}}$$

3.7.2. Protein miktar analizi

Hücre fermantasyon sıvılarının protein içeriği Pierce™ 660nm Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Inc., IL, USA) protein tayin kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kit içinde bulunan 125 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 750 μ g/ml, 1000 μ g/ml ve 1500 μ g/ml BSA (Bovine Serum Albumin) standart çözeltileri ile işlemler gerçekleştirilmiş, spektrofotometre cihazında (Biochorom Libra S50, İngiltere) 660 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Protein miktarı ölçülecek olan hücre dışı sıvılar 3'er tekerrürlü şekilde analiz edilmiştir. Örnekler reaksiyon ayracı ile 1:15 (100 μ l örnek:1500 μ l ayraç) oranında karıştırılmış ve 5 dk oda sıcaklığında inübasyona bırakılmıştır. Ardından spektrofotometrede 660 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Örneklerin protein

miktarı, oluşturulan BSA standart grafiği yardımıyla hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrisi ve denklemi Ek. 7.3’de gösterilmektedir.

3.8. SGTaz Geni İzolasyon Çalışmaları

3.8.1. SGTaz geni bölgesinin PCR yolu ile çoğaltılması

NCBI GenBank veritabanının bulunduğu BLAST tarama motoru (Anonymous 2009c) yardımıyla birbirine yakın *Bacillus* türlerine ait SGTaz gen dizileri elde edilmiş ve bunların homolog bölgeleri karşılaştırılmıştır. SGTaz geninin sinyal peptidi kodlayan kısmı ile stop kodunu sonrasındaki bölgeden homolojinin daha fazla olduğu bölgeler seçilerek yaklaşık 2200 bp’lik bir bölge belirlenmiştir.

Bacillus suşlarının bu bölgeye ait diziliminden faydalanılarak, bu bölümün PZR yoluyla çoğaltılmasında kullanılacak CGTWGF2 (5'-CTTTCTTTACCTACTGT TGCGG-3') ve CGTWGR2 (5'-TCGTTATGTCCCAGCCTCT-3') primer çifti tasarlanmıştır. Bu işlem için DNAMAN programı (DNAMAN 5.2.2, Lynnon Corporation, Quebec, Kanada) kullanılmıştır. Bu bölgenin çoğaltılması denemesinde *Bacillus*. sp. SD5 genomik DNA’sı kalıp olarak kullanılmış ve PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. PCR ürünlerinin *E.coli*’de klonlarak çoğaltılması ve dizi analizi

PZR yoluyla çoğaltılan segmentleri temizlemek ve ligasyona hazırlamak amacıyla MinElute PCR Purification Kit (Quiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. DNA segmentleri, T4 DNA ligaz enzimi yardımıyla gerçekleştirilen tepkime ile pJET 1.2 (Fermentas, MD, ABD) plazmid vektörüne bağlanmıştır. Bunun için, oda sıcaklığında 5 dakikalık bir tepkime ile küt uçlu DNA moleküllerinin birbirine bağlanmasını (ligasyonu) sağlayan Fermentas Rapid DNA ligation kit (Thermo Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır. Elde edilen ligasyon ürünü plazmidler kimyasal transformasyona uyumlu *E. coli* suşları olan DH5 α (Invitrogen, CA, ABD) hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyonla elde edilen kolonilerden rastgele 10 adet seçilerek 100 μ g/mL

ampisilin içeren 4 mL LB Miller sıvı besiyerine aşılama yapılmış ve kültürlerin üremesi için engelli (baffled) erlenler 24 saat süreyle çalkalamalı inkübatöre bırakılmıştır. Bir sonraki gün gelişen DH5 α klonlarından plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonu QIAprep®Spin Miniprep (Qiagen, CA, ABD) plazmid miniprep kiti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Plazmidler, içerdikleri DNA segmentlerini düşürmek amacıyla, özel tampon çözeltisi içinde BglIII enzimiyle sindirilmiştir. Bu örnekler jelde yürütülerek doğru parçayı taşıdığı düşünülen plazmid izolatları seçilmiştir ve dizi analizine gönderilmiştir.

Bacillus sp. SD5 suşuna ait SGTaz geni bölgesinin nükleotid dizilimi BLAST tarama motoru kullanılarak homolog dizilimlerle kıyaslamalı olarak araştırılmıştır.

3.8.3. SGTaz geninin *pichia pastoris*'e aktarımı

Bacillus sp. SD5 suşunun SGTaz geni PZR ile uçlarına SalI ve NotI kesim dizilerini ilave edecek CGTexS-F ve R, CGTexS-F ve CGTexN-R, CGTEXPF-SalI ve CGTEXPR-NotI primer çiftleri ile (primer dizileri Ek. 7.2'de verilmiştir) pPICZ α A plazmidine transforme edilmek üzere 3 farklı PZR ürünü oluşturulmuştur. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek kontrol edildikten sonra Rapid DNA Dephos&ligation kit (Roche, Almanya) ile ligasyon ve defosforilasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ligasyonda SalI ve NotI enzimleri ile lineer hale getirilmiş pPICZ α A (Fermentas, MD, ABD) vektörü kullanılmış ve elde edilen plazmidler transformasyona uyumlu *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, CA, ABD) hücrelerine aktarılmıştır. Ardından 25 μ g/ml zeosin içeren LB Lennox katı besiyerine ekimler yapılmış ve kültürler gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon sonrası transformasyon ile elde edilen 6'şar klon seçilmiş (toplam 18 klon) ve plazmid izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Plazmitler, bir plazmidde biri SGTaz geninde bulunacak şekilde seçilen XbaI ve NcoI endonükleazları ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Doğru parçaları taşıdığı düşünülen seçilmiş plazmidler MssI (PmeI) enzimi ile kesimin ardından PZR ürünlerinin de saflaştırılmasında kullanılan yöntemle saflaştırılmıştır. Doğrusallaştırılan bu 3 plazmid elektrokimyasal transformasyona uyumlu *P. pastoris* X33 hücrelerine aktarılmış ve elde

edilen koloniler arasından 10'ar adet muhtemel klon, hidroliz ve SGTaz aktivitesi varlığını test etmek üzere seçilmiştir.

3.8.4. *Pichia pastoris*'de ekspresyon

SGTaz salgılamasının bir ön-kontrolü olarak seçilen 30 klon ile yapılan sıvı saf kültür üretimlerinden ekim yapılarak nisasta ilaveli MM agarda (%0,34 maya azot bazı, 4×10^{-5} biotin, %0,5 metanol, %1,5 agar, %0,4 çözülebilir nisasta) gelişimi sağlanan koloniler Lugol çözeltisi dökülerek etraflarında berrak alan oluşumu olup olmadığı gözlenmiştir. MM-nişasta agarında geliştirme 2 gün sürdürülmüş ve indüksiyonun sağlanması için 24. ve 48. saatte petri kapağına 100 µL kadar metanol yayılmıştır. Maya klonlarında SGTaz üretiminin izlenmesi sıvı kültürlerde indüksiyonlu üretimle gerçekleştirilmiştir. Bunun için tek koloniden ml hacimde YPD sıvı besiyerine ekim yapılarak optik yoğunluğun 5'in üzerine çıkması amacıyla 30 °C'de, 10mL'lik kapaklı tüplerde, 250 dev/dk çalkalamalı olarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürler inokulum olarak kullanılmış ve 0,5 OD olacak şekilde 250 mL hacimli engelli erlenlerde 50 mL BMGY sıvı besiyerine aşılama yapılmıştır. Bu kültürler de 30 °C'de 250 dev/dk çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılmıştır. Fermantasyonun 18. Saatinde, hücrelerin bulunduğu besiyerinin değişimini sağlamak için, kültürler steril santrifüj viallerine aktarılıp Sorvall Legend RT Plus (Thermo Scientific, MA, ABD) ile 4 °C'de, 5200 g'de 10 dk süreyle santrifüjlenmiş, fermantasyon sıvısı atılmıştır.

Hücrelere 50 mL taze BMMY sıvı besiyeri ilave edilmiş, Vortex Genie II (Scientific Industries, NY, ABD) girdapkarıştırıcı yardımıyla tekrar homojenize edilen hücre kültürleri aynı koşullarda çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. İndüksiyon süresince kültüre 12 saat arayla (0. saat hariç) hacimce %1 oranında metanol ilave edilmiştir. Fermantasyonun 12., 24., 36., 48. ve 60. saatlerinde örnekler alınarak OD belirlenmiş, ve santrifüjleme işlemiyle elde edilen kültür supernatantları daha sonra analiz edilmek üzere 4 °C'de saklamaya alınmıştır. İndüksiyonu takip eden 24. saat fermantasyon sıvısı örnekleri ile SDS-PAGE ve Western blot analizi gerçekleştirilmiştir.

3.9. SGTaz enziminin karakterizasyonu

3.9.1. Polihistidin etiketli SGTaz enziminin üretilmesi ve Saflaştırılması

Bacillus sp. SD5 SGTaz enzimi geni polihistidin ile etiketlenerek *Pichia pastoris* mayasına transforme edilmiştir. Elde edilen transformantlardan M5-1 suşu seçilerek SGTaz enziminin optimum koşullarda hücre dışı üretimi sağlanmıştır. Hücreler 24 saat metanol indüksiyonu ile geliştirilmiş ve ardından 6000 g'de 5dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Elde edilen hücre dışı sıvının 15 ml'si gece boyu %5 gliserol içeren 1X PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4) tamponunda, Skin dialysis Tubing, 3.5 K MWCO (Thermo Scientific, IL, ABD) diyaliz membranı kullanılarak 4°C'de gece boyu diyaliz gerçekleştirilmiştir.

Polistidin etiketli SGTaz enzimi fermantasyon sıvısından HisPur Ni*NTA Purification Kit (Thermo Scientific Pierce, IL, ABD) kullanılarak, kitin talimatları doğrultusunda saflaştırılmıştır. Buna göre histidin etiketli proteinler nikel kolona bağlanarak etiketsiz proteinlerden ayrılmaktadır. Ni-NTA agaroz genellikle bir polihistidin (6xHis) dizisini ihtiva eden rekombinant proteinleri saflaştırmak için kullanılabilen bir nikel-yüklü afinite reçinesidir. Protein verimi ekspresyon seviyesine ve rekombinant proteinin biçim ve çözünebilirlik karakterine bağlıdır. Reçineye bağlanmış proteinlerin elüsyonu, kolona bağlanmak için polihistidin ile yarışan farklı konsantrasyonlardaki imidazol çözeltileri ile sağlanmıştır.

Diyaliz edilmiş hücre dışı sıvı, saflaştırma metoduna göre aynı miktarda dengeleme tamponu (10mM imidazole içeren 1X PBS tamponu; pH 7,4) ile karıştırılmıştır. Dengeleme tamponu ile analizin hemen öncesi yıkanan 400 µl reçine bu karışımın içine eklenip 30 dk oda sıcaklığında, Programmable Rotator Mixer RM Multi-1 (StarLab, Hamburg, Almanya) rotator karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Reçineye bağlanan proteinleri içeren karışım Pierce™ Spin Columns - Snap Cap kolonundan (Thermo Scientific Pierce, IL, ABD) 700 g'de 2'şer dk süreyle santrifüj edilerek geçirilmiştir. Ardından kolonda tutulan reçine yıkma tamponu ile (25 mM imidazol içeren 1X PBS tamponu) 3 kere yıkanmış, ardından farklı imidazol konsantrasyonları içeren elüsyon

tamponu (100mM, 250mM, 500mM imidazol içeren 1X PBS tamponu) ile yıkanarak reçineye bağlı proteinlerin elüsyon sıvısında toplanması sağlanmıştır. Tüm bu aşamalarda filtreden geçen süzüntü, yıkama ve elüsyon sıvıları analiz edilmek üzere toplanmış ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Saflaştırma işleminin kontrolü ve moleküler ağırlığın belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE ve Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Elüsyon çözeltisinde bulunan imidazolün uzaklaştırılması için elüsyon sıvısı diyaz membranı (Skin dialysis Tubing, 3.5 K MWCO, thermo Scientific, IL, ABD) kullanılarak %5 gliserol içeren 1X PBS fosfat tamponu içinde 4°C'de gece boyu diyaliz edilmiştir. Saflaştırma veriminin hesaplanabilmesi için enzim aktivitesi ve protein miktarı tayinleri gerçekleştirilmiştir.

3.9.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkisi

Optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla kısmen saflaştırılmış SGTaz enzimi, enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan standart metoda (Bknz Bölüm 3.8.1) uygun olarak, 10µl enzim/15µl tampon olacak seyreltilmiş ve 30-80 °C arasındaki sıcaklıklarda aktivite ölçümü yapılmıştır.

Enzim, sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla 20µ enzim/30µl tampon (pH6) olacak şekilde seyreltilmiş 30-80 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından enzim aktivitesi, standart enzim aktivitesi metodu kullanılarak ölçülmüş ve enzim stabilitesi belirlenmiştir.

Sıcaklık aktivitesi profilleri farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerlerinden optimum aktiviteyi gösteren değer %100 kabul edilerek oluşturulmuştur.

3.9.3. pH'nın enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkisi

Optimum pH'nın belirlenmesi amacıyla kısmen saflaştırılmış SGTaz enzimi, enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan standart metoda (Bknz Bölüm 3.8.1) uygun olarak 10µl enzim/15µl tampon olacak seyreltilmiş ve pH 3-11 arasındaki farklı

tamponlar içerisinde çözündürülen %4'lük nişasta solüsyonu ile 10 dk inkübasyona bırakılmış ardından standart enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır.

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla pH 3-11 arasındaki farklı tamponlar içerisinde 20µl enzim/30µl tampon olacak seyreltilmiş ve 30 dk 50 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından enzim aktivitesi, standart enzim aktivitesi metodu kullanılarak ölçülmüş ve enzim stabilitesi belirlenmiştir.

Analizlerde pH 3'te glisin-HCl tamponu, pH 4 ve pH 5'te sodyum-asetat tamponu, pH 6, pH 7 ve pH 8'de potasyum-fosfat tamponu, pH 9, pH 10 ve pH 11'de glisin-NaOH tamponu analiz öncesi hazırlanmıştır. pH profilleri farklı pH aralığında optimum aktiviteyi gösteren pH değeri %100 kabul edilerek oluşturulmuştur.

3.10. HPLC analizi ile hidroliz ürünlerinin belirlenmesi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi için Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezinde bulunan LC-20A HPLC sistemi (Shimadzu, Kyoto, Japonya), ve CTO-10AS VP kolon fırını (Shimadzu, Kyoto, Japonya). NUCLEOSIL® 100-5 NH₂ RP (4,6 mm; 5µm ve 100 Å) (MACHEREY NAGEL) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak hacimce 60:40 oranında asetonitril ve distile su karışımı kullanılmıştır. Mobil faz, sisteme DGU-20A₅ Prominence Degasser (Shimadzu, Kyoto, Japonya) gaz arındırma cihazından geçirilerek verilmiştir. Her analiz öncesi mobil faz sistemin temizlenmesi ve kalibrasyonu amacıyla 1-2 saat süreyle geçirilmiştir. Akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlanmış ve kolon sıcaklığı 30°C'de sabitlenmiştir. Reaksiyon değerleri RID10A (Shimadzu, Kyoto, Japonya) diferansiyel refraktif indeks dedektörü (RID) ile izlenmiş ve veriler, kullanılan HPLC sistemine bağlı bilgisayarda yüklü olan Shimadzu LC Solution programında (Shimadzu, Kyoto, Japonya) değerlendirilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi 6 farklı konsantrasyon aralığında oluşturulmuştur. Bunun için her bir SD'den 10000 ppm'lik ana çözelti hazırlanmıştır. Alfa, beta ve gama siklodekstrinler (Sigma-Aldrich, MO, ABD) tek tüpte herbirinden 250, 500, 1000, 2000, 2500, 3000 ppm olacak şekilde karıştırılmış ve seyreltilmiştir. Elde edilen kalibrasyon

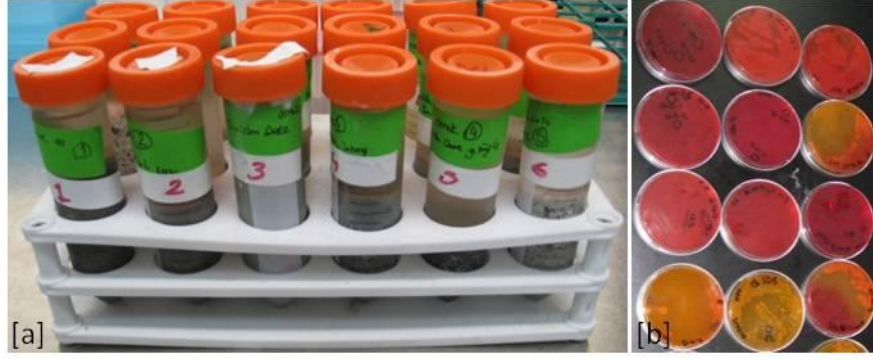
eğrileri Ek. 7.4'te verilmiştir. Analiz edilecek reaksiyon sıvısı hazırlanırken %4 (w/v) çözülebilir nişasta 0,1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 6) çözündürülmüş, bu karışımdan 1250 µl alınıp üzerine 125 µl enzim çözeltisi eklenerek 50 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Rekombinant enzim ve tepkime ürünlerini içeren karışım 10 dakikalık ve 24 saatlik inkübasyon ardından 5 dk kaynar suda bekletilerek reaksiyon durdurulmuş ve 0,45 µm membran filtreden geçirilerek viallere 1,2 ml alınmıştır. Vialler SIL-20AC HT Prominence autosampler (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazında bulunan bölmelere yerleştirilmiş ve enjeksiyon hacmi 20µl olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

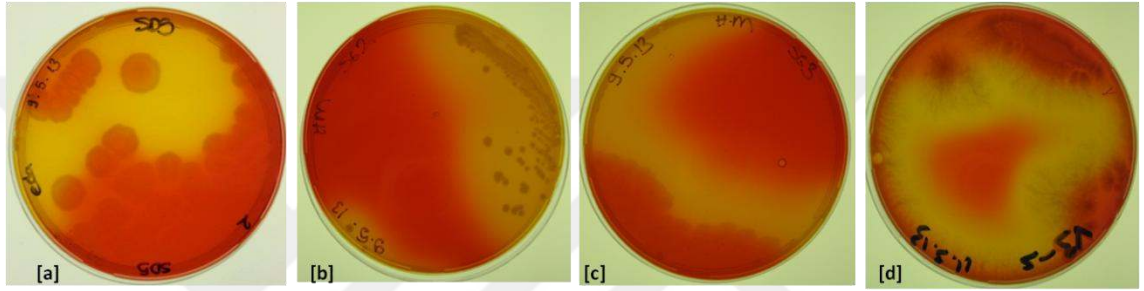
4.1. İzolasyon çalışmaları

4.1.1. Bakterilerin İzolasyonu ve SGTaz Üretme Potansiyellerinin Kontrolü

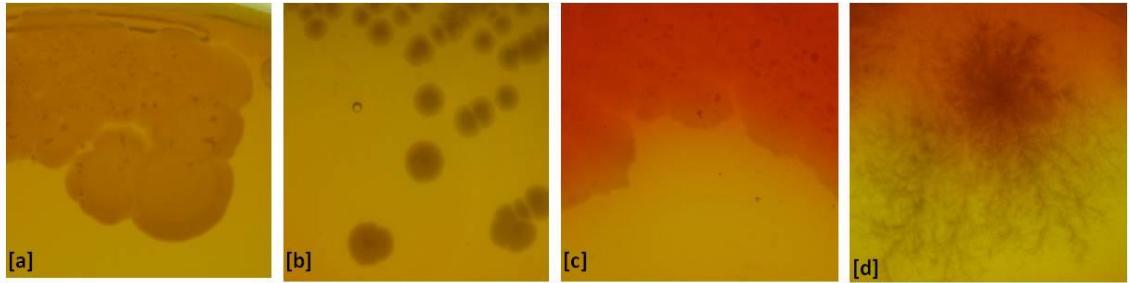
Salda gölü ve Van gölü kıyısı çevresinden temin edilen göl suyu ile karışım halindeki toprak örneklerinden yapılan izolasyon çalışmaları sonunda HM katı besiyerine 100 µl doğrudan ekim yapılan plakalarda etrafında açık sarı zon bulunduran 4 koloni gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Bunlardan HM katı besiyerine tek koloni düşecek şekilde ayrı ayrı çizgi ekim yapılmıştır. Elde edilen kültürlerde koloni etrafında indikatör renginin açılması suşların hücre dışına SGTaz enzimi salgıladığını doğrulamaktadır (Şekil 4.2). Hücreler stoklanabilmeleri için HM sıvı besiyerinde geliştirilmiştir. Şekil 4.3'te, elde edilen kültürlerin koloni morfolojileri daha yakından görülebilmektedir. Mikroorganizmalar SD5, SG2, SG3 ve V3 olmak üzere kodlanarak gliserol ile hazırlanan çözeltide -80 °C'de depolanmıştır.



Şekil 4.1. a) Salda ve Van göllerinden alınan toprak ve su örnekleri. b) İzole edilen mikroorganizmaların petri plakalardaki görüntüsü



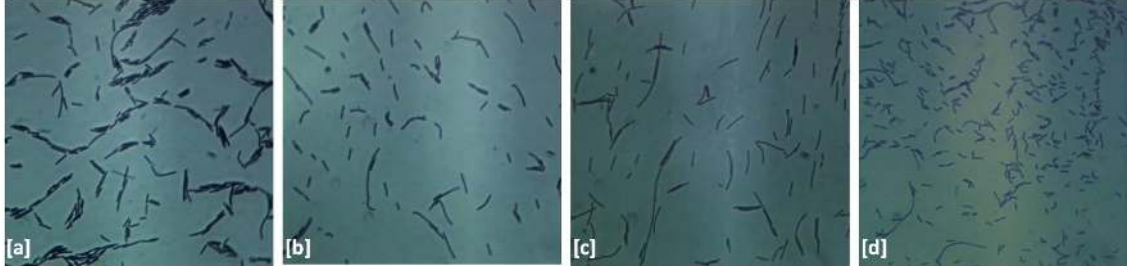
Şekil 4.2. a) SD5 izolatının fenolftaleyn indükatörlü HM agar plakası üzerindeki görüntüsü b-d) Sırasıyla SG2, SG3 ve V3 izolatlarının fenolftaleyn ve metil oranj indükatörlü HM agar plakaları üzerindeki görüntüsü



Şekil 4.3. a)SD5 b)SG2 c)SG3 d)V3 izolatlarının HM agar petri plakaların üzerinde meydana getirdiği koloni yapıları

Katı besiyerinde geliştirilen suşlardan alınan örneklere Gram boyama uygulanmış ve mikroskop altında incelenmiştir. Gram boyamada mor renkli bakteriler Gram pozitif değerlendirilir, ancak yapılan incelemede bakterilerin bir kısmında mor renk bir kısmında pembe renk gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Bu durumun hücrelerin büyüme evrelerindeki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Dört bakteri örneği de 16S rDNA tanılamasının yapılması için Petri plakalarında hazırlanmış saf

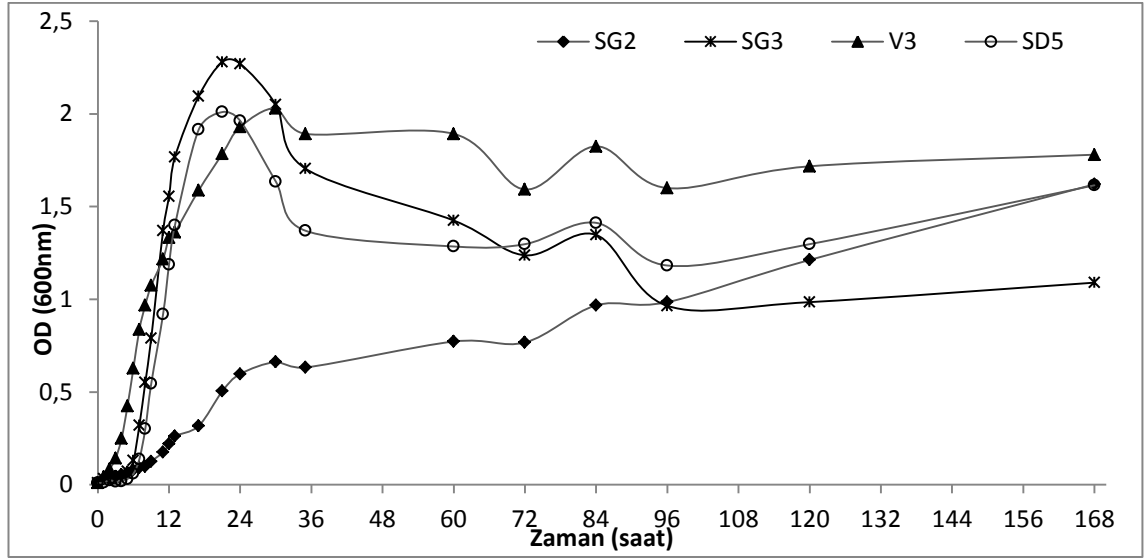
kültürler olarak Ankara’da bulunan RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezi’ne gönderilmiştir.



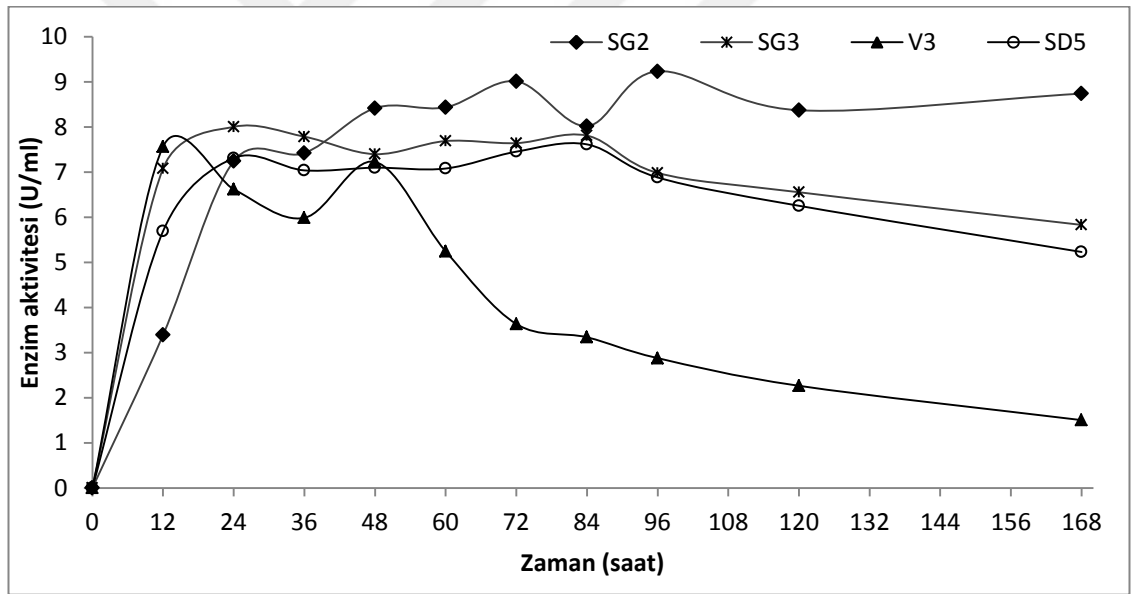
Şekil 4.4. İzolatların mikroskop görüntüleri (1000X büyütme oranı); a) SD5 b) SG2 c) SG3 d) V3

4.1.2. *Bacillus* sp. Suşlarının SGTaz Enzimi Salgılama Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzolatların gelişme evrelerinin ve enzim üretme yeteneklerinin en yüksek olduğu gelişme evresinin belirlenmesi amacıyla optik yoğunluk ölçümüne dayalı analizler gerçekleştirilmiştir. Optik yoğunluk ölçümü için seçilen 4 izolattan 3 ml HM sıvı besiyerine daha sonra inokulum olarak kullanılmak üzere ekim yapılmış, kültürün gelişmesi çok yavaş olduğu için 3 gün süreyle çalkalamalı inkübatörde inkübasyon sürdürülmüştür. Ardından 50 ml’lik erlenler içinde, tüm örnekler başlangıç OD’leri 0,01 olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler 7 gün boyunca çoğaltılmış ve ilk 24 saatte daha sık olmak üzere 168 saat boyunca belirli aralıklarla optik yoğunlukları ölçülmüştür (Şekil 4.5). Aynı kültürlerde enzim aktivitesi de 96. saate kadar 12 saat arayla, daha sonrasında belirli aralıklarla ölçülmüş ve 168. saatte inkübasyona son verilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Göllerden elde edilen bakteri izolatlarının Horikoshi besiyerinde izlenen gelişimi



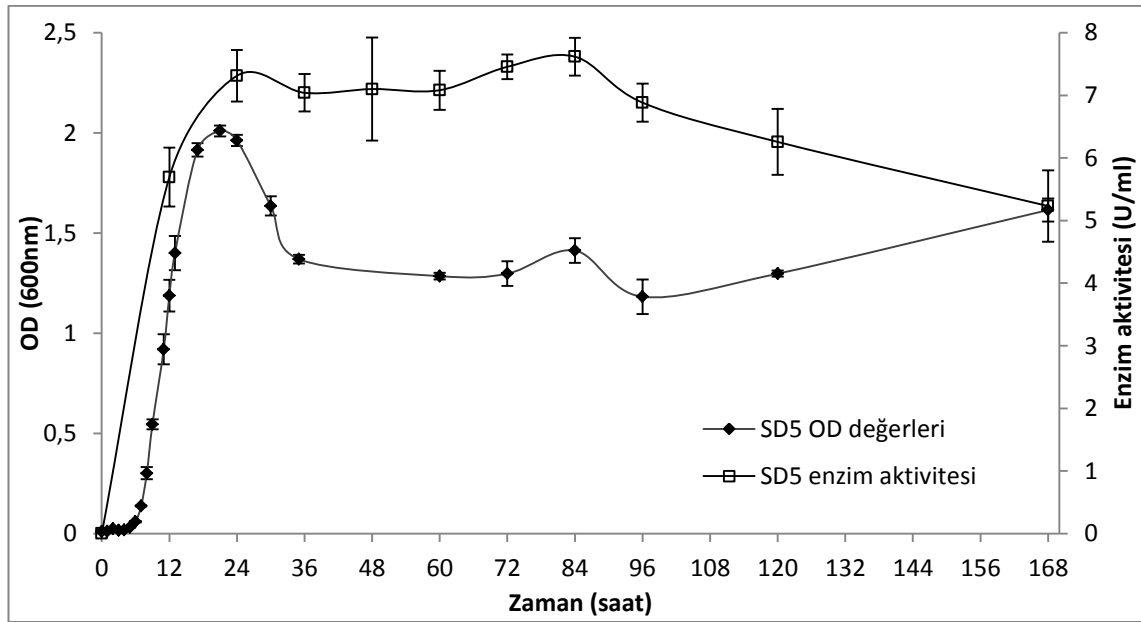
Şekil 4.6. Horikoshi besiyerinde geliştirilen bakteri izolatlarının hücre dışı SGTaz enzimi aktiviteleri

OD ölçüm analizine göre SD5, SG3 ve V3 suşlarının ilk 6-12 saat içinde logaritmik çoğalma evresinde oldukları, ancak SG2 suşunun gelişimini daha yavaş bir şekilde 168. saate kadar artarak sürdürdüğü görülmüştür. SD5 ve SG3 suşları için en yüksek optik yoğunluk 21. saatte, V3 suşunda 30. saatte ve SG2 suşunda 168. saatte kaydedilmiştir.

SGTaz enzimi aktivitesi değerlerine göre SD5, SG3 ve V3 suşları en yüksek aktiviteyi 12-48 saat aralığında göstermiştir. Yavaş gelişme sergileyen SG2 suşu ise 96. saatte en yüksek hücre dışı SGTaz aktivitesine ulaşmış ve bu aktivite değeri (9,2 U/ml) suşlar arasında tespit edilen en yüksek aktivite enzim aktivitesi olmuştur. SG3, SD5 ve V3 suşlarının hücre dışı sıvılarında ölçülen en yüksek SGTaz aktivitesi değerleri SG3 suşunda 24. saatte 8 U/ml, SD5 suşunda 84. saatte 7,6 U/ml ve V3 suşunda 12. saatte 7,6 U/ml olmuştur.

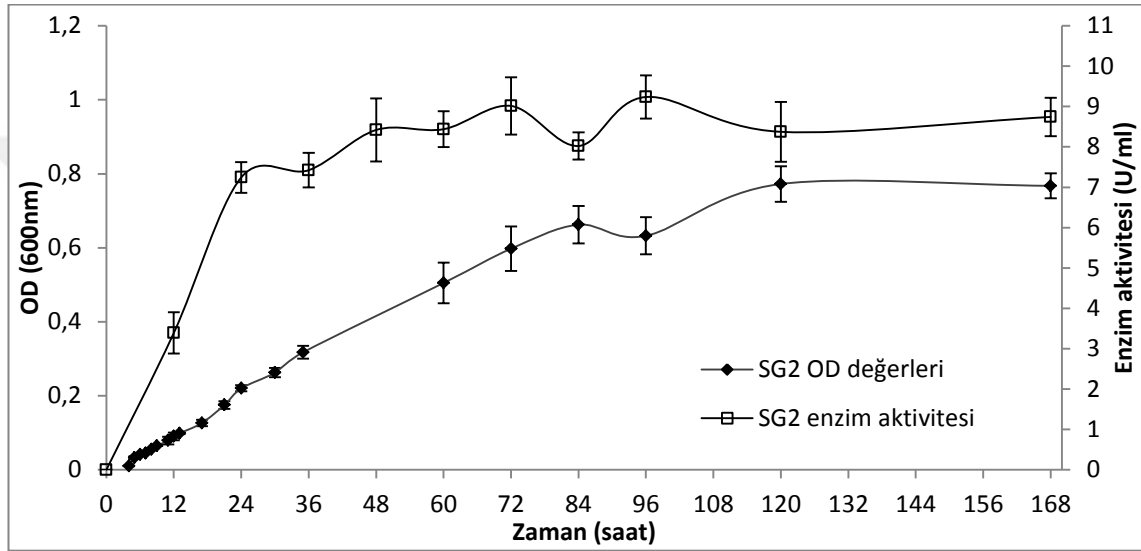
Gelişim ve enzim aktivitesi sonuçlarının herbir suş için kendi içinde değerlendirebilmesi amacıyla veriler ayrı ayrı oluşturulan grafiklerle ifade edilmiştir. Tüm suşların enzim aktivitesi değerleri ve % enzim aktivitesi değerleri tablosu Ek. 7.5'te verilmiştir.

SD5 suşunun OD ve enzim aktivitesi değerlendirildiği grafiğe (Şekil 4.7) göre, 12. saatte 5,7 U/ml olan aktivitenin 24. saat 7,3 U/ml'ye ulaştığı ve 96. saate kadar enzim aktivitesinde önemli oranda bir değişimin olmadığı görülmektedir. Enzim aktivitesi bu noktadan sonra düşme eğilimi göstermiş olup, 120. saat itibari ile 6,2 U/ml olarak belirlenmiştir.



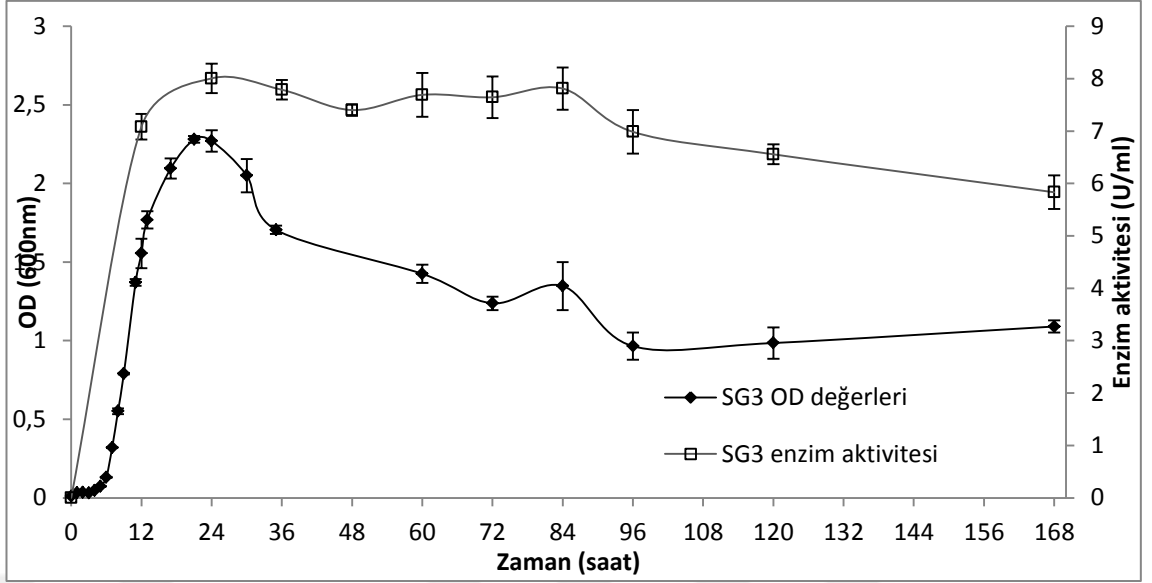
Şekil 4.7. SD5 suşunun zamana göre OD ve enzim aktivitesi değişim grafiği

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi, SG2 suşu 84. saate kadar sürekli aratan bir çoğalma grafiği sergilemektedir. Aynı grafikte enzim aktivitesinin de gelişim eğrisi ile paralel şekilde artış gösterdiği görülebilir. Buna göre geliştirmenin 12. saatinde hücre sıvısında 3,4 U/ml enzim aktivitesi tespit edilirken 24. saatte aktivite değeri yaklaşık 2 katına çıkarak 7,2 U/ml olmuştur. Daha sonrasında enzim aktivitesindeki artışın hücre yoğunluğundaki artıştan bağımsız olduğu ve dalgalanma gösterdiği görülmüştür. Enzim aktivitesi 120.ve 168. saatlerde sırasıyla 8,4 ve 8,7 U/ml olarak belirlenmiştir.



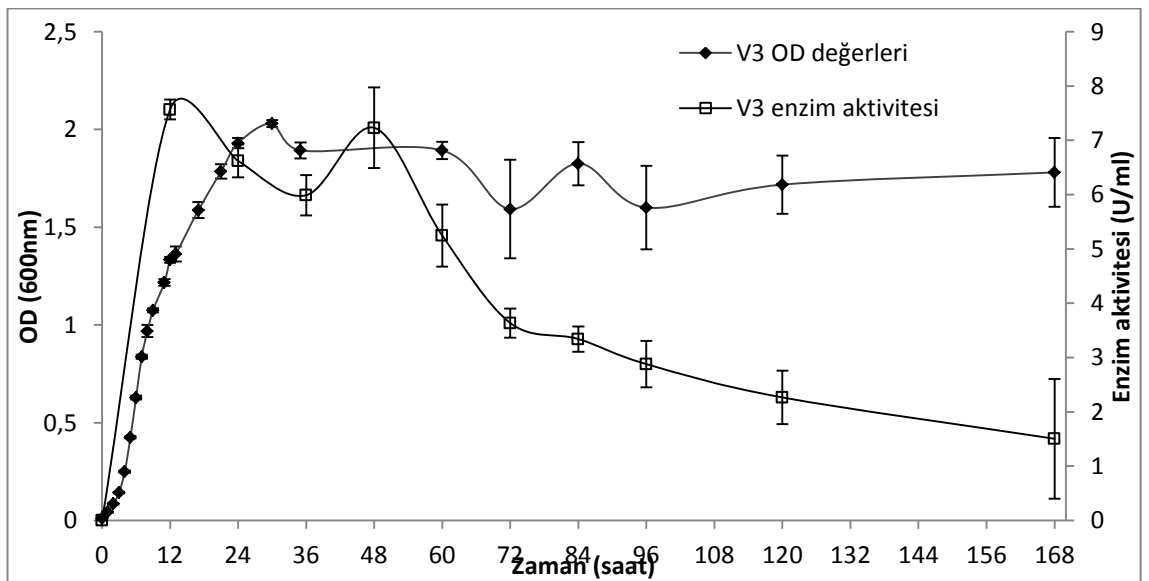
Şekil 4.8. SG2 suşunun zamana göre OD ve enzim aktivitesi değişim grafiği

Şekil 4.9’da SG3 suşuna ait optik yoğunluk ve SGTaz enzim aktivitesi değerleri gösterilmektedir. SG3 suşu en yüksek aktivitesini durağan faza geçmeden hemen öncesinde, 24. saatte ortalama 8 U/ml değerinde göstermiştir. İlerleyen sürede 96. saate kadar aktivitede önemli bir artış olmamıştır. SG3 suşunda fermentasyon sürecinin ilk 24 saatinin verimli olduğu, ancak fermentasyonun sonunda SGTaz aktivitesinde ulaşılan en yüksek aktivite değerine göre %37 kayba uğrandığı belirtilebilir.



Şekil 4.9. SG3 suşunun zamana göre OD ve enzim aktivitesi değişim grafiği

Şekil 4.10'da V3 suşuna ait optik yoğunluk ve SGTaz enzim aktivitesi değerleri gösterilmektedir. Diğerlerinden farklı olarak V3 suşu 12. saatte 7,6 U/ml değeri ile en yüksek SGTaz aktivitesi sergilemiştir. Bu süreçte hücre bölünmesinin de hızlı olduğu, ancak suşun durağan faza geçmesiyle birlikte hücre dışı sıvıda ölçülen enzim aktivitesinde de önemli kayıpların olduğu görülmüştür. Enzimin 60. saat itibari ile 5,2 U/ml olan aktivitesi düşme eğiline girmiş ve 168. saatte 1,5 U/ml aktivite değerine kadar düşerek aktivitesinin %80 kadarını kaybettiği belirlenmiştir.



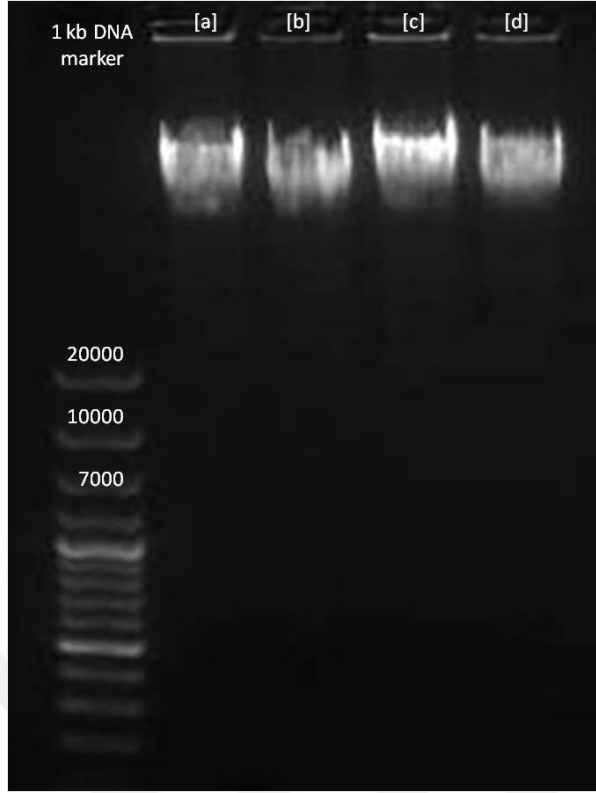
Şekil 4.10. V3 suşunun zamana göre OD ve enzim aktivitesi değişim grafiği

4.2. Klonlama Çalışmaları

4.2.1. DNA izolasyonu

Kalıp olarak kullanılacak *Bacillus* sp. SD5 suşuna ait genomik DNA'nın izolasyonu için -80 °C'deki SD5 stok kültüründen 100 µl örnek alınarak 4 ml LB Lennox sıvı besiyerine ekim yapılmış ve kültür 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, WI, ABD) ile 4 ml örnekten aynı anda 4 adet DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA miktarı ve kalitesi önce agaroz jel elektroforezi ve akabinde de florometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir.

Agaroz jelde yürütülen DNA ekstraktlarının (Şekil 4.11) oluşturduğu bantların benzer olması nedeniyle ekstraktlar birleştirilmiş ve DNA konsantrasyonu Quant-iT™ dsDNA assay kit (Molecular Probes®, Invitrogen, CA, ABD) yardımıyla Qubit™ (Invitrogen, ABD) flourometresi kullanılarak 177 ng/µl olarak belirlenmiştir.



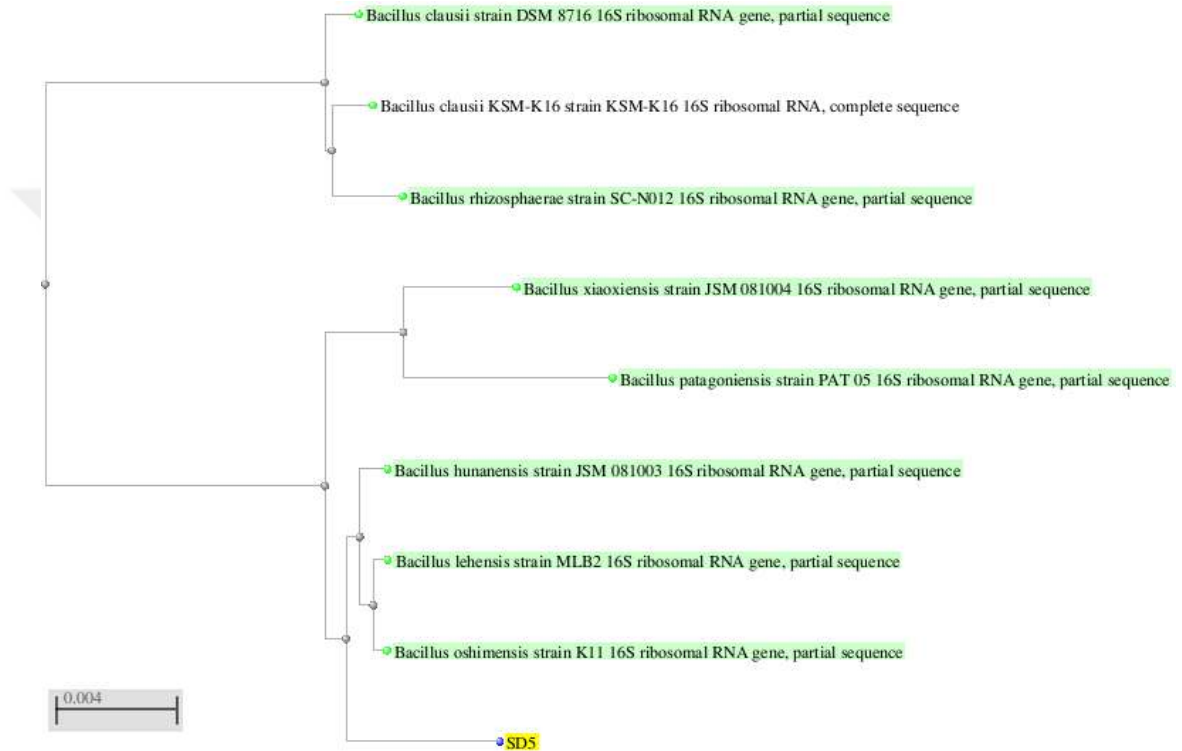
Şekil 4.11. *Bacillus sp.* SD5 suşu genomik DNA agaroz jel görüntüsü

4.2.2. 16S rDNA dizi analizi değerlendirmesi

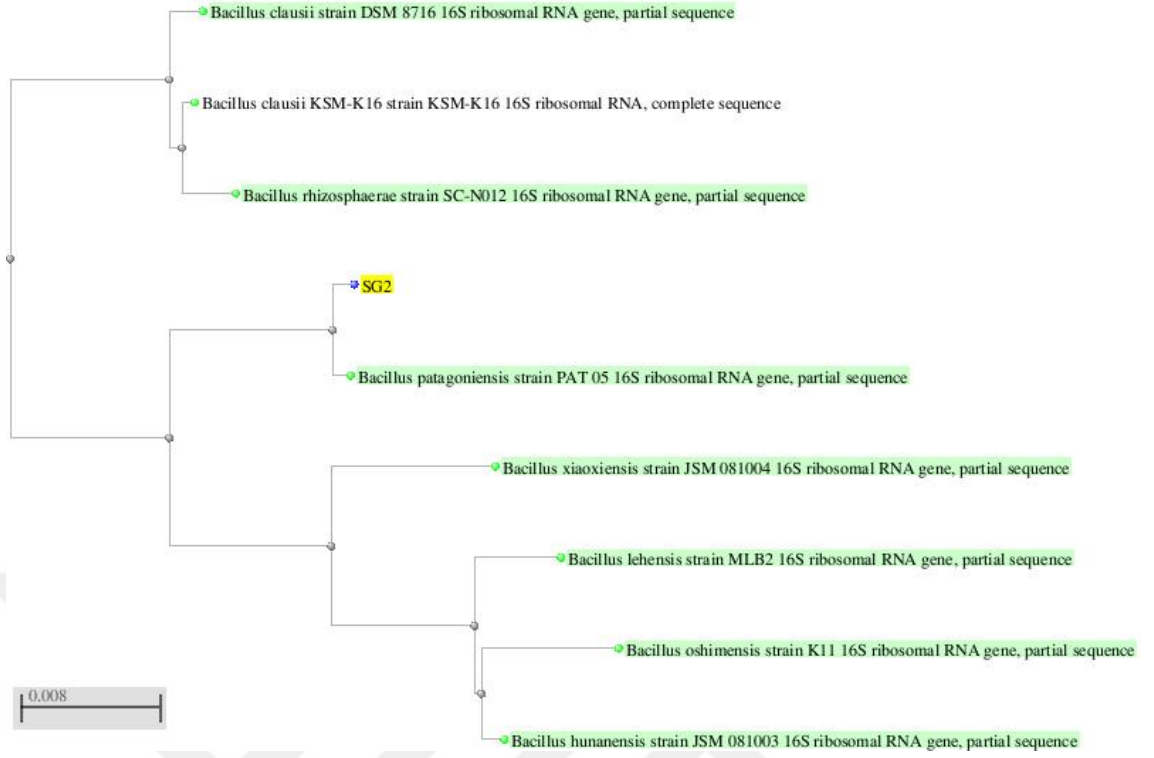
Salda ve Van göllerinden izole edilen SD5, SG2, SG3 ve V3 suşlarının 16S rDNA tanınması Ankara’da özel bir laboratuarda gerçekleştirilmiş ve laboratuarda elde edilen ham veriler ve 16S rDNA dizileri tarafımıza bildirilmiştir. Farklı dört suş için ham kromatogram sonuçları ile oluşturulan 16S rDNA dizileri Ek. 7.6’te verilmiştir. Ayrıca laboratuvar veri tabanı kullanılarak elde edilen filogenetik değerlendirmeler de tarafımıza bildirilmiştir (Ek. 7.7). Laboratuvar sonuçları izolatların dördünün de *Bacillus* cinsi bakteriler olduğu ifade etmektedir.

Dizlemede elde edilen kromatogramlar tedarik edilerek diziler incelenmiştir. Ham verilerden sağlanan diziler filogenetik değerlendirmenin tekrarlanabilmesi amacıyla kullanılmıştır. NCBI veritabanı üzerinden yapılan değerlendirmede dizilerin çeşitli *Bacillus* türlerine ait 16S rDNA dizilimlerine yakın olduğu belirlenmiş ancak %100 aynılık olmadığı görülmüştür. Bu durum izolatların daha önce çalışılmamış, özgün mikroorganizmalar olduklarını göstermiştir. İzolatların kültür koleksiyonlarında bulunan diğer bakterilere olan genetik uzaklıkları filogenetik ağaç olarak Şekil 4.12-

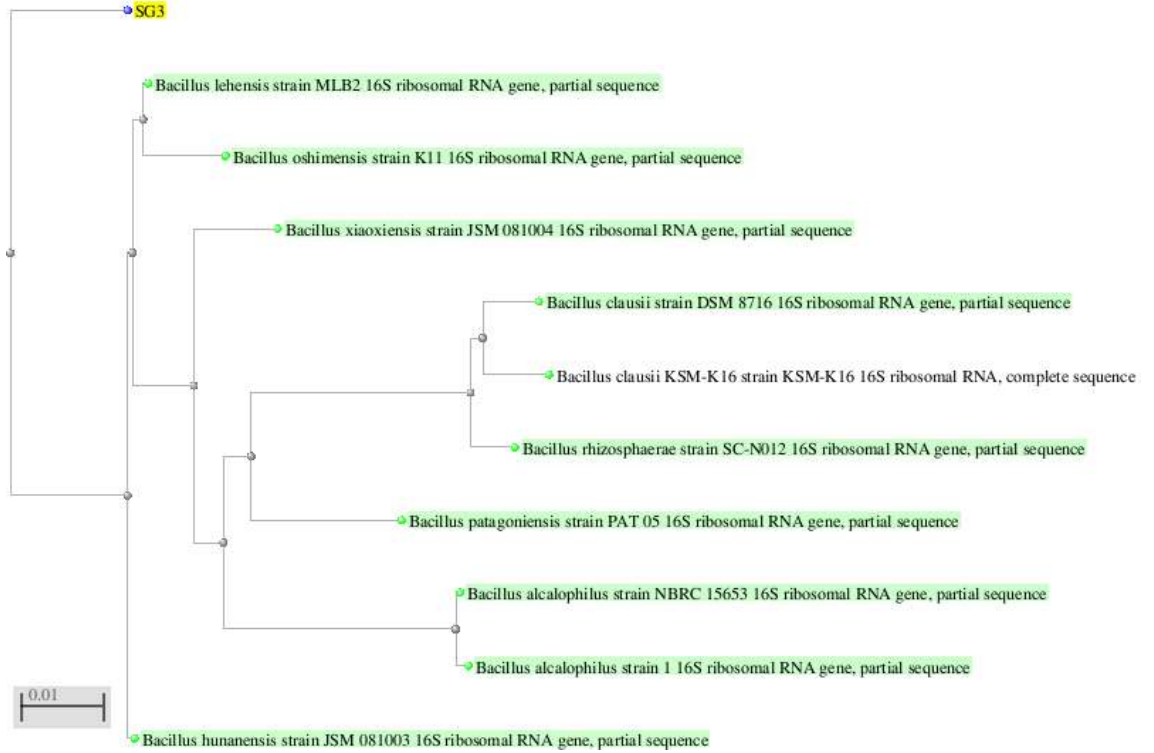
15’de gösterilmiştir. Hem laboratuvar sonuçları, hem de NCBI Veritabanı ile yapılan inceleme değerlendirildiğinde SD5 suşunun *Bacillus oshimensis*, SG2 suşunun *B. patagoniensis*, SG3 suşunun *B. lehensis* ve V3 suşunun ise *B. agaradhaerensis* olma ihtimalinin yüksek olduğu görülmektedir. Bakterileri tanılamada %100 kesin olabilecek bir çıkarım yapılamaması nedeniyle örneklerle bu çalışmada *Bacillus* sp. olarak değinilmiştir.



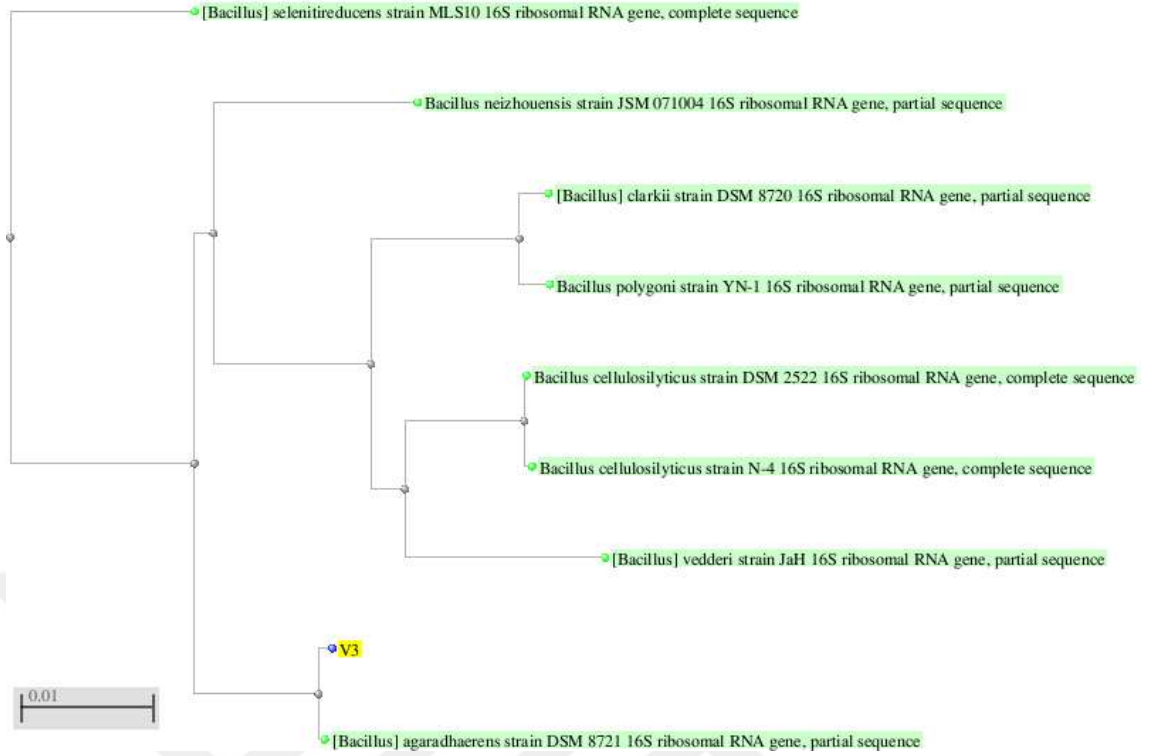
Şekil 4.12. SD5 suşunun diğer suşlar ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç



Şekil 4.13. SG2 suşunun diğer suşlar ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç



Şekil 4.14. SG3 suşunun diğer suşlar ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç

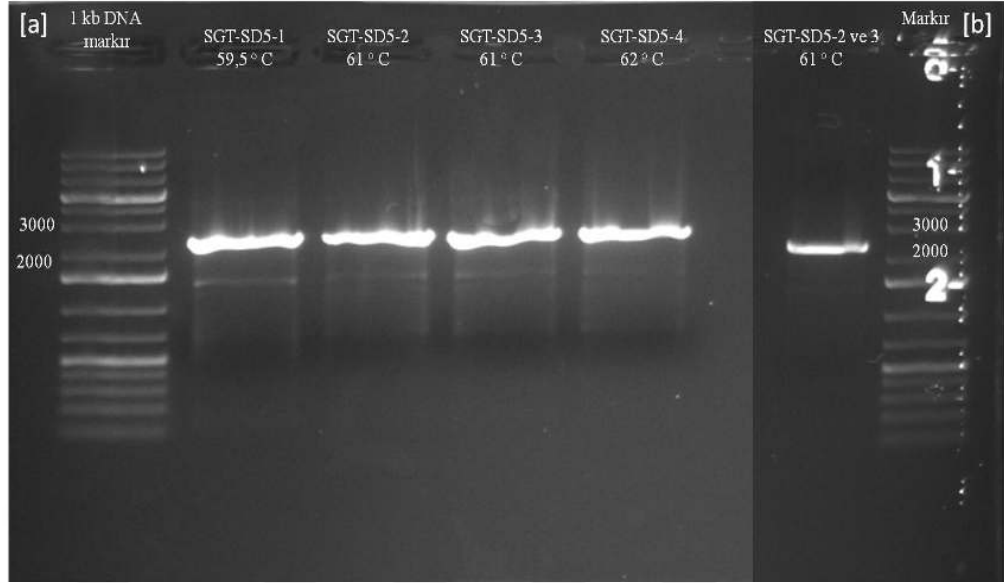


Şekil 4.15. V3 suşunun diğer suşlar ile yakınlığını gösteren filogenetik ağaç

16S rDNA dizi karşılaştırmasına göre en yakın suşlardan SGTaz geni üzerine çalışılmış 4 yakın suş seçilmiş (*Bacillus* TS1-1, *Bacillus* G1-2004, *Bacillus* KC201, *Bacillus* NR5 UPS) ve bu suşların SGTaz geni dizisindeki ortak dizi bölgelerine göre DNAMAN programı yardımı ile SGTaz tüm gen homologileri incelenmiş ve dizilerdeki korunmuş bölgelerden faydalanarak geni bütün olarak çoğaltmada kullanılabilecek bir çift primer tasarlanmıştır. Yaklaşık 2300 bp'lik bir DNA parçasını çoğaltmak üzere tasarlanan bu primer çifti CGTWGF2 CGTWGR2 şeklinde kodlanmıştır.

4.2.3. *Bacillus* sp. SD5 SGTaz geninin PCR yolu amplifikasyonu

CGTWGF2 (5'-CTTTCTTTACCTACTGTTGCGG-3') ve CGTWGR2 (5'-TCGTTATGTCCCAGCCTCT-3') primer çiftleri ile KOD Hotstart enzimi kullanılarak farklı bağlama sıcaklıkları uygulanarak (sıcaklık gradienti ile) PZR gerçekleştirilmiştir. Ardında doğrulama ve PZR ürünlerinin kalitesinin belirlenmesi amacı ile 1 µl örnek agaroz jelde yürütülmüştür. Yaklaşık 2.200 bp'lik bir bölgenin amplifikasyonu beklendiği şekilde jelde doğrulanmıştır (Şekil 4.16).

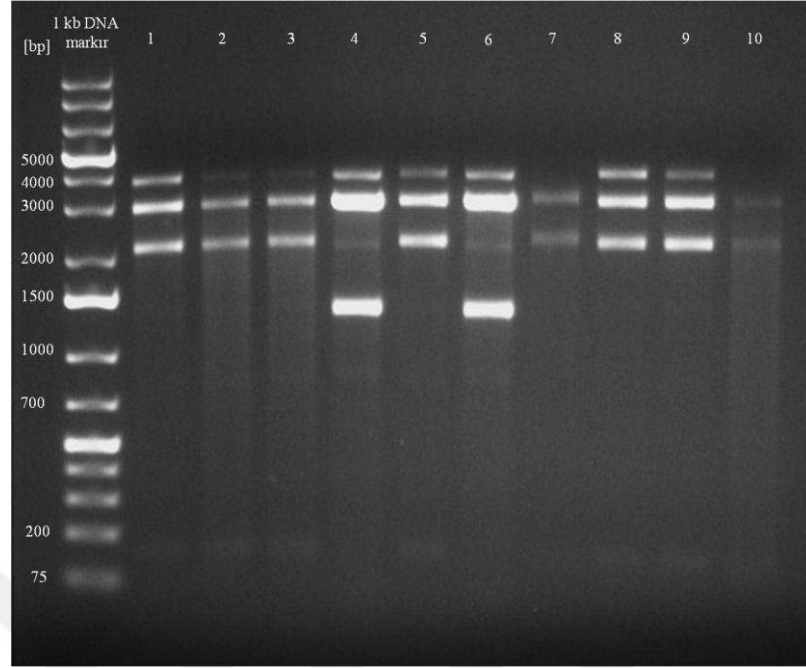


Şekil 4.16. PZR ile elde edilen SGTaz geninin agaroz jel görüntüsü; a) saflaştırma öncesi farklı bağlanma sıcaklıkları ile elde edilen PZR ürünleri, b) PZR ürünleri saflaştırıldıktan sonra yürütülen jelin görüntüsü

Örnekler hedef bölgeyi (SGT), gen kaynağını (SD5) ve PCR tüplerini (1-4) belirtecek şekilde kodlanmıştır. SGT-SD5-2 ve SGT-SD5-3 örnekleri karıştırılarak MinElute PZR purification kit (Qiagen, CA, ABD) ile DNA saflaştırılmış 15 ml 1X TE tamponu içinde elüsyon edilmiş ve 2 µl örnek tekrar agaroz jelde yürütülmüştür.

4.2.4. PZR yoluyla çoğaltılan *Bacillus sp.* SD5 SGTaz geninin klonlanması

SGTaz geni olduğu düşünülen DNA parçası pJET 1.2 plasmid vektörüne klonlanmıştır. Bunun için oluşan küt uçlu PZR ürünlerinin BglII enzimi ile lineer hale getirilmiş pJET vektörüne ligasyonu sağlanmıştır. Ligasyon karışımından alınan 3 µl ve 5 µl örnek kompetent hale getirilmiş *E. coli* DH5α suşuna transforme edilmiş ve LB ampicilinli petri plakalara yayma yöntemi ile ekilmiştir. Gece boyu 37 °C’de inkübasyon sonrası oluşan kolonilerden 10 adet seçilerek 3 ml LB Miller ampicilinli sıvı besiyerine ekilmiş ve gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Kültürlerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ardından BglII enzimi ile kesilerek doğruluğun belirlenmesi amacıyla agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. SGTaz geninin transforme edildiği *E. coli* DH5α hücrelerinden rastgele 10 adet seçilen kolonilerden izoleedilen plazmidlerin BglII enzimi ile kesimi sonrasında yürütülmesi ile elde edilen agaroz jel görüntüsü

Doğru parçayı taşıdığı düşünülen ve 1, 5, 8, 9 nolu kuyucuklarda yürütülen plazmidleri taşıyan *E. coli* hücreleri -80 °C’de stoklanmış ve 5 numaralı kuyucukta yürütülen plazmid dizi belirleme işlemi için analiz labotatuvarına gönderilmiştir.

4.2.5. *Bacillus sp.* SD5 SGTaz genine ait nükleotid dizisi

Dizi belirleme amacıyla kullanılan pJET 1.2 F, pJET 1.2 R primer çiftleri ile SGTaz geninin tamamının dizisi belirlenememiş, tüm dizisinin aydınlatılabilmesi amacıyla genin iç bölgesinden uygun primerler tasarlanmıştır. Tüm gen dizisinin ortalarına yakın bölgelerinden tasarlanan cgtseqF ve cgtseqR primer çiftleri tasarlanmıştır (primer yürüyüşü). Bu primerler yardımı ile elde edilen diziler daha önce elde edilen dizi bilgileriyle birlikte değerlendirildiğinde SD5 SGTaz geninin dizisi belirlenebilmiştir. Bu dizi ve karşılık geldiği protein amino asit dizilimi Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Primer yürüyüşü analizi pJET 1.2 F, pJET 1.2 R, cgtseq F ve cgtseq R primer çiftleri ile genin dizisi en az 3’er kere birbirini doğrulayacak şekilde tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. SD5 suşunun SGTaz geni bölgesi için belirlenen baz ve kodladığı aminoasit dizisi.

<i>Bacillus</i> sp. SD5 (1-2025)	
SGTaz olgun gen	
Toplam aminoasit sayısı: 674, MA:75198	
1	GACGTAACAAACAAAGTCAATTACTCAAAAGATGTGATTTACCAGGTTGTTACCGATCGA
1	D V T N K V N Y S K D V I Y Q V V T D R
61	TTCTCTGACGGGAATCCTGGCAACAATCCTTCAGGCGCTATCTTTAGTCAAAACTGTATA
21	F S D G N P G N N P S G A I F S Q N C I
121	GATCTCCATAAGTATTGTGGTGGGGACTGGCAAGGGATTATAGACAAAATCAATGACGGT
41	D L H K Y C G G D W Q G I I D K I N D G
181	TACTTAACTGATTTAGGCATTACGGCACTATGGATTTCTCAGCCGGTCGAAAATGTTTAC
61	Y L T D L G I T A L W I S Q P V E N V Y
241	GCCTTACACCCAAGCGGCTATACCTCCTACCATGGATATTGGGCTCGAGATTACAAAAAG
81	A L H P S G Y T S Y H G Y W A R D Y K K
301	ACAAACCCTTACTATGGGAATTTTGATGACTTTGATCGTTTAATGAGTACCGCACATAGC
101	T N P Y Y G N F D D F D R L M S T A H S
361	AATGGGATAAAGGTAATCATGGATTTACGCCAAATCATTCACCTGCACTTGAAACA
121	N G I K V I M D F T P N H S S P A L E T
421	AACCCTAACTATGTTGAAAATGGTGCGGTTTATAATAATGGCGCATTATTAGGCAACTAT
141	N P N Y V E N G A V Y N N G A L L G N Y
481	TCAAATGATCAACATAACCTCTTTTACCATAATGGCGGAACAGACTTCTCTTCTTATGAA
161	S N D Q H N L F H H N G G T D F S S Y E
541	GATAGCATCTACAGAACTTATATGATTTGGCAGACTATGATTTAAACAACACAGTCATG
181	D S I Y R N L Y D L A D Y D L N N T V M
601	GATCAGTATTTAAAGGAGTCGATTAAGTTCTGGTTAGATAAAGGGATTGATGGCATTTCGA
201	D Q Y L K E S I K F W L D K G I D G I R
661	GTAGATGCCGTTAAGCATATGTCAGAAGGGTGGCAAACCTCTTTAATGAGCGAAAATCTAT
221	V D A V K H M S E G W Q T S L M S E I Y
721	TCGCATAAACCTGTTTTCACTTTTGGAGAATGGTTTTTAGGATCAGGAGAAGTTGATCCC
241	S H K P V F T F G E W F L G S G E V D P
781	CAAAACCATCACTTCGCTAATGAAAGTGGTATGAGTTTATTAGATTTCGAATTCGGTCAA
261	Q N H H F A N E S G M S L L D F Q F G Q
841	ACCATTGAAACGTCTTAAAAGATCGCACAAGCAACTGGTATGATTTTCATGACATGATA
281	T I R N V L K D R T S N W Y D F H D M I
901	AAAAGTACTGAAAAAGAGTATAACGAGGTCATTGATCAAGTAACCTTTATTGATAATCAC
301	K S T E K E Y N E V I D Q V T F I D N H

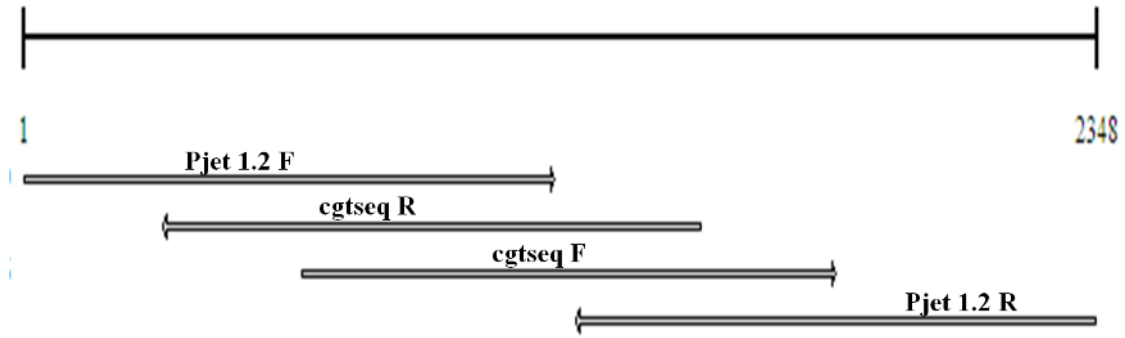
Devamı Arkada

Çizelge 4.1'in devamı

961	GACATGAGTCGTTTTTCGGTAGGATCATCTTCAAACCGTCAGACAGATATGGCACTAGCT
321	D M S R F S V G S S S N R Q T D M A L A
1021	GTCTTGCTTACTTCTCGTGGTGTACCGACAWTTTACTACGGGACAGAGCAGTATGTAACA
341	V L L T S R G V P T X Y Y G T E Q Y V T
1081	GGTGGCAACGACCCTGAAAATCGCAAACCATTGAAAACATTTGATCGGTCTACCAACTCC
361	G G N D P E N R K P L K T F D R S T N S
1141	TATCAAATCATCAGTAAACTTGCTTCACTACGCCAAACAAATTCGCGCTTAGGCTATGGC
381	Y Q I I S K L A S L R Q T N S A L G Y G
1201	ACTACAACGAACGTTGGCTGAACGAAGACATTTATTTTTTTGAAAGAAAGTTTGGCACT
401	T T T E R W L N E D I Y F F E R K F G T
1261	AGTATTGTATTAACGCTGTCAATAGCAGTAATAGTAACCAGACGATCACTAATTTAAAC
421	S I V L T A V N S S N S N Q T I T N L N
1321	ACCTCTTTACCTCAAGGGAACCTATACAGATGAACTACAGCAACGTTTAGATGGAAACACG
441	T S L P Q G N Y T D E L Q Q R L D G N T
1381	ATTACTGTTAACGCCAATGGCGCCGTAAATTCCTTTCCATTACGAGCAAATAGCGTAGCG
461	I T V N A N G A V N S F P L R A N S V A
1441	GTTTGGCAAGTAAGCAACCCCTCTACGTCTCCTCTAATCGGCCAAGTAGATCCTATGATG
481	V W Q V S N P S T S P L I G Q V D P M M
1501	GGTAAGGCCGGAATACCATAACAGTAAGCGGTGAAGGATTTGGTGATGAGAGAGGAAGC
501	G K A G N T I T V S G E G F G D E R G S
1561	GTTCTCTTTGACTCAACCTCTTCTGAAATTATTTCTTGGTCAAATACAGAAATAAGCGTA
521	V L F D S T S S E I I S W S N T E I S V
1621	AAGGTGCCTAATGTAGCAGGCGGTTATTATGATCTATCCGTCGTAAGTGCAGCAAACATA
541	K V P N V A G G Y Y D L S V V T A A N I
1681	AAAAGCCCTACTTACAAAGAGTTTGAAGTATTGTCAGGCAATCAAGTCAGTGTCGCTTT
561	K S P T Y K E F E V L S G N Q V S V R F
1741	GGTGTTAACAATGCCACAACGAGCCCAGGAACCAATTTATATATATCGTTGGGAATGTGAGC
581	G V N N A T T S P G T N L Y I V G N V S
1801	GAGCTGGGGAATTGGGATGCTGATAAAGCAATTGGACCTATGTTTAACCAAGTGATGTAC
601	E L G N W D A D K A I G P M F N Q V M Y
1861	CAATACCCAACGTGGTACTATGATATTAGCGTTCCTGCCGGAACCACTTGAATACAAA
621	Q Y P T W Y Y D I S V P A G K N L E Y K
1921	TACATTAAAAAAGATCAGAACGGTAACGTTGTCTGGCAAAGTGGCAATAATCGAACCTAT
641	Y I K K D Q N G N V V W Q S G N N R T Y
1981	ACGTCACCTACTACCGGAACAGATACGGTTATGATTAAATTGGTAA
661	T S P T T G T D T V M I N W *

Elde edilen SGTaz geni baz dizisi NCBI veri tabanında değerlendirilmiş ve elde edilen verilerde %100 aynılık (en yüksek %98) olmadığı görülmüştür. Bu durum izolatların daha önce çalışılmamış, özgün mikroorganizmalar oldukları düşünüldüğünden beklenen bir sonuçtur. SGTaz geninin kültür koleksiyonlarında bulunan diğer bakterilere ait olan SGTaz geni dizileri ile olan genetik uzaklıkları filogenetik ağaç olarak Ek 7.8’de gösterilmiştir.

Çoğaltılan DNA fragmanı ve kullanılan primer bölgeleri Şekil 4.18 gösterilmektedir. NCBI Veritabanı üzerinden elde edilen ve daha önce primer tasarımında kullanılan farklı bakteri suşlarına ait SGTazlar ile homoloji değerlendirmesi DNAMAN programı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen homoloji haritası Ek. 7.9’te verilmiştir.



Şekil 4.18. SGTaz gen dizisinin belirlenmesi ve kullanılan primerlerin şematik gösterimi

4.2.6. SGTaz Geninin Farklı Primerlerle Çoğaltılması, Ürünlerin pPICZaA Vektörüne Bağlanması ve Vektörün Kontrolü

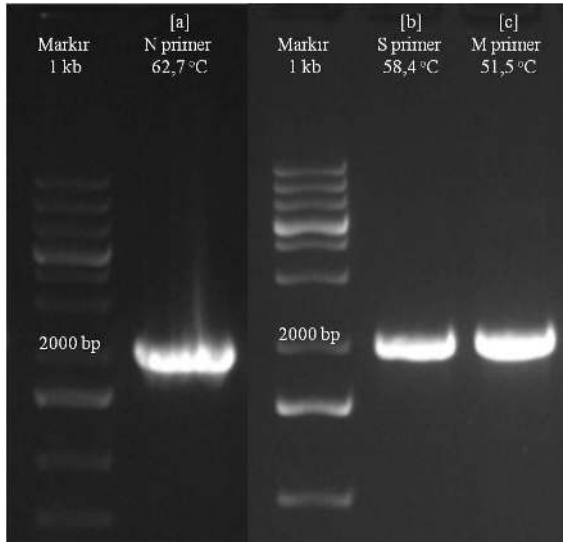
Ekspres edilecek rekombinant proteinin saflaştırılmasında faydalı olacağı düşünülerek PZR ürünüde histidin etiket (HisTag) bölgesini de içerek şekilde PZR ürünlerinin elde edilmesi planlanmıştır. Tasarlanan primerlerde ayrıca kesim bölgeleri ilave edilmiştir. Çalışma için tasarlanan 3 primer çifti ve taşıdıkları bölgeler Şekil 4.19’de verilmiştir. *Pichia pastoris*’e transformasyonda kullanılacak pPICZaA vektöründe polihistidin kodlayan bir dizi zaten mevcut olduğu için bu diziye ilave

olarak geni bütünüyle çoğaltabilen CGTexS-F ve CGTexS-R primer çifti tasarlanmıştır. İlerleyen bölümlerde anlatımda kolaylık sağlaması için bu primer çifti S primerleri olarak isimlendirilmiştir ve bunlarda transformasyon öncesi hazırlıkta değerlendirilecek SalI kesim dizileri bulunur. Ayrıca, polihistidin bölgesinin proteine dahil olmaması için çoğaltılacak dizide bir stop kodonu ve Not I kesim bölgesini ilave edecek dönüş (reverse) primeri CGTexN-R tasarlanmıştır. CGTexS-F ve CGTexN-R primer çifti N primerleri olarak adlandırılmıştır. Son olarak, ekspres olacak proteine doğrudan eklemek üzere CGTEXPF-SalI ve CGTEXPR-NotI (yani M primer çifti) tasarlanmıştır. Normal koşullarda pPICZαA ile *P. pastoris*'e gen aktarılırken XhoI-SalI gibi farklı iki enzimin kullanılması sözkonusudur. Ancak, SGTaz gen dizisi içinde ortak kesim bölgelerinin mevcut olması, kesimde değerlendirilebilecek enzimlerin gözden geçirilmesini gerektirmiştir. Bu sebeple geni içerden kesmeyecek, ancak XhoI ile linearize edilen pPICZαA vektörü ile birleşebilen uygun kuyruk yapısı (compatible end) oluşturacak SalI enzimi kesim bölgesi kullanılmıştır. Kex2 geni *P. pastoris* hücrelerinde kalsiyumdan bağımsız olarak işlev görebilen bir serin proteazı kodlar. XhoI kesim noktasında AAAAGA dizisi (Şekil 4.19'de Kex2 şeklinde belirtilmiştir) ilave edilerek pPPICZαA vektörü ile birleşmede enzimin kesim yapacağı bölge kodlanmış olur. Bu şekilde ekspresyon sırasında Kex2 kesim bölgesinden proteinin işlenmesi mümkün olabilmektedir.



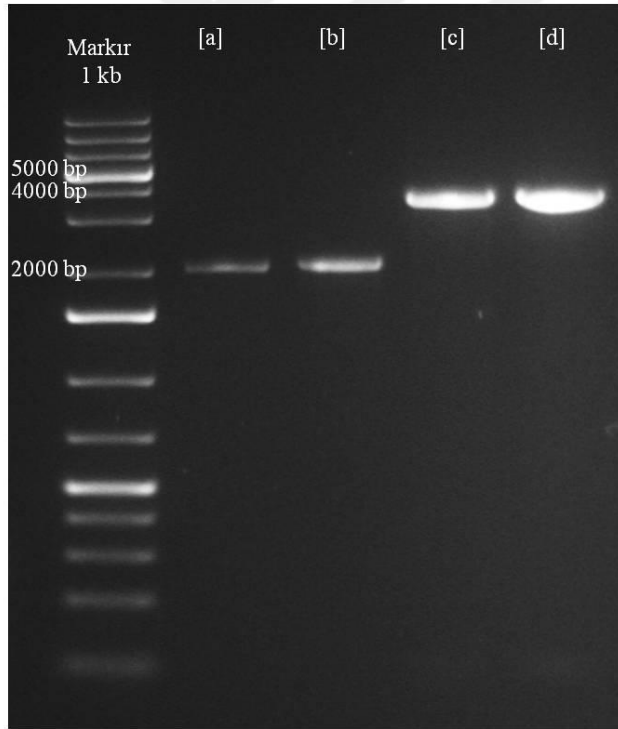
Şekil 4.19. Ekspresyon için tasarlanan primerler ve bazı özellikleri

Her 3 primer çifti ile PZR gerçekleştirilmiş ve en iyi çoğalma sağlayan bağlanma sıcaklıklarının uygulandığı tüpler seçilerek PZR ürünleri saflaştırılmıştır. Örnekler kontrol edilmek üzere agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 4.20'te saflaştırma işlemi sonrası agaroz jelde yürütülen PZR örnekleri görülmektedir.



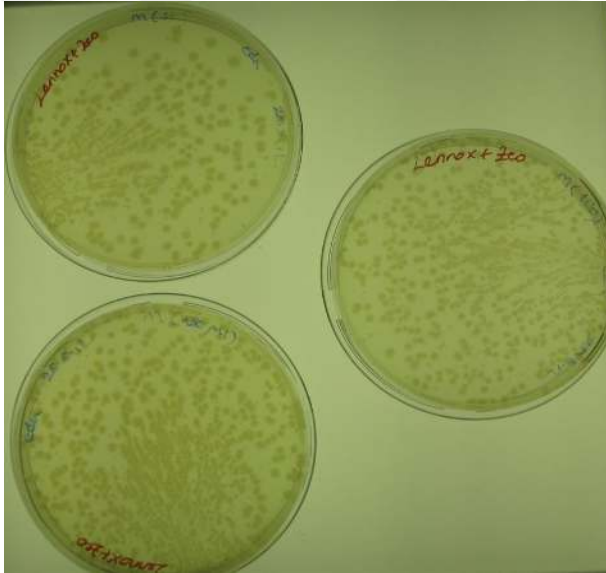
Şekil 4.20. *P. pastoris* 'te ekspresyon için tasarlanan primerler ve PZR ile elde edilen SGTaz geni; a) N primerleri b) S primerleri c) M primerleri

Saflaştırılan PZR ürünleri *P. pastoris* X33 mayasına aktarmada kullanılacak pPICZαA vektörü ile ligasyona hazırlamak üzere primerlerle ilave edilen restriksiyon enzimleri ile sindirilmiştir. Aynı şekilde ligasyonun sağlanacağı plazmid de uygun enzimlerle sindirilmiştir. N primer çiftinin oluşturduğu PZR ürünleri SalI ve NotI ile, karşılığında ligasyona gireceği plazmid XhoI ve NotI ile sindirilmiştir. S primer çiftinin PZR ürünleri SalI ile, karşılığında ligasyona gireceği vektör ise XhoI ile sindirilmiş ve akabinde defosforile edilmiştir. M primer çiftinin oluşturduğu PZR ürünleri ise yine SalI ve NotI ile sindirilirken karşılığında ligasyona gireceği pPICZαA vektörü de XhoI ve NotI ile sindirilmiştir. Sindirim ürünleri PZR pürifikasyon kiti ile temizlenmiş ve agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.21). Ardından DNA içerikleri belirlenmiştir. N PZR ürünü 27,7 µg/ml, S PZR ürünü 12,6 µg/ml, M PZR ürünü 15 µg/ml, ve sırasıyla her bir PZR ürünü için kesilen plazmid DNA içeriği ise, 53,9 µg/ml, 63,3 µg/ml, 96,8 µg/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.21. Sindirme reaksiyonları sonrasında transformasyonda kullanılacak gen parçalarının ve lineerize vektörlerin yürütüldüğü agaroz jel görüntüsü; a) S primerleri ürünü b) M primerleri ürünü c) ve d) sırasıyla S ve M primerleri ile elde edilen ürünlerin bağlanacağı doğrusallaştırılmış pPICZαA vektörleri

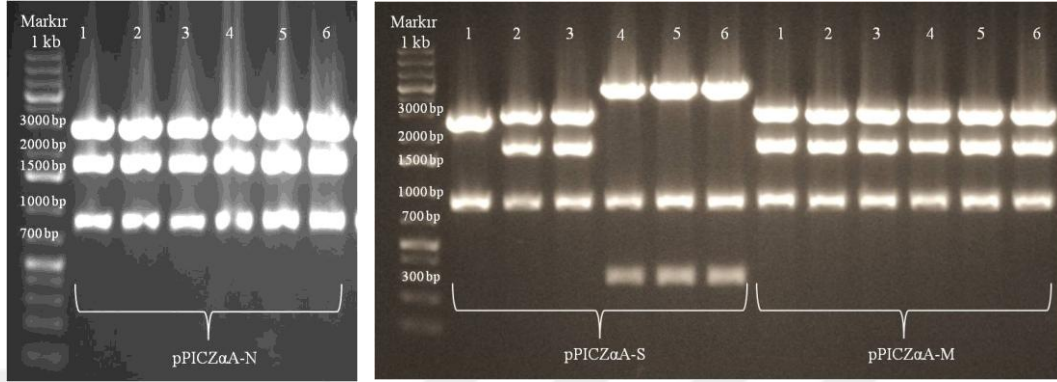
Restriksiyon endonükleazlarınca sindirilme işlemi sonrası PZR ürünleri ve lineer hale gelmiş vektörler ligasyon işlemine tabi tutulmuştur. *P. pastoris*'e transformasyon işleminde kullanılacak plazmid vektörlerin çoğaltılması amacıyla kompetent hale getirilmiş *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine transformasyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için her bir ligasyon çözeltisinden 10 µl kullanılmış, kalan ligasyon çözeltisi ise -20 °C sıcaklığında saklanmıştır. Transformasyon sonrası zeosin içeren LB Lennox katı besiyerine 50 µl, 100 µl ve 150 µl olacak şekilde, pozitif ve negatif kontrol içinse 150 µl transformasyon karışım yayma yöntemi ile ekilmiş ve plakalar gece boyu 20 °C de inkübasyona bırakılmış. Ertesi gün oluşan kolonilerden (Şekil 4.22) toplam 18 adet seçilmiştir.



Şekil 4.22. Zeosinli LB Lennox agar üzerinde geliştirilen transformantlar

Seçilen kolonilerden 4 ml LB Lennox zeosinli sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. Gece boyu geliştirilen kültürlerden plazmid purifikasyonu yapılmıştır. Plazmidlerin doğru fragmanı taşıdığının kontrolü, biri gen içinden diğeri vektörden olmak üzere seçilen NcoI ve XbaI enzimleri ile yapılmıştır. Şekil 4.23'de enzimle kesim ardından gerçekleştirilen elektroforezle edile edilen agaroz jel görüntüsü verilmektedir. Buna göre pPICZαA-N ve pPICZαA-M plazmidleri için tüm kolonilerin doğru parçayı taşımakta olduğu söylenebilir ve beklenildiği gibi yaklaşık 900, 1700 ve 3000 bp'lik bantlar görülmektedir. Ancak, pPICZαA-S için 1 nolu klonda transformasyon başarısız olmakla birlikte, 4, 5 ve 6 nolu klonlarda fragmanın ters bağlandığı düşünülmektedir. Doğru

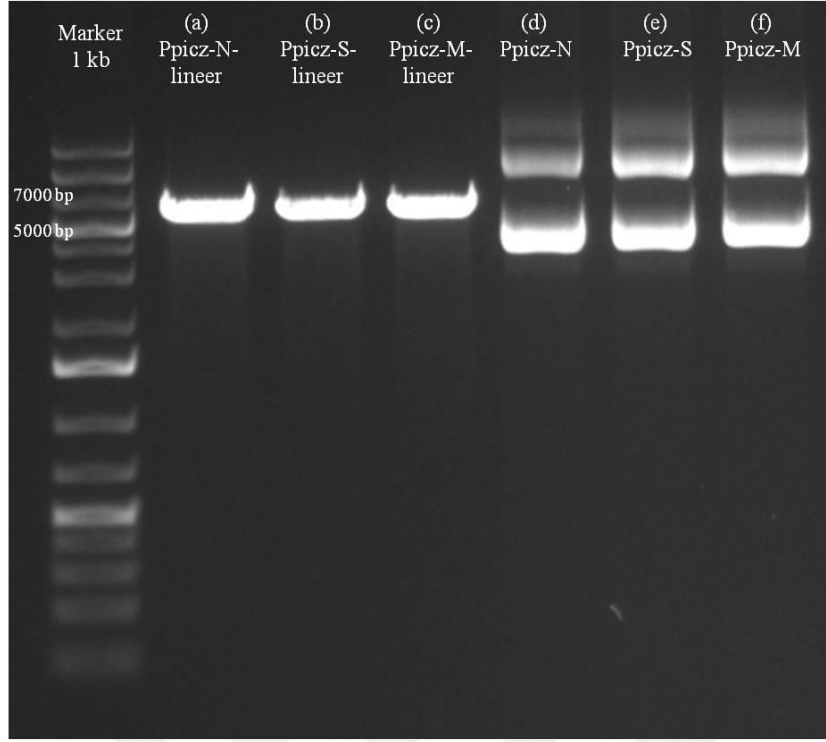
parçayı taşıdığı düşünölen klonlar daha sonra yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de depolanmıştır.



Şekil 4.23. Transformasyon işlemi sonrası seçilen kolonilerden izole edilen plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kontrolü

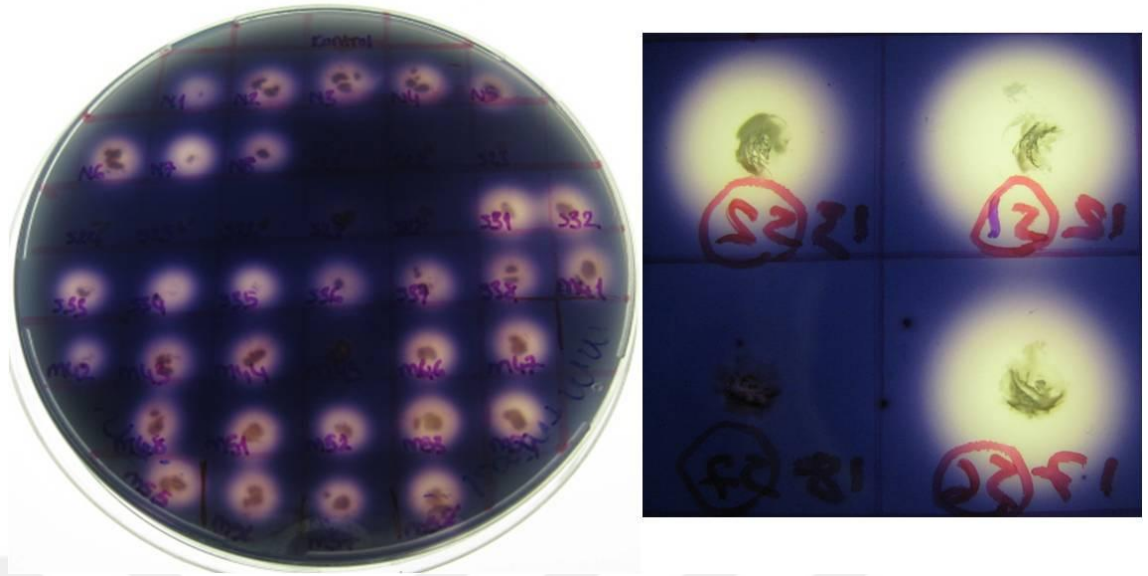
4.2.7. Konukçu *Pichia pastorise*' e transformasyonu ve rekombinant klonların eldesi

E. coli XL-1 Blue hücrelerine yapılan transformasyon ardından elde edilen plazmidlerden pPICZαA-N-2 klonu pPICZαA-S-3 ve pPICZαA-M-5 nolu klonları *Pichia pastoris* X33 transforme edilmek üzere seçilmiştir. Bunun için öncelikle DNA miktarı ölçölmüş ve içerikleri sırasıyla 393 µg/ml, 461 µg/ml, 525 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ardından plazmidler MssI (PmeI) enzimi ile 37 °C'de yarım saat inkübe edilerek lineer hale getirilmiştir. Örnekler agaroz jelde yürütölmüş ve görüntölenmiştir (Şekil 4.24). Yaklaşık 6000 bç olması gereken bantlar agaroz jel görüntüsünde doğrulanmıştır.



Şekil 4.24 a), b), c) sırasıyla linear hale getirilmiş pPICZαA-N-2, pPICZαA-S-3, pPICZαA-M-5 plazmidleri. d), e), f) enzimle linear hale getirilmemiş plazmidler

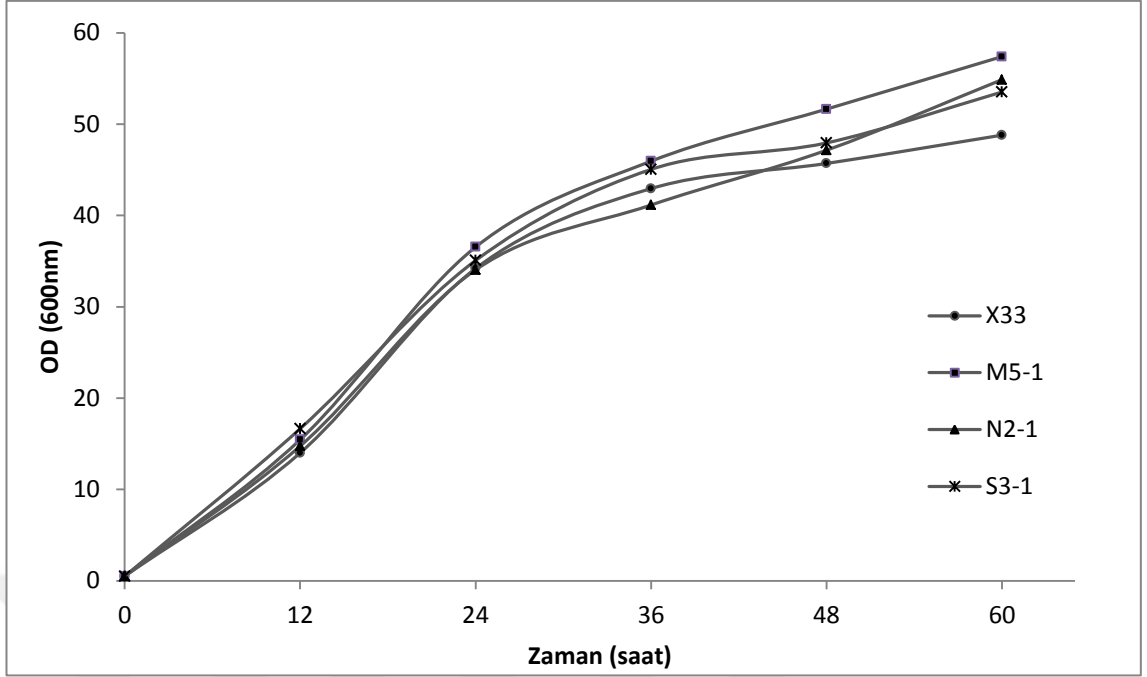
Lineerleştirme ardından elde edilen plazmidler kompetent hale getirilmiş *Pichia pastoris* X33 hücrelerine elektroporasyon ile transforme edilmiştir. Zeosin içeren YPD katı besiyerine ekilen transformantlardan rastgele 8'er adet seçilerek toplamda 24 adet klondan YPD katı besiyerine tek koloni elde edilecek şekilde ekim yapılmıştır. SGTaz enzimi üretme yeteneklerinin ön kontrolü için klonlar nişasta içerikli MM katı besiyerine ekilmiş ve gelişim sonrası üzerlerine Lugol çözeltisi damlatılarak hidroliz aktivitelerine bakılmıştır (Şekil 4.25). Bu analizde nişastanın Lugol çözeltisinde bulunan iyot ile oluşturduğu kompleks mor renk oluşturur. Koloniler etrafında mavi rengin oluşmaması hücre dışına salgılanan SGTazın nişastayı parçalayıcı etkisi ile ilişkilendirilir. Doğal olarak *Pichia pastoris* X33 etrafında hiç zon bulunmamaktadır. Bununla birlikte yoğunluklarının farklılığından dolayı değişik büyüklüklerde zon oluşturduğu düşünülen kolonilerden N2-1, S3-1 ve M5-1 kolonileri SGTaz salgılama yeteneklerinin kontrol edilmesi için seçilmiştir.



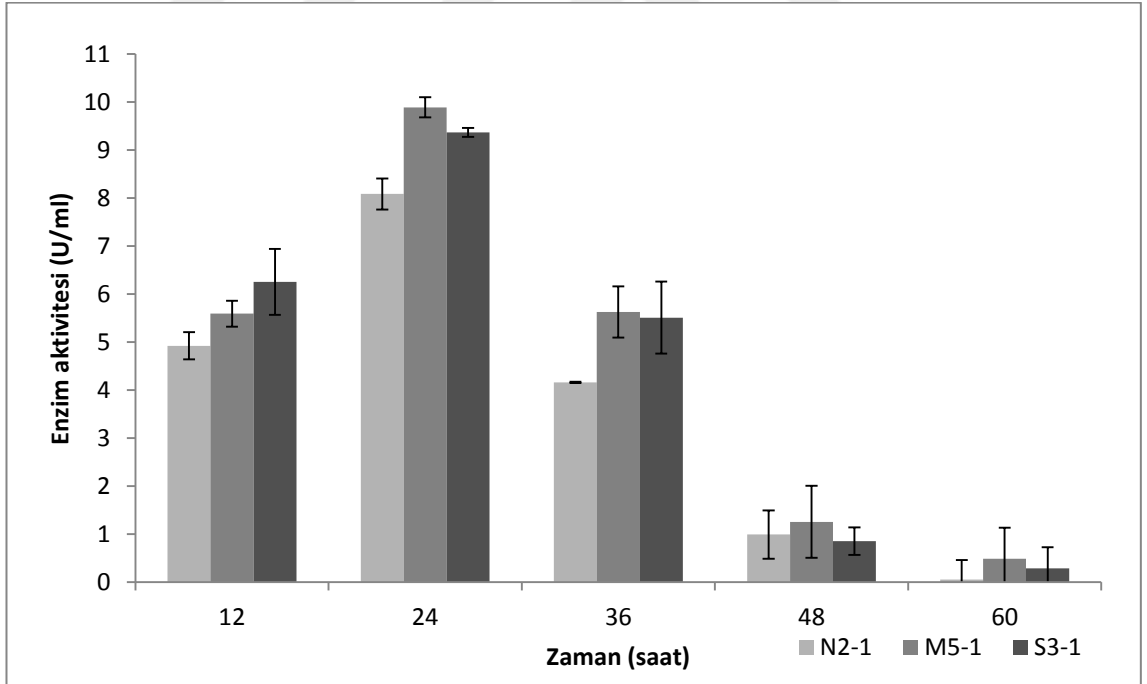
Şekil 4.25. Nişastalı MM katı besiyerinde *Pichia pastoris* transformantlarının oluşturduğu hidroliz aktivitesi

4.2.8. Klonların SGTaz salgılama yeteneklerinin belirlenmesi

Nişastalı MM katı besiyerinde gösterdikleri hidroliz aktivitesine göre seçilen klonlar bir gece YPD sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra BMGY sıvı besiyerine başlangıç OD'leri 0,5 civarında olacak şekilde aşılınmış ve ertesi gün optik yoğunlukları 5'in üzerine çıkacak şekilde geliştirilmiştir. Üreyen kültürlerdeki hücreler BMMY besiyerine aktarılarak metanol indüksiyonu başlatılmıştır. Bu kültürler geliştirilerek 12., 24., 36., 48. ve 60. saatlerde OD ve enzim aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. SGTaz genini içeren *Pichia pastoris* klonlarının optik yoğunluk (OD) değerleri

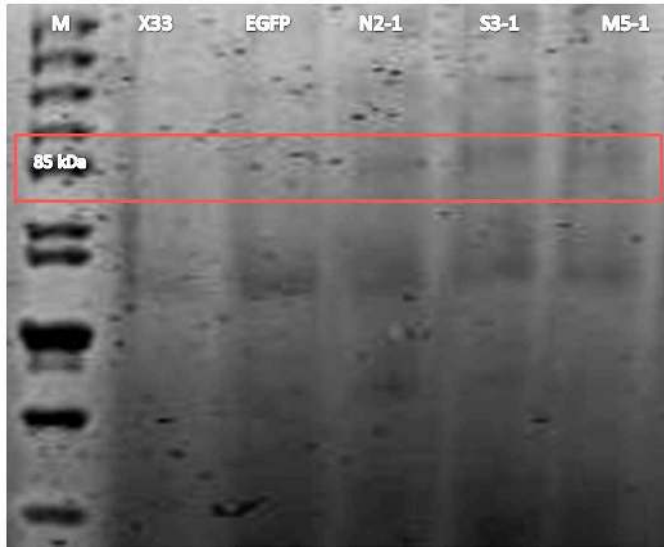


Şekil 4.27. SGTaz genini içeren *Pichia pastoris* suşu klonlarının SGTaz enzimi üretimi

Elde edilen verilere göre seçilen klonların hepsi en yüksek aktiviteyi OD'nin 30-40 arasında olduğu 24. saat aralığında göstermiştir. Klonlar 36. saatte aktivitelerinin yaklaşık %50'sini kaybetmişlerdir ve 60. saatte bu oran %90 civarlarını bulmuştur.

Hücreler durağan faza yaklaştıkça enzim aktivitesi düşmüştür. Buna göre optimum inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.27). Belirtmek gerekir ki bu değerlendirme ancak söz konusu fermantasyon koşulları için geçerlidir. Besiyeri hacmi veya çalkalama hızı gibi ortam koşullarının değişmesi fermantasyon sürecini etkileyeceği göz önünde bulundurulmalıdır.

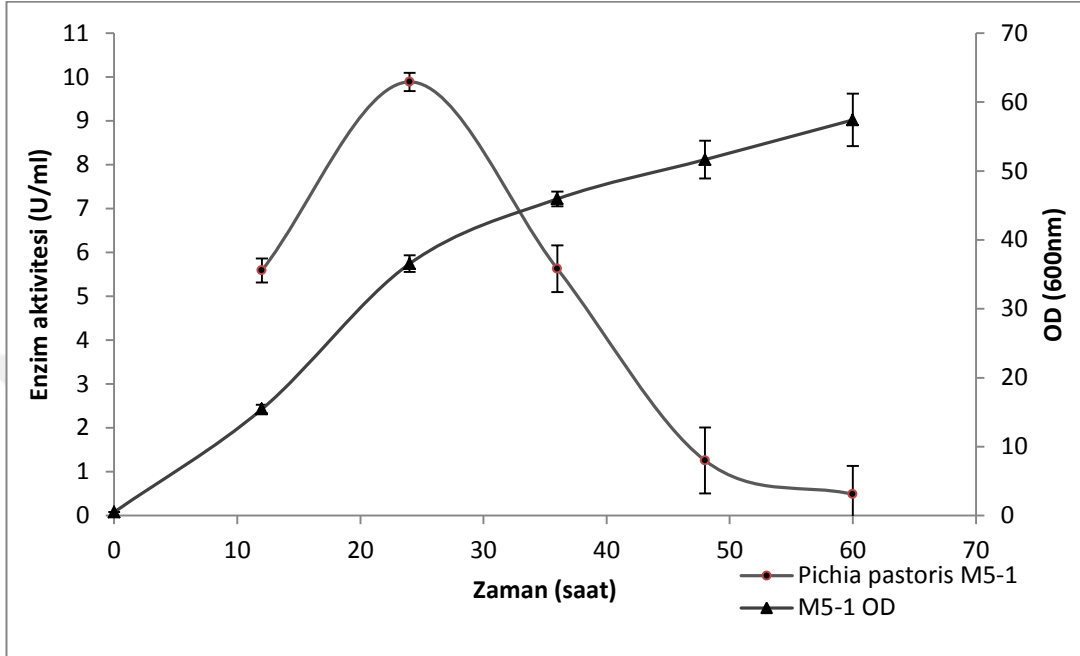
BMGY besiyerinde 24 saat geliştirilen hücre kültürlerinin fermantasyon sıvılarıyla hazırlanan örneklerin yürütüldüğü SDS-PAGE jelinde salgı proteinleri bantlar halinde birbirinden ayrılmıştır. Şekil 4.28'ye göre salgılanan SGTaz proteini 85kDa civarında bir bant olarak gözlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan *Pichia pastoris* X33 suşu ve *Pichia pastoris* X33-EGFP suşlarında bu bant görülmemektedir.



Şekil 4.28. SDS-PAGE analizi ve klonların 24. saat fermantasyon sıvılarında protein karşılaştırılması, M: protein standardı

Geliştirilen transformantlardan N2-1 suşu SGTaz proteininde polihistidin kuyruğunu ihtiva etmemektedir. Polihistidin kuyruğu ihtiva eden S3-1 suşunda ise olgun SGTaz geni sonuna stop kodonu eklenmemiştir, bundan dolayı proteinin salgılanması aşamasında maya pPICZαA vektöründe bulunan polihistidin kuyruğu ve stop kodonunu kullanmaktır. Ancak bu durumda, S3-1 SGTaz geni ek olarak pPICZαA vektöründe n gelen c-myc epitop baz dizisini de içermektedir. Bu açıdan polihistidin kuyruğu ve stop kodonunu içeren primerlerle oluşturulan ve fazladan baz dizisi içermeyen, ayrıca fermantasyonun 24. gününde en yüksek aktiviteyi gösteren *Pichia*

pastoris X33-M5-1 transformantı, enzim purifikasyonu ve karakterizasyonunda kullanılmak üzere seçilmiştir. Şekil 4.29’de M5-1 transformantının fermantasyon süresince gelişim eğrisi ve enzim aktivitesi değerleri gösterilmektedir.



Şekil 4.29. SGTaz genini içeren *Pichia pastoris* M5-1 suşu klonunun SGTaz enzimi üretimi ve OD değerleri

4.3. SGTaz enziminin karakterizasyonu

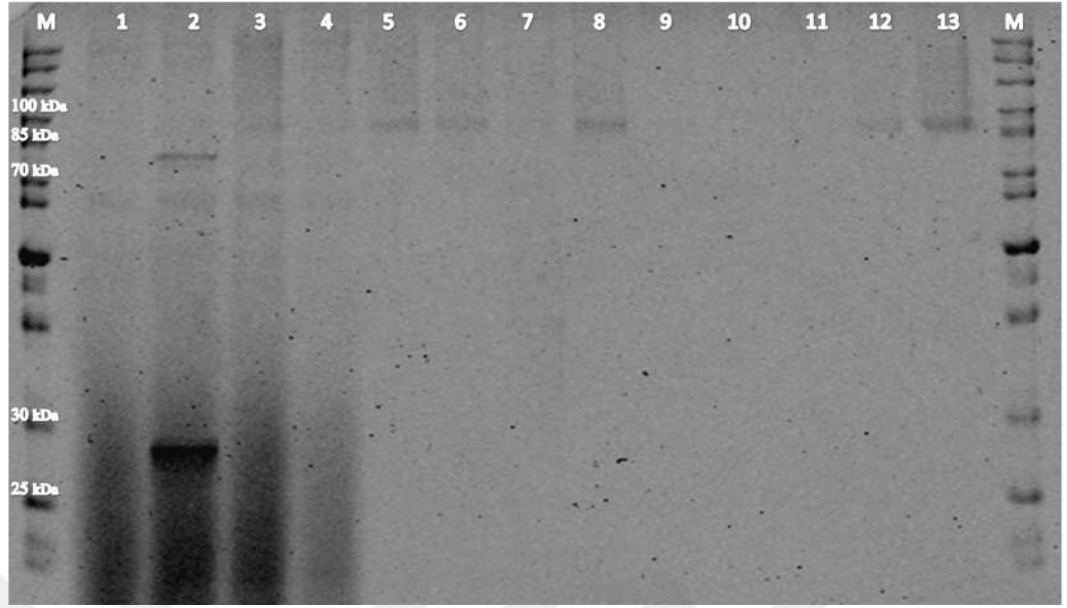
Bacillus sp. SD3 suşundan elde edilen SGTaz enzimi geninin *Pichia pastoris* X33 mayasına transforme edilmesiyle elde edilen *Pichia pastoris* M5-1 klonunun fermantasyonu sonucu üretilen rekombinant SGTaz enzimi, hücre dışı sıvıdan polihistidin etiketi ile saflaştırma metoduna göre kısmen saflaştırılmıştır. Saflaştırma öncesi elde edilen hücre dışı sıvının 15 ml'si, asidik olan besiyerinin pH'sını kolona tutunma pH'sı civarına yükseltmek için gece boyu %5 gliserol içeren 1X PBS tamponunda 4 °C'de diyaliz edilmiş ve saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Ardından SDS-PAGE, Western blot ve protein miktarı analizleri ile proteinin moleküler ağırlığı ve saflaştırma başarısı ve oranı belirlenmiştir. Saflaştırılan rekombinant SGTaz enziminin optimum sıcaklık ve pH koşulları ile farklı sıcaklık ve pH'daki stabilitesinin belirlenmesi analizleri yapılmıştır. Son olarak HPLC analizi ile kısmen saflaştırılmış rekombinant enzimin ürettiği farklı SD ürün profili ve oranları hesaplanmıştır.

4.3.1. Rekombinant SGTaz enziminin saflaştırılması

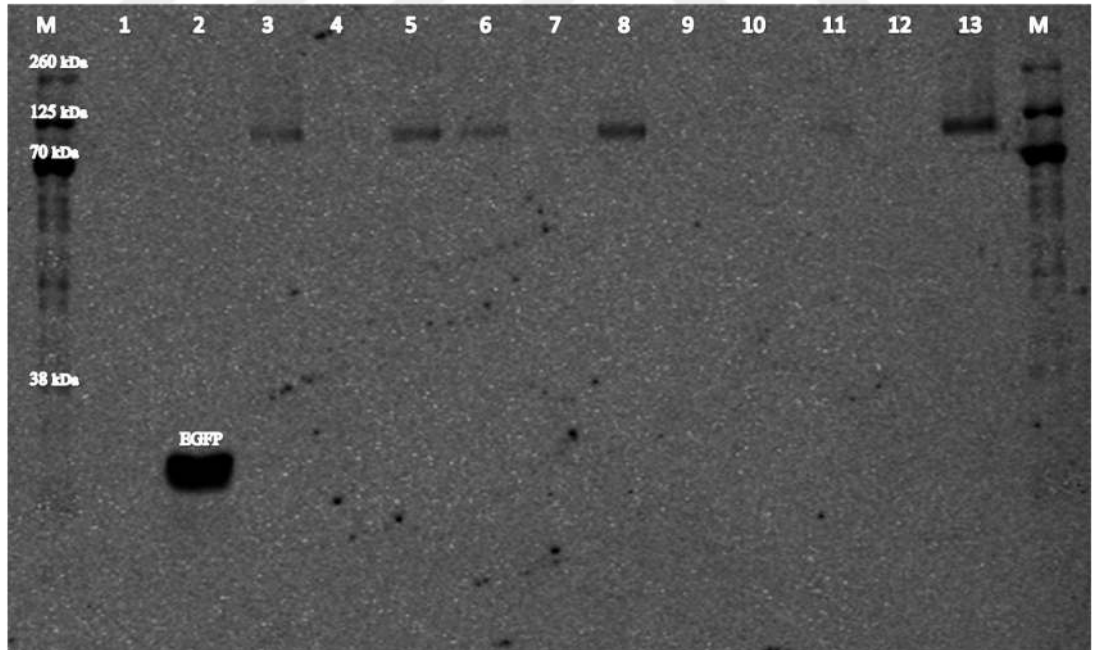
Pichia pastoris M5-1 suşu 24 saat metanol indüksiyonu ile inkübasyona bırakılmış ve SGTaz enzimi üretimi sağlanmıştır. Elde edilen yaklaşık 50 ml hücre dışı sıvının 15 ml'si 1X PBS tamponunda (pH 7,4) gece boyu 4 °C'de diyalize bırakılmıştır. Dengeleme tamponu ve reçine ile yarıyarıya karıştırılan hücre dışı sıvı nikel kolondan geçirilmiş, ardında kolona tutunan polihistidin etiketli SGTaz enzimi farklı imidazol konsantrasyonları ile hazırlanmış solüsyonlar ile muamele edilerek yıkanmış ardından elüsyonları sağlanmıştır. Saflaştırmanın hemen ardından aynı anda SDS-PAGE ve Western blot analizleri gerçekleştirilmiştir.

Jel analizleri sonuçlarına göre kolondan geçirilen süzüntüde (flow-through) SGTaz proteini bandı görülmemektedir. Bu durum hücre dışı sıvıdaki SGTaz proteinlerinin kolona tutunmuş olduğunu göstermektedir. Filtreden geçirilen yıkama tamponlarının süzüntülerinden I. ve II. yıkama süzüntüsünde SGTaz proteini bandı görülmekte fakat III. süzüntüde görülmemektedir. Bu durumun filtreden geçirilen hücre dışı sıvıdaki proteinlerin bir kısmının zayıf bir şekilde kolona bağlandığı ve bir kısmının yıkama tamponu ile süzüntüye geçtiğini göstermektedir. Yıkamanın ardından kolondan geçirilen farklı konsantrasyondaki elüsyon sıvılarından elüsyon I'de SGTaz proteini bandı görülmekte ancak elüsyon II ve III'te görülmemektedir. Buna göre kolona bağlanan protein için uygun olan tamponun 100mM imidazol içeren elüsyon tamponu olduğu belirlenmiştir. Yine aynı koşullarda 6 ay öncesinde purifikasyonu ve diyalizi yapılan elüsyon sıvısı da aynı jelde yürütülmüş ve bu örnekte SGTaz enziminin bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç kısmen saflaştırılmış rekombinant enzimin aktivitesini kaybetmeden 6 aya kadar depolanabileceğini göstermektedir.

Analiz sonuçları Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de görülmektedir. Negatif kontrol olarak *Pichia pastoris* X33 ve pozitif kontrol olarak EGFP (green fluorescent protein-yeşil florasan proteini) geni içeren *Pichia pastoris* X33-EGFP suşlarının hücre dışı sıvıları kullanılmıştır.



Şekil 4.30. SDS-PAGE analizi. M: protein standardı, 1: *Pichia pastoris* X33, 2: *Pichia pastoris* X33-EGFP, 3: *Pichia pastoris* M5-1, 4: Flow through, 5: Wash I, 6: Wash II, 7: Wash III, 8: Elüsyon I, 9: Elüsyon II, 10: Elüsyon III, 11,12: Amonyum sülfat ile daha önce kısmen saflaştırılmış örnekler 13: daha önce yapılan Histag purifikasyonundan elde edilen elüsyon



Şekil 4.31. Western blot analizi. M: protein standardı, 1: *Pichia pastoris* X33, 2: *Pichia pastoris* X33-EGFP, 3: *Pichia pastoris* M5-1, 4: Flow through, 5: Wash I, 6: Wash II, 7: Wash III, 8: Elüsyon I, 9: Elüsyon II, 10: Elüsyon III, 11,12: Amonyum sülfat ile daha önce kısmen saflaştırılmış örnekler 13: daha önce yapılan Histag purifikasyonundan elde edilen elüsyon

Western blot membranında kontrol amaçlı kullanılan polihistidin kuyruğu ihtiva eden EGFP proteini beklenen boyutta bant vermiştir. Kolondan geçirilen ilk süzöntüde ve yıkama tamponu III'te bant görülmemekle birlikte, yıkama tamponu I ve II de 85 kDa civarında SGTaz proteini bandı görülmektedir. Yine beklenildiği gibi elüsyon I'de bant vermiş ancak II ve III'te bant görülmemektedir. Western blot analizi sonuçları SDS-PAGE jelindeki sonuçları doğrular biçimdedir. Analizleri sonucuna göre elüsyon I %5 gliserol içeren 1X PBS tamponunda diyaliz edilmiş ve analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Kısmi saflaştırılmış SGTaz enziminin protein içeriği hesaplanarak kısmi saflaştırma basamakları sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre saflaştırma işlemi amacına ulaşmıştır. Saflaştırma verimi %17,49 oranında olmasının nedeninin kolonunun ve reçinenin kapasitelerinin üstü hacimde hücre sıvısı kullanılmasından dolayı olabileceği, ayrıca yıkama tamponundaki imidazol miktarının zayıf şekilde kolona bağlanmış olan proteinleri çözerek süzöntüye geçirmiş olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.2. Rekombinant SGTaz enzimini kısmen saflaştırmak için uygulanan işlemlerden elde edilen bazı değerler

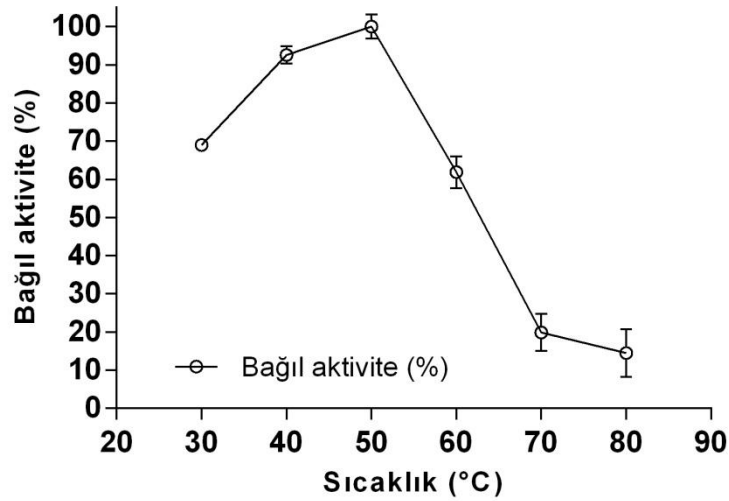
	Hacim (ml)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik aktivite (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Fermantasyon sıvısı M5-1	15,00	10,62	0,02	599,79	159,24	100,00	1,00
Kısmen saflaştırılmış M5-1	2,00	13,92	0,01	1136,17	27,85	17,49	1,89

4.3.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkileri

Sıcaklığın kısmi saflaştırılmış rekombinant SGTaz enzimi üzerindeki etkileri ve enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla, enzim 0,1 M potasyum fosfat tamponu içerisinde pH 6'da 30°C ile 80°C sıcaklıklar arasında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.32'da gösterilmiştir. Bağlı aktivite profili

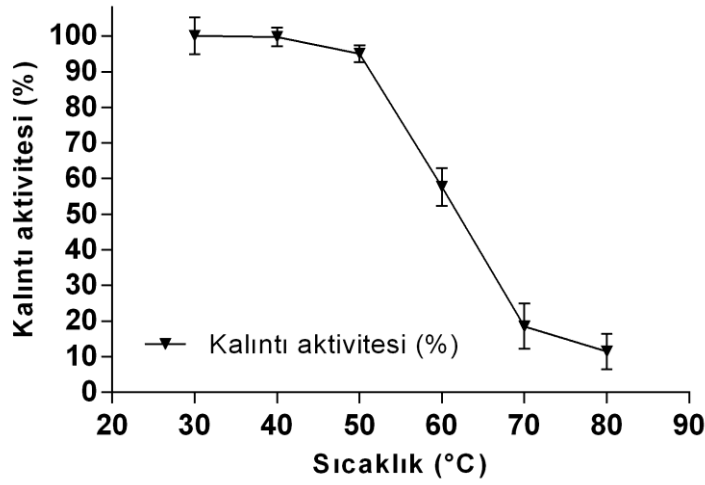
farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerlerinden optimum aktiviteyi gösteren değer %100 kabul edilerek oluşturulmuştur.

Buna göre optimum sıcaklık 50 °C olarak saptanmıştır ve %100 aktivite değeri olarak kabul edilmiştir. Enzim, aktivitesini 30 °C de optimum değere göre %69 oranında gösterirken, 40°C sıcaklıkta %92,6 oranında aktivitesini koruyarak optimum aktiviteye yakın bir değer göstermiş, 60°C sıcaklıkta ise %61,9 oranında aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzim aktivitesi 70°C %19,9 ve 80°C sıcaklıklarda %14,5 civarına düşmüştür.



Şekil 4.32. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflaştırılan SGTaz enzimin çeşitli sıcaklıklarda gösterdiği enzim aktivitesi ve bağıl aktivite değerleri.

Enzimin sıcaklık stabilitesinin ölçülmesi amacıyla fosfat tamponu içerisinde seyreltilmiş kısmen saflaştırılmış SGTaz enzimi, 30-80 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda 30 dk 50 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından enzim aktivitesi, standart enzim aktivitesi metodu kullanılarak ölçülmüş ve enzim stabilitesi belirlenmiştir. Kalıntı aktivitesi profili farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerlerinden optimum aktiviteyi gösteren değer %100 kabul edilerek oluşturulmuştur (Şekil 4.33).



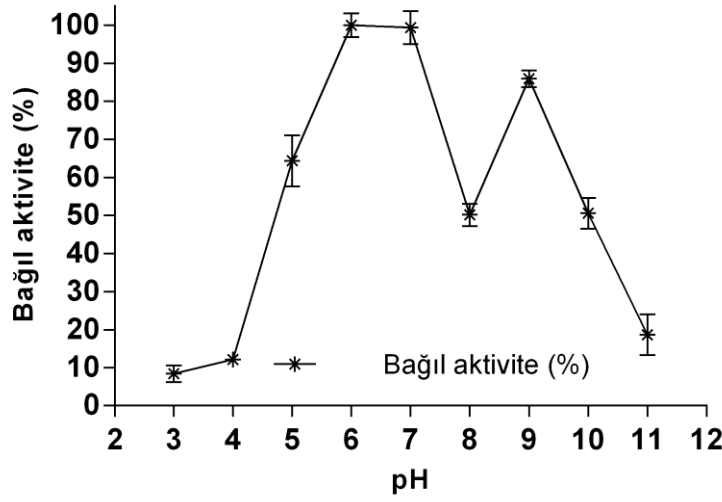
Şekil 4.33. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflastırılan SGTaz enziminin pH 6'da ve değişen sıcaklık koşullarında sergilediği enzim aktivitesi ve kalıntı aktivitesi değerleri

Rekombinan SGTaz enzimi 30°C, 40°C ve 50°C'de sırasıyla %100, %99,7 ve %95 oranlarıyla aktivitesini büyük oranda koruduğu görülmektedir. Yine 60°C'de enzimin %57,6 oranında stabilitesini koruduğu ancak, Enzim aktivitesinin 70°C'de %18,5'e, 80°C'de ise %11,5'e kadar indiği tespit edilmiştir. Literatürde yapılan diğer çalışmalardan, *Bacillus* sp. TS1-1 suşundan izole edilerek *E. coli*'de rekombinant olarak üretilen SGTaz enzimi pH 6 tamponunda optimum 60°C'de aktivite göstermiştir (Rahman vd 2006). Soya fasülyesi toprağından izole edilen alkalafilik *Bacillus sphaericus* 41 suşu pH 6 tamponunda optimum sıcaklığı 65°C olarak saptanmış termal inaktivasyonu ise 70°C üzerinde gerçekleşmiştir ve enzimin 65°C'de hayli stabil olduğu bildirilmiştir (Moriwaki vd 2009). Ayrıca *Brevibacillus brevis* CD162 (Kim vd 1998), *Bacillus ohbensis* (Sin vd 1991) suşlarından elde edilen rekombinant SGTaz enzimleri 55 °C sıcaklık değerinde optimum aktiviteyi gösterdiği bildirilmiştir. *Thermococcus* sp. B1001 (Tachibana vd 1999), *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 (Wind vd 1995) ve rekombinant *Thermococcus kodakaraensis* KODI (Rashid vd 2002) gibi hipertermofilik yada termofilik organizmalardan izole edilen SGTaz enzimleri sırasıyla en yüksek aktiviteyi 90-100°C, 80-85°C ve 80°C sıcaklıklarda göstermiştir. *B. autolyticus* 11149 (Tomita vd 1992), *B. stearothermophilus* (Ahn vd 1990) ve *B. circulans* E 192 (Bovetto vd 1992) suşlarında optimum sıcaklıkları 60°C olduğu bildirilmiştir. *Bacillus* sp. G1 suşundan

saflaştırılarak elde edilen SGTaz enzimi pH 6’da çözünebilir nişastada optimum aktiviteyi 60°C’de göstermiş en düşük aktiviteyi ise %28 baēıl aktivite ile 80°C’de göstermiştir ancak 30 dk inkübasyon ardından aktivitesinin %50’sini ancak 76 °C civarında kaybetmeye başlamış, 90°C’de ise aktivitesinin tamamını kaybetmiştir (Sian vd 2005). *K. pneumoniae* AS-22 (Gawande ve Patkar 2001) ve *Bacillus agaradhaerens* (Martins ve Hatti-Kaul 2002) SGTaz enzimleri maksimum stabilitelerini 40°C’de göstermiştir.

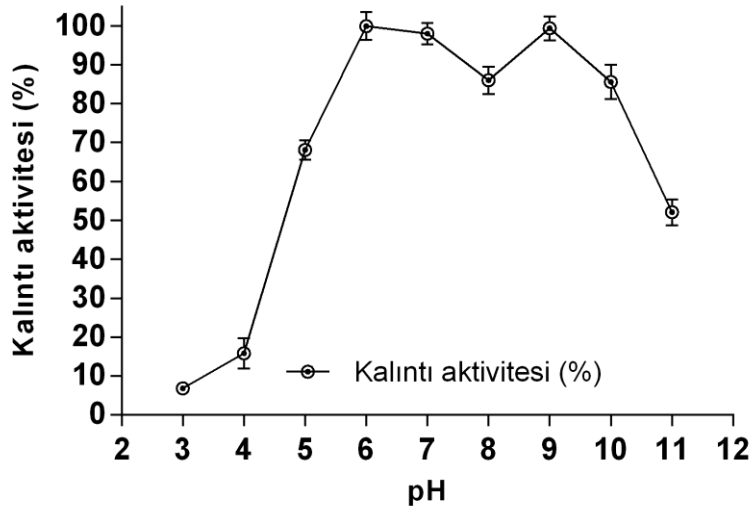
4.3.3. pH’nın enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine etkileri

Kısmi saflaştırılmış rekombinant SGTaz enzimi üzerinde pH’nın etkileri ve enzimin optimum pH’sının belirlenmesi amacıyla enzim, pH 3-8 arasındaki farklı tamponlar içerisinde hazırlanmış %4’lük nişasta çözeltisiyle 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen bulgular şekil 4.34’de gösterilmiştir. Optimum pH 6 olarak saptanmıştır ve baēıl aktivite profili oluşturulurken bu deēer %100 aktivite deēeri olarak kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır. Enzim aktivitesi pH 3 ve pH 4 de sırasıyla %7,6 ve %12,1 gibi düşük oranlarda tespit edilirken, pH 5 te %64,3, pH 7’de ise %99,4 deēeri ile enzimin aktivitesini büyük oranda koruduēu saptanmıştır. pH 8 de %50,2 oranında aktivite göstermiştir. Yine pH 9 civarında %85,9 oranında aktivite gösterirken, bu oran pH 10 ve pH 11’de sırasıyla %50,6 ve %36,9 oranına düşmüştür.



Şekil 4.34. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflastırılan SGTaz enziminin çeşitli pH'larda gösterdiği enzim aktivitesi ve bağıl aktivite değerleri

Rekombinant SGTaz enziminin kalıntı aktivitesi farklı pH'larda hazırlanmış tamponlar içinde 50 °C'de 30 dk bekletilmesi ardından enzim aktivitesi tayini yapılarak belirlenmiştir. Şekil 4.35'da görüldüğü gibi rekombinant enzim geniş bir pH stabilitesine sahiptir ve bu beklenen ve istenilen bir sonuçtur. Enzim pH 3 ve pH 4'te sırasıyla %6,7 ve %18,8 oranında düşük bir aktivite göstermektedir. Ancak pH arttıkça bu oran artmaktadır. Enzim aktivitesi pH 5'te %68,1 iken en yüksek aktivite pH 6'da göstermiş olup %100 olarak kabul edilmiş ve pH profili buna göre oluşturulmuştur. Yine pH 7'de %98,1 ve pH 8'de %86,1 oranında aktivite göstermiş pH 9 ve pH 10 sırasıyla %99,4 ve %85,6 oranıyla stabilitesini yüksek oranda koruduğu tespit edilmiştir. Bu oran pH 11'de %52,1 değeri ile enzim aktivitesinin yarıyarıya korunduğunu göstermektedir.



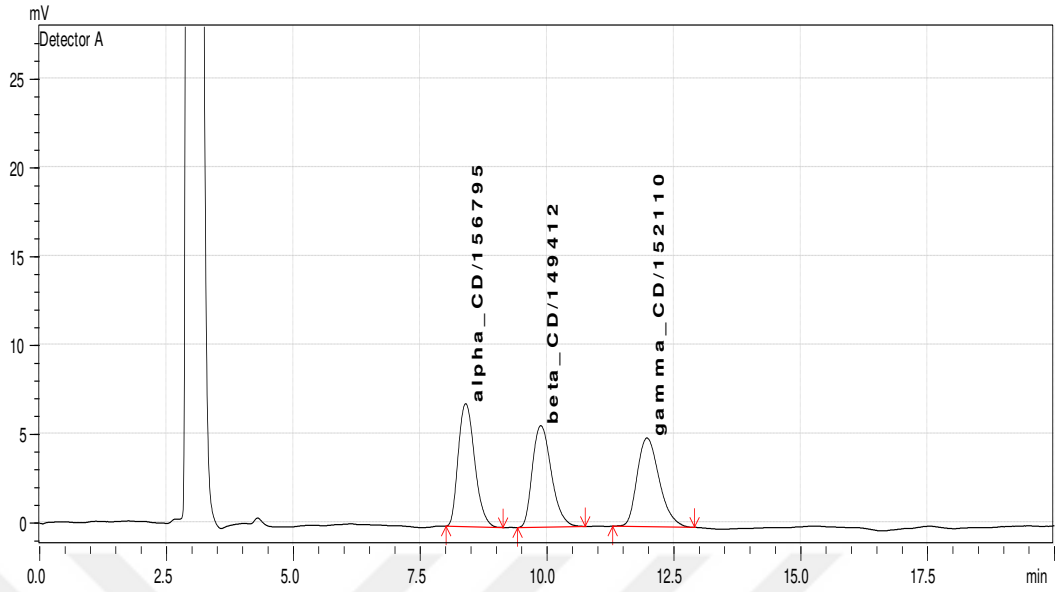
Şekil 4.35. Rekombinant olarak üretilerek kısmen saflaştırılan SGTaz enziminin değişen pH koşullarında sergilediği enzim aktivitesi ve kalıntı aktivitesi değerleri

SGTaz enzimi pH grafiğinde, iki farklı optimum tepe noktası her ne kadar sıradışı görülsede *Bacilli* sınıfı bakterilerde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Bu durumun alkali pH'ya bağlı olarak enzimin yapısında ince değişiklikler meydana getirmesinden kaynaklanadığı düşünülmektedir (Atanasova vd 2011). *Bacillus ohbensis* suşundan *E. coli*'ye klonlanan recombinant SGTaz enziminin optimum pH'sı 5 ve 10 olarak saptandığı, stabilitesini ise 55 °C'de pH 5,5 ile 10 arasında koruduğu belirtilmiştir (Sin vd 1991). *Bacillus* sp. 20RF ve *Bacillus* sp. 8SB suşları en yüksek enzim aktivetelerini iki farklı optimum pH'da gösterdiği saptanmıştır. Maksimum aktivite her ikisi içinde pH 6'dır ancak pH 9'da *Bacillus* sp. 20RF %64,2, *Bacillus* sp. 8SB suşu ise %93,3 oranında aktivite göstermiştir (Atanasova vd 2008). *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF suşunun 25°C'de pH 6 ve 10 arasında stabilitesini %92-100 arasında koruduğu ve pH5 ve 11'de ise %75 civarında kalıntı aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Atanasova vd 2011). *Bacillus* sp. 7-12 suşunun SGTaz enziminin optimum pH ları 5 ve 8,5 olarak saptandığı, stabilitesini ise pH 6-10 arasında oldukça koruduğu belirtilmiştir (Cao vd 2005). Aynı şekilde farklı pH'larda kalıntı aktivitesi ölçülen *Bacillus agaradhaerens* LS-3C suşundada iki pH tepe noktası saptanmıştır (Martins ve Hatti-Kaul 2002).

Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında; Soyafasülyesi toprağından izole edilen alkalafilik *Bacillus sphaericus* 41 suşunun SGTaz enzim aktivitesi 50°C sıcaklıkta 4 ile 10 arasındaki farklı pH'larda ölçülmüş ve optimum pH 6 olarak belirlenmiştir. Enzimin en düşük aktivitesini pH 4 ve pH 10 değerlerinde gösterdiği belirtilmiştir. Enzimin, 4 saat 50°C sıcaklıkta çeşitli pH değerlerindeki kalıntı aktiviteleri ölçülmüş ve aktivitesini pH 6 ve 7'de neredeyse %100 oranında koruduğı , pH 5'te %34,2, pH 8-10 arasında ortalama %16,8 oranına indiğı bildirilmiştir (Moriwaki, 2009). Toprakdan izole edilen alkalafilik *Bacillus* sp. G1 suşundan saflaştırılan SGTaz enziminin pH 4-10 arasındaki aktivitesi 60°C'de 10 dk inkübasyona bırakılarak ölçüldüğü ve optimum pH'nın 6 olarak belirlendiğı ancak pH 4 ve pH 10 değerlerinde hiçbir aktivite göstermediğı bildirilmiştir. Aynı koşullarda 30 dk. inkübasyona bırakıldığında ise enzimin pH 7-9 arasında aktivitesini koruduğı, pH 4-5 arasında inaktif olduğı ve pH 10 değerinde ise aktivitesinin %23 oranında azaldığı bildirilmiştir (Sian vd 2005). *Bacillus megaterium* suşundan saflaştırılan SGTaz enziminin 30 °C'de 10 dk inkübasyona bırakılarak pH 2,2-11 aralığında bağıl aktivitesinin ve yine aynı koşullarda 30 dk inkübasyona bırakılarak kalıntı aktivitesinin ölçüldüğü ve buna göre enzimin geniş bir değer aralığında pH 4-11 arasında aktivite gösterdiği ve pH 4,5 ve 9,0 arasında aktivitesinin %60 civarında kaybettiğı yine optimum pH'nın 7,2 olarak belirlendiğı ve enzim pH 6-10,5 aralığında stabilitesini %100 civarında koruduğı bildirilmiştir (Pishtiyski 2008).

4.3.4. HPLC analizi

HPLC analizi yapılırken miktar belirleme aşamasında elde edilen ve siklodekstrinleri 250 ppm konsantrasyonda içeren standarda ait kromatogram Şekil 4.36'da verilmiştir. Kromatogramda ilk gözlemlenen pik standardı hazırlamada kullanılan çözgen suya aittir. Daha sonra gelen piklerden 8-9 dk'lar arasında α , 9,5-10,5 dk'lar arasında β ve 11,5-12,5 dk'lar arasında γ siklodekstrin pikleri alınmaktadır. Salt nişasta içeren bir çözeltiye ait kromatogram Ek 7.10'da verilmiştir. Şekil 37 ve 38'deki siklodekstrin piklerinin salt nişasta çözeltisi içeren temel hattın (base-line) üzerinde olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.36. Siklodekstrinleri 250 ppm konsantrasyonda içeren standarda ait kromatogram

Enzim ürünlerinin analizi için enzim aktivitesi ölçüm metodunda olduğu gibi 50 °C'de %4 çizünebilir nişastalı fosfat tampon ile karıştırılan rekombinant enzim 10 dk ve 24 saat süre ile reaksiyona bırakılmış ve kromatografik olarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmektedir. Buna göre 10 dk sonunda toplam 0,942 g/ml SD olmak üzere, 0,852 g/ml β -SD ve 0,089 γ -SD üretildiği ancak hiç α -SD üretilmediği gözlemlenmiştir. Aynı koşullardaki 24 saatlik reaksiyon sonunda toplam 3,786 g/L SD üretilmiştir. Toplam SD'nin 3,366 g/L'si β -SD ve 0,42 g/L'si γ -SD olmak üzere hiç α -SD üretilmediği gözlenmiştir. β -SD üretiminin yüksek olduğu yanında düşük oranda γ -SD de üretildiği görülmektedir. *Bacillus* sp. SD5 suşu β - γ -SGTaz enzimi üreticisi olduğu söylenebilir. HPLC analizi ham verileri Ek. 7.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Pichia pastoris* X33-M5-1 suşunun SD üretimi HPLC analizi sonucu

Zaman	Toplam SD verimi (mg/L)	α -SD verimi (mg/L)	β -SD verimi (mg/L)	γ -SD verimi (mg/L)
10 dk	942,096	0	852,494	89,602
24 saat	3.786,734	0	3.366,596	420,138

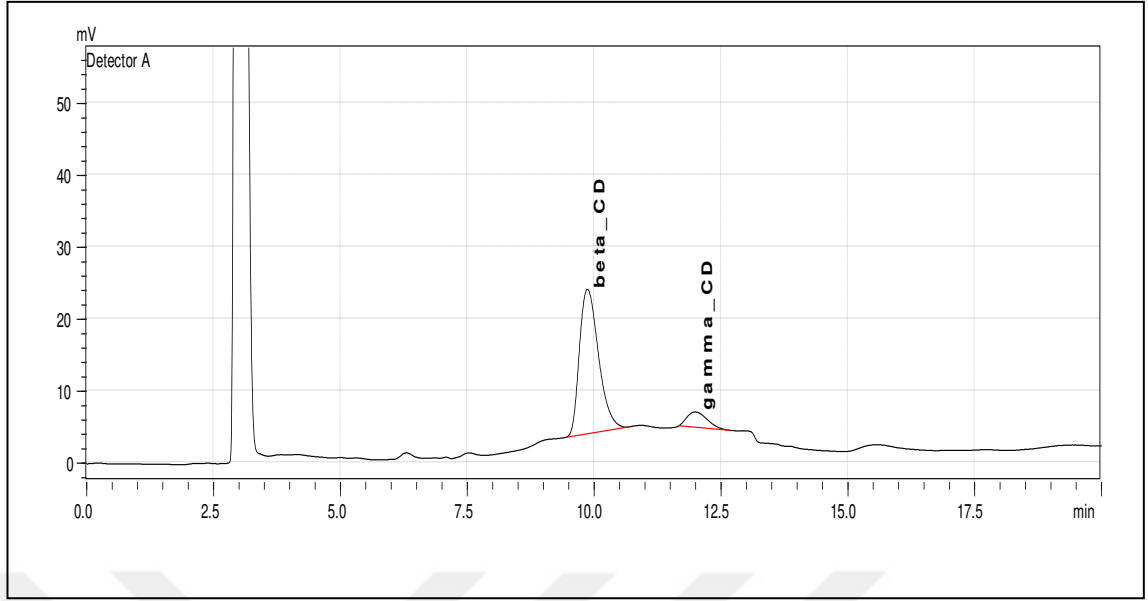
Diğer çalışmalara bakıldığında kullanılan nişasta konsantrasyonu ve çeşidi SD üretimi üzerinde oldukça etkili olduğu görülmektedir. Bu farklılığın görülmesinin

nedeni ise nişasta garnüllerinin yapısal farklılıklarına, kompozisyonuna ve özelliklerine bağlı olarak geliştiği belirtilmiştir (Gawande vd, 1999).

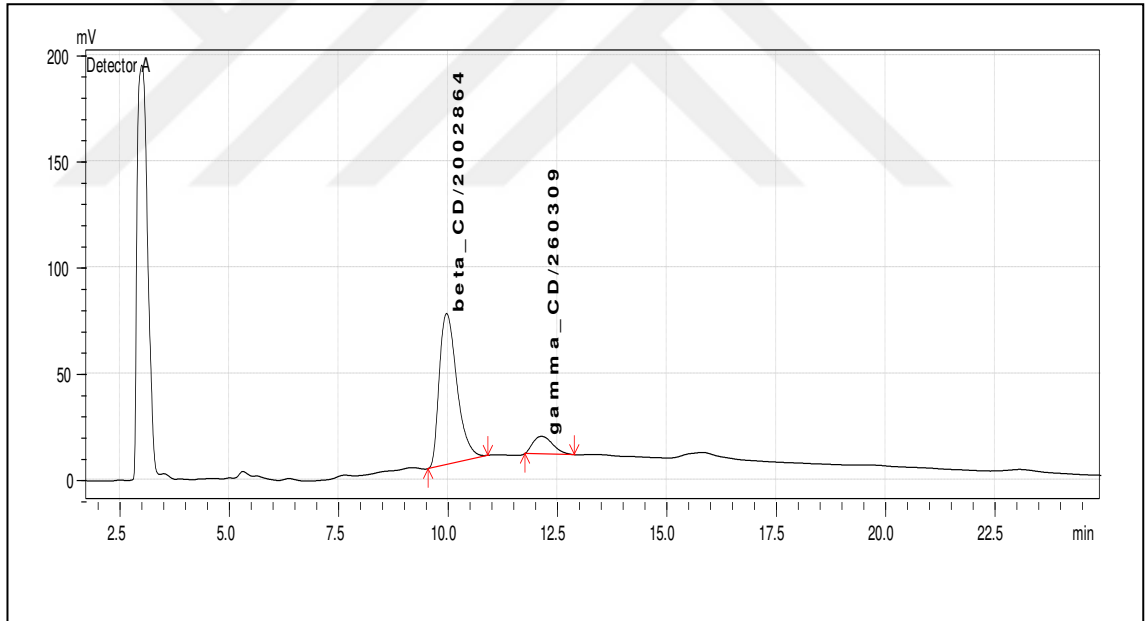
Klebsiella pneumoniae AS-22 suşundan elde edilen saflaştırılmış SGTaz enzimi için jelatinize çözünabilir nişasta ham nişastaya göre da iyi bir kaynak olarak seçilmiştir (Gawande ve Patkar 2001). Buna benzer bir çalışmada *Bacillus* sp G1 suşundan elde edilen SGTaz enziminin aynı koşullarda çözündürülmüş mısır nişastasına göre tapyoka nişastasında daha fazla SD oluşturabildiğini tespit etmiştir (Sian vd 2005). Aynı çalışmada farklı substrat konsantrasyonlarının SD oluşumu üzerine etkisi incelenmiş ve 10 g/L tapyoka nişastası 24. saatte 3,63 g/L SD üretildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda 40 g/L seviyesinde patates nişastası ile buna yakın bir üretim gerçekleştirilmiştir.

Sian vd (2005) 70 g/L tapyoka nişastası ile 19,3 g/L üretim miktarına ulaşmıştır. Üretimi arttırmaya yönelik olarak bu araştırmalar ışık tutucudur ve ileride *Bacillus* SD5'ten elde edilen rekombinant enzimden daha yüksek verim sağlanabilmesi için farklı substrat kaynaklarının ve konsantrasyonlarının değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de sırasıyla 10. dk ve 24. saat sonunda oluşan SD ürünlerinin kromatogramları verilmektedir. Bu çıktılarda rekombinant enzimin büyük oranda β - ve bir miktar da γ -siklodekstrin oluşturduğu görülmektedir. Beta siklodekstrin miktarı 24 saat inkübasyon neticesinde yaklaşık 4 kat artmıştır.



Şekil 4.37. *Pichia pastoris* X33-M5-1 suşunun 10 dk'da üretmiş olduğu SD üretiminin HPLC analizi kromatogramı



Şekil 4.38. *Pichia pastoris* X33-M5-1 suşunun 24 saatte üretmiş olduğu SD üretiminin HPLC analizi kromatogramı

5. SONUÇ

Bu çalışmanın sonucu olarak;

1. Ülkemiz yerel alkali kaynakları olan Salda gölünden 3 ve Van gölünden 1 olmak üzere toplam 4 farklı suş izole edilmiştir. Koloni ve hücre morfolojisi incelemeleri ve 16S rDNA tanılaması ardından elde edilen suşlar *Bacillus* sp. SG2, *Bacillus* sp SG3, *Bacillus* sp V3 ve *Bacillus* sp SD5 şeklinde isimlendirilmiştir.
2. Elde edilen suşların gelişim grafikleri ve enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. *Bacillus* sp SD5 suşu ile SGTaz geni izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir.
3. SGTaz geni izolasyonu için SD5 suşuna genetik yakınlığı olan organizmaların SGTaz gen dizilerinden faydalanılarak tüm SGTaz genini kapsayacak şekilde primer çifti tasarlanmıştır. Bu primer ile 2025 bp uzunluğunda SGTaz genini tümüyle kapsayacak şekilde DNA parçaları elde edilmiştir.
4. Gen dizisinin aydınlatılması amacıyla tüm geni kapsayan primer çifti ve genin iç bölgesinden tasarlanan primer çifti ile gen dizisi belirlenmiştir.
5. Olgun SGTaz genini, tüm geni kapsayan DNA parçasından *Pichia pastoris*'te klonlamak üzere 3 farklı primer çifti daha tasarlanmıştır. Olgun geni kapsayan her üç PCR ürünü de metanol tetiklemeli (indüksiyonlu) protein üretimini sağlayan pPicZ alfa vektörü ile *Pichia pastoris* X33'e aktarılmıştır. Böylece (doğal gen dizisini içeren) N2, (gene ilave c-myc epitope ve polihistidin kuyruğu kodlayan) S3, ve (gen ve polihistidin kuyruğu kodlayan) M5 şeklinde kodlanan üç farklı rekombinant maya suşu elde edilmiştir.
6. Elde edilen klonların gelişim ve enzim aktivitesi eğrileri oluşturulmuş ve SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Elde edilen rekombinant SGTazın 85 kDa büyüklüğünde bir protein olduğu saptanmıştır. Klonlardan en yüksek aktiviteyi gösteren ve polihistidin kuyruğu ihtiva ettiği için saflaştırmada kolaylık sağlayacağı düşünülen M5-1 suşu üretim, saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri yürütülmüştür.
7. Çalkalamalı fermantasyon ile elde edilen sıvı kültür santrijüleme, diyaliz ve afinite kromatografisi (HisTag saflaştırma) gibi işlemlere tabi tutularak SDS-PAGE, Western blot ve protein analizleri yapılmış, saflaştırma işleminin verimi

ve başarısı değerlendirilmiştir. Saflaştırma işlemiyle 600 U/mg olan spesifik aktivite değeri 1136 U/mg'a çıkmıştır.

8. Saflaştırma sonucu elde edilen enzim kullanılarak optimum çalışma sıcaklığı ve pH'sı belirlenmiştir. Buna göre saflaştırılan rekombinant enzim en yüksek SGTaz aktivitesini 50 °C'de ve pH 6'da sergilediği tespit edilmiştir. Rekombinant SGTaz enzimi 30 dakika süreyle 30, 40 ve 50°C'de bekletildiğinde aktivitesini sırasıyla %100, %99,7 ve %95 oranında koruduğu saptanmıştır. Enzim 30 dk nötr ve alkali pH'larda (pH 7-10) bekletildiğinde aktivitesini %85,6-99,4 oranında koruduğu tespit edilmiştir.
9. Reaksiyon ürünleri HPLC ile analiz edildiğinde nişastadan β - ve γ -SD'lerin oluştuğu ancak α -SD oluşmadığı görülmüş ve dolayısıyla *Bacillus* sp. SD5'in γ - β -SD üreticisi olduğu sonucu çıkarılmıştır. Ürün miktarlarının 24 saat süren inkübasyon sonucunda β - ve γ -SD'ler için sırasıyla 3,366 ve 0,42 g/L seviyesine ulaştığı belirlenmiştir.
10. Bu çalışmanın nihai sonucu olarak, rekombinat SGTaz enzimini metanol tetiklemeli üretebilen ve hücre dışı sıvıya salgılayabilen üç farklı *P. pastoris* suşu geliştirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- AHN, J.H., HWANG, J.B. and KIM S.H. 1990. Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearotheophilus*. Purification by affinity chromatography and its properties. *Korean Journal of Applied Microbiology Biotechnology*, 18(6): 585-590.
- ASTRAY G., GONZALEZ-BARREIRO C., MEJUTO, J.C., RIAL-OTERO, R. and SIMAL-GANDARA J. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods *Food Hydrocolloids*, 23: 1631-1640.
- ATANASOVA, N., KITAYSKA, T., BOJADJIEVA, I., YANKOV, D. and TONKOVA, A. 2011. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. *Process Biochemistry*, 46: 11-122.
- ATANASOVA, N., PETROVA, P., IVANOVA, V., YANKOV, D., VASSILEVA, A., TONKOVA, A., 2008. Isolation of novel alkaliphilic bacillus strains for cyclodextrin glucanotransferase production. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 149: 155–67.
- AYGAN A. 2008. Isolation of haloalkaliphilic *Bacillus* sp., production, characterization and determination of biotechnological application of their amylase, cellulose and xylanase. *University of Çukurova* PhD Thesis.
- BERBER, I. and YENİDÜNYA, E. 2005. Identification of alkaliphilic *Bacillus* species isolated from lake van and Its surroundings by computerized analysis of extracellular protein profiles. *Turkish Journal of Biology*, 29: 181-188.
- BIWER, A. ANTRANIKIAN, G. and HEINZLE, E. 2002. Enzymatic production for cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 609-617.
- BOVETTO, L.J., BACKER, D.P., VILLETTE, J.R., SICARD, P.J. and BOUQUELET, S.J. (1992). Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192. *Biotechnoogyl Appiedl Biochemistry*, 15: 48-58.
- CAO, X., JIN, Z., WANG, X. and CHEN, F. A. 2005. Novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. *Food Research International*, 38: 309-314.
- CEREGHINO, GP. CEREGHINO, JL. ILGEN C. and CREGG JM. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 329-332.
- CEREGHINO, J.L. and CREGG, J.M. 2000. Heterologous expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- CHAROENSAKDI, R., MURAKAMI, S., AOKI, K., RIMPHANITCHAYAKIT, V. and LIMPASENI, T. 2007. Cloning and expression of cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Paenibacillus* sp. T16 isolated from hot spring

- soil in Northern Thailand. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3): 333-340.
- CRAVOTTO, G., BINELLO, A., BARANELLI, E., CARRARO, P. and TROTTA, F. 2006. Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Current Nutrition&Food Science*, 2: 343-350.
- CREGG, J.M., TSCHOPP, J.F., STILLMAN, C., SIEGEL, R., AKONG, M., CRAIG, W.S., BUCKHOLZ, R.G., MADDEN, K.R., KELLARIS, P.A., DAVIS, G.R., SMILEY, B.L., CRUZE, J., TORREGROSSA, R., VELICELEBI G. and THILL G.P. 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 5: 479-485.
- DAVIES, GJ. WILSON, KS. HENRISSAT B. 1997. Nomenclature for sugarbinding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321: 557-559.
- DEMAIN, A.L. 2005. Industrial mycology: past, present and future. In: Z. An (Editor), *Handbook of Industrial Mycology*, Marcel Dekker, pp. 1-25, New York.
- ENDO, T. ZHENG M, ZIMMERMANN, W. 2002. Enzymatic synthesis and analysis of large-ring cyclodextrins. *Australian Journal of Chemistry*, 55: 39-48.
- FRÖMMING, K. H. and SZEJTLI, J. 1994. Cyclodextrins in pharmacy. *Topics in inclusion science*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- FUJISHIMA, N., KUSAKA, K., UMINO, T., URUSHINATA, T. and TERUMI, K. 2001. Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. *Japanese Patent JP 136,898*, 2001.
- GAO, S. and WANG, L. 1998. Application of cyclodextrin in environmental science. *Huanjing Kexue Jinzhan*, 6:80– 6.
- GAWANDE, B.N. and PATKAR, A.Y. 1999. Application of factorial designs for optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 168-173.
- GAWANDE, BN. and PATKAR, A.Y. 2001. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 735-743.
- HEDGES, R.A. 1998. Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 5: 2035-2044.
- HIRANO, K., ISHIHARA, T., OGASAWARA, S., MAEDA, H., ABE, K., NAKAJIMA, T. and YAMAGATA, Y. 2006. Molecular cloning and characterization of a novel gamma-CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(2):193-201.
- HORIKOSHI K. 2006. Alkaliphiles; genetic properties and applications of enzymes. *Jointly published with Kodansha Scientific Books*, Tokyo, Japan. 270 pp.

- HORIKOSHI, K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 735-750.
- HORIKOSHI, K., ANTRANIKIAN, G., BULL, T., ROBB F. and STETTER, K.O. 2011. Extremophiles Handbook. 1st edition. Springer 2011. 1247 pp.
- İNAN, M., FANDERS, S.A., ZHANG, W., HOTEZ, P.J., ZHAN, B., MEAGHER, M.M. 2007. Saturation of the secretory pathway by overexpression of a hookworm (*Necator americanus*) protein (Na-ASP1). In: J.M. Cregg (Editor), *Pichia Protocols, Methods in Molecular Biology Series*, 389, 2nd edition, Humana Press Inc., pp. 65-75, Totowa, NJ.
- JANECEK, S. 1994. Parallel β/α -barrels of α -amylase, cyclodextrin glycosyltransferase and oligo-1,6-glucosidase versus the barrel of β -amylase: Evolutionary distance is a reflection of unrelated sequences, *FEBS Letters*, 353: 119-123.
- KANEKO, T., HAMAMOTO, T. and HORIKOSHI, K. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the cyclomaltodextrin glucanotransferase gene from the alkalophilic *Bacillus* sp. strain, 38–2. *Journal of General Microbiology*, 134: 97-105.
- KANEKO, T., KATO, T., NAKAMURA N. and HORIKOSHI, K. 1987. Spectrophotometric determination of cyclization activity of beta-cyclodextrin-forming cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, 34: 45-48.
- KANEKO, T., SONG, K.B., HAMAMOTO, T., KUDO, T. and HORIKOSHI, K. 1989. Construction of a chimeric series of *Bacillus* cyclomaltodextrin glucanotransferases and analysis of the thermal stabilities and pH optima of the enzymes. *Journal of General Microbiology*, 135: 3447-3457.
- KIMURA, K., ISHII, Y., KATAOKA, S., TAKANO T. and YAMANE K. 1990. Expression of the beta-cyclodextrin glucanotransferase gene of an alkalophilic *Bacillus* sp. #1011 in *Escherichia coli* cells and characterization of the synthesized enzyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(3): 641-648.
- KITAMOTO, N., KIMURA, T., KITO, Y. and OHMIYA, K. 1992. Cloning and Sequencing of the Gene encoding Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* sp. KC201. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(6): 345-351.
- KNEGTEL, R.M.A., WIND, R.L.D., ROZEBOOM, H.J., KALK, K.H., BUITELAAR, R. M., DIJKHUIZEN, L. and ANDDIJKSTRA, B. W. 1996. Crystal structure at 2.3 Å resolution and revised nucleotide sequence of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *Journal of Molecular Biology*, 256: 611-622.
- LAWSON, C.L., VAN MONTFORT, R., STRPKOPTOV, B., ROZEBOOM, H.J., KALK, K.H., DE VRIES, G., PENNINGA, D., DIJKHUIZEN, L. and DIJKSTRA, B.W. 1994. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *Journal of Molecular Biology*, 236: 590-600.

- MABUCHI, N. and NGOA, M. 2001. Controlled release powdered flavour preparations and confectioneries containing preparations. *Japanese Patent JP 128,638*, 2001.
- MADIGAN, M.T. MARTINKO, J.M. and PARKER, J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th. Edition. USA: Prentice-Hall. 992 pp.
- MAHAT, M.K., ILLIAS, R.M., RAHMAN, R.A., RASHID, R.A.A., MAHMOOD, N.A.N., HASSAN, O., AZIZ, S.A. and KAMARUDDIN, K. 2004. Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus sp.* Ts1-1: media optimization using experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 467-473.
- MARTINS, RF. and HATTI-KAUL, R. 2002. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterisation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 116-124.
- MUNOZ-BOTELLA, S., DEL CASTILLO, B. and MARTIN, M.A. 1995. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars Pharmaceutica*, 36:187-198.
- NITSCHKE, L. HEEGER, K. BENDER, H. and SCHULZ, G.E. 1990. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the beta-cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Bacillus circulans* strain no. 8. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33 (5): 542-546.
- OHDAN, K., KURIKI, T., TAKATA, H. and OKADA, S. 2000. Cloning of the cyclodextrin glucanotransferase gene from alkalophilic *Bacillus sp.* A2-5a and analysis of the raw starch-binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(4): 430-434.
- ONG, R. M. 2005. Molecular cloning of cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus sp.* G1. *Malaysia Technology University PhD Thesis*.
- ONG, R. M., GOH, K. M., MAHADI, N. M., HASSAN, O., RAHMAN R. N. and ILLIAS R. M. 2008. Cloning, extracellular expression and characterization of a predominant beta-CGTase from *Bacillus sp.* G1 in *E. coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(12): 1705-1714.
- PARK, C.S. PARK, K.H. KIM, S.H. 1989. A rapid screening method for alkaline β cyclodextrin-methyl orange containing solid medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 1160-1169.
- PARRISH, M.A. 1987 Cyclodextrins, a review. *Speciality Chemicals*, 7: 366-380.
- PENNINGA, D., VAN DER VEEN, B., KNEGTEL, R. M. A., VAN HIJUM, S. A. F. T., ROZEBOOM, H. J., KALK, K. H., DIJKSTRA, B. W. AND DIJKHUIZEN, L. 1996. The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (51): 32777-32784.

- PISHTIYSKI, I., POPOVA, V. and ZHEKOVA, B. 2008. Characterization of cyclodextrin glucanotransferase produced by *Bacillus megaterium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144: 263–272.
- POTVIN, G., AHMAD A. and ZHANG Z. 2012. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 64: 91–105
- PRASAD, N., STRAUSS, D. and REICHART, G. 1999. Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals. *European Patent* 1,084,625,1999
- QI Q. and ZIMMERMANN W. 2005. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 475-485.
- RAHMAN, K., ILLIAS, R.M., HASSAN, O., MAHMOOD, N.A.N. and RASHID N.A.A. 2006. Molecular cloning of a cyclodextrin glucanotransferase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 74-84.
- RASHID, N., CORNISTA, J., EZAKI, S., FUKUI, T., ATOMI, H. ve IMANAKA, T. 2002. Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain. *Journal of Bacteriology*. 184(3): 777-784.
- ROSOVITZ, M.J. VOSKUIL, M.I. and CHAMBLISS, G.H. 1998. *Bacillus*. In: Collier, L., Balows, A., Sussman, M. (Eds.), *Topey & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Oxford University Press, New York, pp. 709–729.
- SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2,344 pp (3 book-set)
- SCHMID, G. ENGLBRECHT, A. and SCHMID, D. 1988. Cloning and nucleotide sequence of a cyclodextrin glycosyltransferase gene from the alkalophilic *Bacillus* 1-1. *Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins*: 71-76; *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht and Boston*
- SIAN, H. K., SAID, M., HASSAN, O., KAMARUDDIN, K., ISMAIL, A. F., RAHMAN, R. A., MAHMOOD, N.A. N. and ILLIAS, R. M. 2005. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. G1. *Process Biochemistry*, 40:1101-1111.
- SIAN, H.K. 2002. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. G1. *Malaysia Technology University Master's Thesis*.
- SIN, K., NAKAMURA, A., KOBAYASHI, K., MASAKI, H. ve UOZUMI, T. 1991. Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus obhensis* and its expression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35: 600-605.
- SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E and HOLL, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2., 1104–1207

- SZEJTLI, J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98: 1743-1753.
- SZETJLI, J. 1989. Downstream processing using cyclodextrins. *Trends in Biohecnologies*, 7: 171-174.
- TACHIBANA, Y., KURAMURA, A., SHIRASAKA, N., SUZUKI, Y., YAMAMOTO, T., FUJIWARA, S., TAKAGI, M., IMANAKA, T., 1999. Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from a newly isolated hyperthermophilic archaeon, a *Thermococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1991-7.
- TAKADA, M. NAKAGAWA, Y. VE YAMAMOTO M. 2003. Biochemical and genetic analyses of a novel γ -cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *Journal of Biochemistry*, 133: 317-324.
- TAKESHITA, K. and URATA, T. 2001. Antimicrobial food preservatives containing cyclodextrin inclusion complexes. *Japanese Patent JP 29,054,2001*.
- TAO, B. Y. 1991. Cyclodextrin glucanotransferases: technology and biocatalyst design. In : Himmel, M. E. and Leatham, G. F. *Enzyme in Biomass Conversion*. American Chemical Society, 372-383.
- TOMITA, K., KANEDA, M., KAWAMURA, K. and NAKANISHI K. 1992 Purification and properties of a cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of β -cyclodextrin. *Jornal of Fermentation and Bioengineering*, 75(2): 89-92.
- TONKOVA, A. 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microbial Technology*, 22: 678-686.
- ULUKANLI, Z. and DIGRAK, M. 2002. Alkaliphilic microorganisms and habitats. *Turkish Journal of Biology*, 26: 181-191.
- US Federal Register. 2005. Alpha-cyclodextrin, beta-cyclodextrin, and gammacyclodextrin: exemption from the requirement of a tolerance. *US Federal Register*, 70(128): 38780-38785.
- VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W.B. and DIJKHUIZEN, L. 2000a. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543: 336-360.
- VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., PENNINGA, D., VAN ALEEBEK, G.J.W.M., SMITH, L.M., DIJKSTRA, B.W. and DIJKHUIZEN, L. 2000b. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *Journal of Molecular Biology*. 296: 1027-1038.
- WAGNER, L.W., MATHESON, N.H., HEISEY, R.F. and SCHNEIDER, K. 1997. Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Techniques*, 11: 791-795.

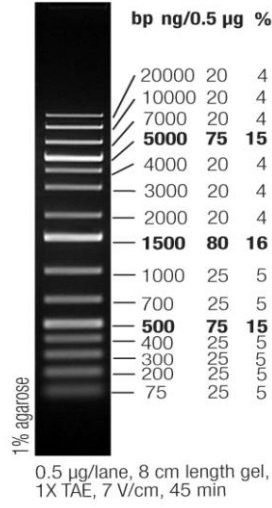
WIND, R.D., LIEBL, W., BUITELAAR, R.M., PENNINGA, D., SPREINAT, A., DIJKHUIZEN, L., BAHL, H., 1995. Cyclodextrin formation by the thermostable alpha-amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1257–65.



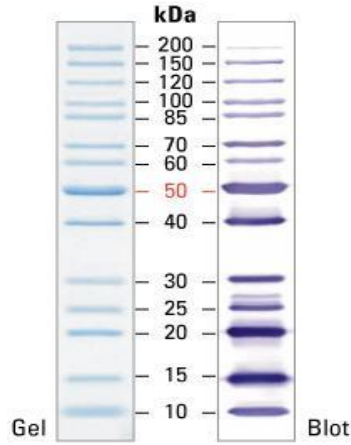
7. EKLER

Ek. 7.1. Çalışmada Kullanılan DNA ve Protein Standartları

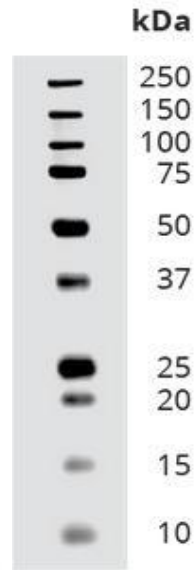
O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use



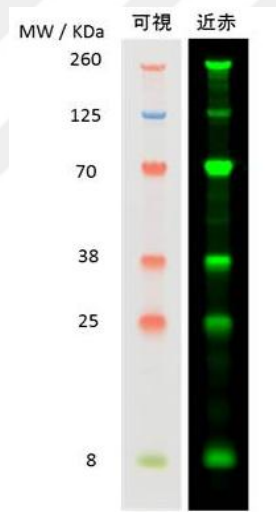
Agaroz Jel Elektroferezinde kullanılan DNA standardı: O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)



SDS-PAGE analizinde kullanılan protein standardı: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD)



Western blot analizinde kullanılan protein standardı: Odyssey Protein Molecular Weight Marker (Li-Cor Bioscience, NE, ABD)



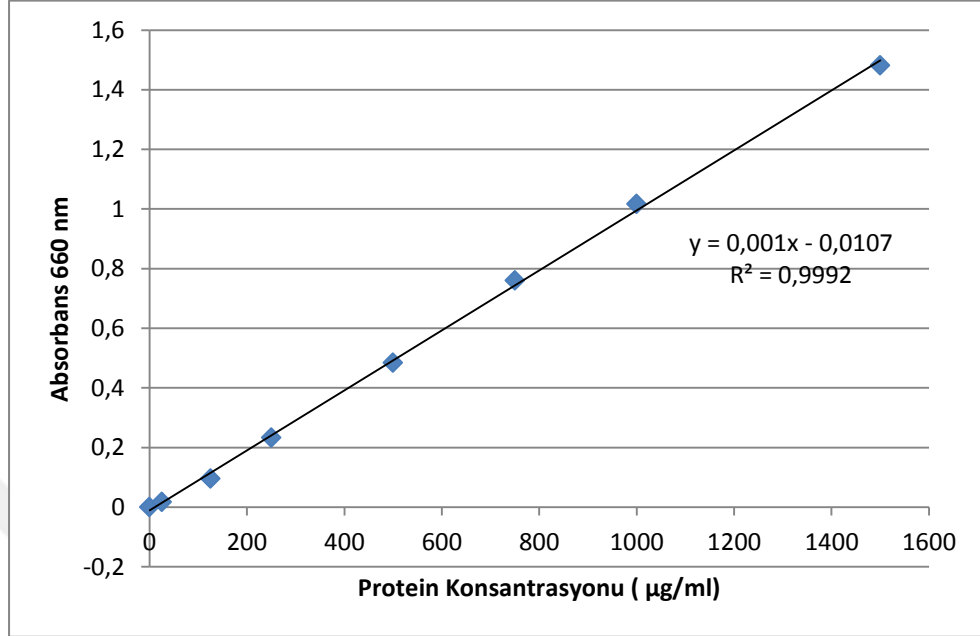
Chameleon 800

Western blot analizinde kullanılan protein standardı: Chameleon 800 Pre-strained Protein Ladder (Li-Cor Bioscience, NE, ABD)

Ek. 7.2. Çalışmada kullanılan primerler

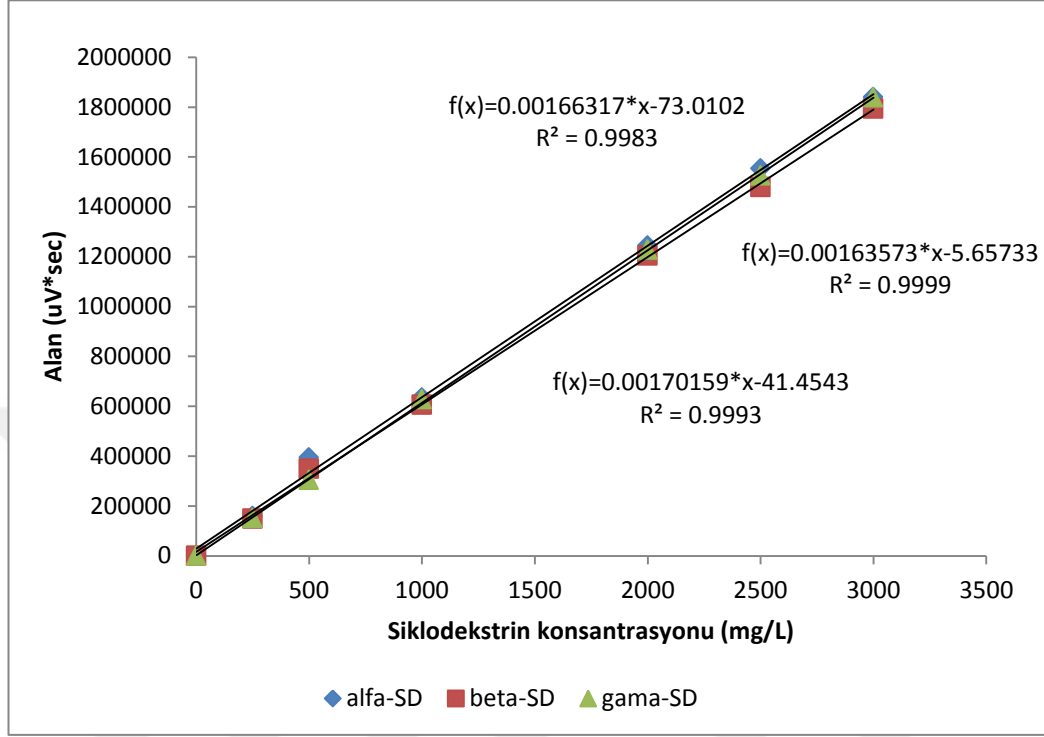
Primer adı	Baz kodlaması	Baz sayısı	Tm(° C)	%G C	MA
CGTWGF2	5'- CTTTCTTTACCTACTGTTGCGG -3'	22	51.3	45.5	6.69
CGTWGR2	5'- TCGTTATGTCCCAGCCTCT-3'	19	49.9	52.6	5.74
CGTexS F	5'-TCTGTCGACAAAAGAGACGTAACA AACAAAGTCAAT-3'	36	58.0	36.1	11.11
CGTexN-R	5'-AGTGCGGCCGCTACCCAATTAATCA TAACCGTATCTGT-3'	38	63.5	47.4	11.61
CGTexS-R	5'-ACTGTCGACCCAATTAATCATAACCGT ATCTT-3'	32	56.5	37.5	9.73
CGTEXPF-SalI	5'- TCTGTCGACAAGAGAGACGTAACAAA CAAAGTCAATTACT-3'	40	60.3	37.5	12.33
CGTEXPR-NotI	5'- TTGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATG ATGCCAATTAATCATAACCGTATC -3	52	65.7	42.3	16.00
pJET 1.2 F	5'- CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	23	58.8	60.9	7.13
pJET 1.2 R	5'- AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	24	52.0	41.7	7.39
Cgtseq F	5'-CACAATGGCGGAACAGACT -3'	19	49.9	52.6	5.87
Cgtseq R	5'-CGCTACGCTATTTGCTCG -3'	18	49.3	55.6	5.48

Ek. 7.3. Toplam Protein Tayini Kalibrasyon Eğrisi



Toplam protein tayini için farklı konsantrasyonlardaki BSA standardının 660 nm absorbans değerleri ile çizilmiş kalibrasyon eğrisi

Ek. 7.4. HPLC için oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve verileri



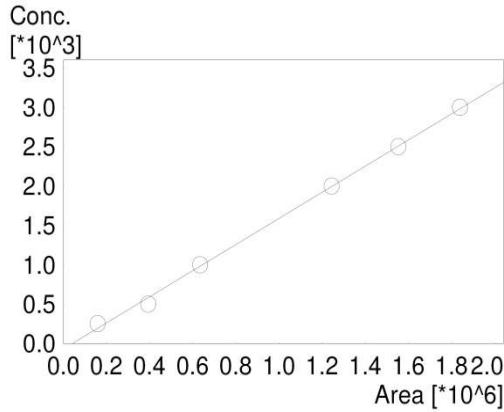
HPLC analizi için α -, β - ve γ - CD ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri.

HPLC için oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve verileri'nin devamı

==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

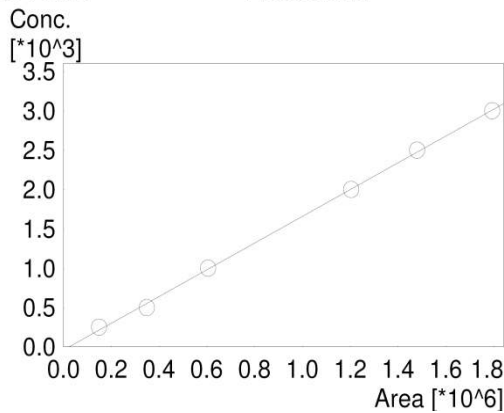
<Calibration Curve>

ID# : 1
 Name : alpha_CD
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.00166317 \cdot x - 73.0102$
 $Rr1=0.9991381$ $Rr2=0.9982769$
 MeanRF:0.00154386 RFSD:0.000136571 RFRSD:8.84603
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



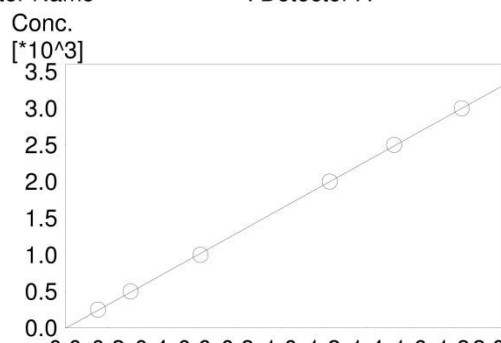
#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	250.000	159250.4	159250
2	500.000	394065.1	394065
3	1000.000	633831.0	633831
4	2000.000	1244420.4	1244420
5	2500.000	1554062.7	1554063
6	3000.000	1839440.5	1839440

ID# : 2
 Name : beta_CD
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.00170159 \cdot x - 41.4543$
 $Rr1=0.9996029$ $Rr2=0.9992059$
 MeanRF:0.00162966 RFSD:9.77562e-005 RFRSD:5.99857
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	250.000	149411.8	149412
2	500.000	349163.8	349164
3	1000.000	606148.2	606148
4	2000.000	1204235.2	1204235
5	2500.000	1479560.7	1479561
6	3000.000	1793750.1	1793750

ID# : 3
 Name : gamma_CD
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.00163573*x-5.65733$
 Rr1=0.9999432 Rr2=0.9998865
 MeanRF:0.00163002 RFSD:1.97823e-005 RFRSD:1.21363
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	250.000	152109.5	152110
2	500.000	304003.6	304004
3	1000.000	628316.4	628316
4	2000.000	1227030.9	1227031
5	2500.000	1525593.4	1525593
6	3000.000	1838675.4	1838675

Ek. 7.5. Enzim Aktivitesi Tablosu

Saat	Enzim aktivitesi (U/ml)					Enzim aktivitesi (%)		
	SG2	SG3	V3	SD5	SD5 %	SG2 %	SG3 %	V3 %
12	3.4	7.1	7.6	5.7	75	37	88	100
24	7.2	8.0	6.6	7.3	96	78	100	88
36	7.4	7.8	6.0	7.0	92	80	97	79
48	8.4	7.4	7.2	7.1	93	91	92	96
60	8.4	7.7	5.2	7.1	93	91	96	69
72	9.0	7.6	3.6	7.5	98	98	96	48
84	8.0	7.8	3.3	7.6	100	87	98	44
96	9.2	7.0	2.9	6.9	90	100	87	38
120	8.4	6.6	2.3	6.3	82	91	82	30
168	8.7	5.8	1.5	5.2	69	95	73	20

Not: Yüzde aktivite her suş için en yüksek aktivite değeri %100 olarak kabul edilerek hazırlanmıştır.

Ek. 7.6. 16S rDNA Spacer Bölgesine Ait Bazı Özellikler ve Nükleotid Dizisi

Bacillus sp SD5 16S rDNA: 1110 bp;
 Bileşim: 218 A; 337 C; 277 G; 278 T; 0 DiĞER
 Yüzde Bileşim: 19.6% A; 30.4% C; 25.0% G; 25.0% T; 0.0%DiĞER
 Moleküler Ağırlık (kDa): ssDNA: 341.27 dsDNA: 684.37
 ORİJİN

1	ACAGTCATTT	GTCCACCTTA	GGCGGCTGGC	TCCAAAGGTT	ACCTCACCGA	CTTCGGGTGT
61	TACAAACTCT	CGTGGTGTGA	CGGGCGGTGT	GTACAAGACC	CGGGAACGTA	TTCACCGCGG
121	CATGCTGATC	CGCGATTACT	AGCAATTCCG	GCTTCATGTA	GGCGAGTTGC	AGCCTACAAT
181	CCGAAGTGAG	AATGGCTTTA	TGGGATTGGC	TCCACCTCGC	GGTTTCGCTG	CCCTTTGTAC
241	CATCCATTGT	AGCACGTGTG	TAGCCCAGGT	CATAAGGGGC	ATGATGATTT	GACGTCGTCC
301	CCACCTTCCT	CCGGTTTGTC	ACCGGCAGTC	ACCTTAGAGT	GCCCAACTGA	ATGCTGGCAA
361	CTAAGATCAA	GGGTTGCGCT	CGTTGCGGGA	CTTAACCCAA	CATCTCACGA	CACGAGCTGA
421	CGACAACCAT	GCACCACCTG	TCACTTTGCC	CCCGAAGGGG	AAGCTCTGTC	TCCAGAGTGG
481	TCAAAGGATG	TCAAGACCTG	GTAAGGTTCT	TCGCGTTGCT	TCGAATTAAA	CCACATGCTC
541	CACTGCTTGT	GCGGGTCCCC	GTC AATTCCCT	TTGAGTTTCA	GCCTTGCGGC	CGTACTCCCC
601	AGGCGGAGTG	CTTAATGTGT	TTACTTCGGC	ACTACGGGCA	TCGAAACCCC	TAACACCTAG
661	CACTCATCGT	TTACGGCGTG	GA TACCAGG	GTATCTAATC	CTGTTTGCTC	CCCACGCTTT
721	CGCGCCTCAG	CGTCAGTTAC	AGACCAGAGA	GTGCGCTTCG	CCACTGGTGT	TCCTCCACAT
781	ATCTACGCAT	TTCACCGCTA	CACGTGGAAT	TCCACTCTCC	TCTTCTGCAC	TCAAGCTTCC
841	CAGTTTCCAA	TGGCCGCTCG	GGGTTGAGCC	CCGAGATTTC	ACATCAGACT	TAAGAGGCGG
901	CCTGCGCGCG	CTTTACGCCG	AATAATTCCG	GACACGCTTG	GCCACCTACG	TATTACCGCG
961	GCTGCTGGCA	CGTAGTTAGC	CGTGGCTTTC	TGGTGAGGTA	CCGTCAGGTA	CGGGTAGTTA
1021	CGGCGGGTAC	TTGTTCTTCC	CTCACAACAG	AGCTTTACGA	CCCGAAGGGC	TTCTCCTACTC
1081	ACGCGGGCGT	TGCTCCGGTC	AGACTCGGTC			

Bacillus sp SG2 16S rDNA: 1320 bp;
 Birlesim: 334 A; 306 C; 411 G; 269 T; 0 OTHER
 Yüzde birlesim: 25.3% A; 23.2% C; 31.1% G; 20.4% T; 0.0%OTHER
 Moleküler ağırlık (kDa): ssDNA: 409.97 dsDNA: 813.84
 ORİJİN

1	CTGGAAGTCA	GCGGCGGACG	GGTGAGTAAC	ACGTGGGCAA	CCTGCCCTT	AGACTGGGAT
61	AACCTTCGGGA	AACCGAAGCT	AATACCGGAT	AACACTTTTT	CCTACCTGGG	AGAAAGTTAA
121	AAGATGGCCT	TTGTGCTATC	ACTAGGGGAT	GGGCCCCGCG	CGCATTAGCT	AGTTGGTAAG
181	GTAATGGCTT	ACCAAGGCGA	CGATGCGTAG	CCGACCTGAG	AGGGTGATCG	GCCACACTGG
241	GACTGAGACA	CGGCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTA	GGGAATCTTC	CGCAATGGAC
301	GAAAGTCTGA	CGGAGCAATG	CCGCGTGAGT	GAGGAAGGCC	TTGGGGTCTG	AAAGCTCTGT
361	TGTGAGGGAA	GAACAAGTAT	CGGTGTAATA	AGCCGGTACC	TTGACGGTAC	CTCACCAGAA
421	AGCCACGGCT	AAC TACGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGT	AGGTGGCAAG	CGTTGTCCCG
481	AATTATTGGG	CGTAAAGCGC	GCGCAGGCGG	CTTCTTAAGT	CTGATGTGAA	ATCTCGGGGC
541	TCAACCCCGA	GCGGCCATTG	GAAACTGGGA	AGCTTGAGTG	CAGAAGAGGA	GAGTGGAATT
601	CCACGTGTAG	CGGTGAAATG	CGTAGATATG	TGGAGGAACA	CCAGTGCGGA	ATGCGACTCT
661	CTGGTCTGTA	ACTGACGCTG	AGGCGCGAAA	GCGTGGGGAG	CAAACAGGAT	AGATACCTGG
721	TAGTCACGCC	GTAACGATG	AGTGCTAGGT	GTTAGGGGTT	TCGATGCCCG	TAGTGCCGAA
781	GTAACACAT	TAAGCACTCC	GCCTGGGGAG	TACGACCGCA	AGGTGAAAC	TCAAAGGAAT
841	TGACGGGGAC	CCGCACAAGC	AGTGGAGCAT	GTGGTTTAAT	TCGAAGCAAC	GCGAAGAACC
901	TTACCAGGTC	TTGACATCCT	TTGACCACTC	TGGAGACAGA	GCTTCCCCTT	CGGGGGCAAA
961	GTGACAGGTG	GTGCATGGTT	GTCGTCAGCT	CGTGTCGTGA	GATGTTGGGT	TAAGTCCCGC
1021	AACGAGCGCA	ACCCTTGATC	TTAGTTGCCA	GCATTTAGTT	GGGCACTCTA	AGGTGACTGC
1081	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGACGA	CGTCAAATCA	TCATGCCCCT	TATGACCTGG
1141	GCTACACACG	TGCTACAATG	GATGGTACAA	AGGGTTGCGA	AGCCGCGAGG	TGAAGCCAAAT
1201	CCCATAAAGC	CATTCTCAGT	TCGGATTGTA	GGCTGCAACT	CGCCTACATG	AAGCCGGAAT
1261	TGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGCCGCGG	TGAATACGTT	CCCGGGTCTT	GTACACACCG

Bacillus sp SG3 16S rDNA: 1460 bp;
 Birleşim: 373 A; 366 C; 438 G; 283 T
 Yüzde birleşim: 25.5% A; 25.1% C; 30.0% G; 19.4% T
 Moleküler ağırlık (kDa): ssDNA: 452.66 dsDNA: 900.16

ORİJİN

```

1   AAACACTGGG CCGGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAGC GGACAGAAGG GATGCTCTGC
61  TCCCGGAAGT CAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTAGGT AACCTGCCCC TTAGACTGGG
121 ATAAC TCCGG GAAACCGGAG CTAATACGGG ATAATAAAGA GAATCACCTG ATTCTCTTTT
181 GAAAGACGGT TTCGGCTGTC ACTAAGGGAT GGGCCTGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTAAG
241 GTAACGGCTT ACCAAGGCGA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG
301 GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC CGCAATGGAC
361 GAAAGTCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GAGGAAGGCC TTCGGGTCGT AAAGCTCTGT
421 TGTGAGGGAA GAACAAGTAC CGGCGTAACT ACCGGTACCT TGACGGTACC TCACCAGAAA
481 GCCACGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA
541 ATTATTGGGC GTAAAGCGCG CGCAGGCGCG TTCTTAAGTC TGATGTGAAA TCTCGGGGCT
601 CAACCCCGAG CGGCCATTGG AAAC TGGGAA GCTTGAGTGC AGAAGAGGAG AGTGGAATTC
661 CACGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGATATGT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GCGACTCTCT
721 GGTCTGTAAC TGACGCTGAG CGCGAAAAGCG TGGGGAGCAA AAGGATTAGA TACCTGGTAG
781 TCCACCCGTA ACGATGATGC TAGTGACG ATTCGATGCC GTAGTCCGAA GTAAACCCAT
841 AGCACTCCGC CTGGGGAGTA CGACGCAAGG CTGAAACTCA AAGGAAGTGA CGGGGATCCG
901 CACAAGCAGT GGAGCATGTG GTTTAATTCC AAGCAACGCG AAGAACCTTA TCAGGTCTGA
961 CATCCTTTGA CCACTCTGGA GACAGAGCTT CCCCATTCGG GGGCAAAGTG ACAGGTGGTG
1021 CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC
1081 CTTGATCTTA GTTGCCAGCA TTCAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTCCCGC CGCCACCACA
1141 ACCAAAAAAA GGTGAGACGA CGTCAAAAAT CATGACCCGT CACTCTTCAC CCCGTTATCA
1201 CGGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGATGGT CATGACAAGA GCGGCAAACC GGGGGGGCAC
1261 ACTCCAAACA CCTCTCTGTT GGGTTGTGGG GGCCCATTTT CCTACACGAA ACCCCGGATT
1321 GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT GAATACGTTT CCGGGTCTTG TACACACCGC
1381 CCGTCACACC ACGAGAGTTT GTAACACCCG AAGTCGGTGA GGTAACCTTT TGAGCCAGCC
1441 GCCTTAAGGT GGGACCAAAT

```

Bacillus sp V3 16S rDNA : 1320 bp;
 Birleşim: 333 A; 300 C; 421 G; 266 T; 0 OTHER
 Yüzde birleşim: 25.2% A; 22.7% C; 31.9% G; 20.2% T; 0.0% OTHER
 Moleküler ağırlık (kDa): ssDNA: 410.30 dsDNA: 813.84

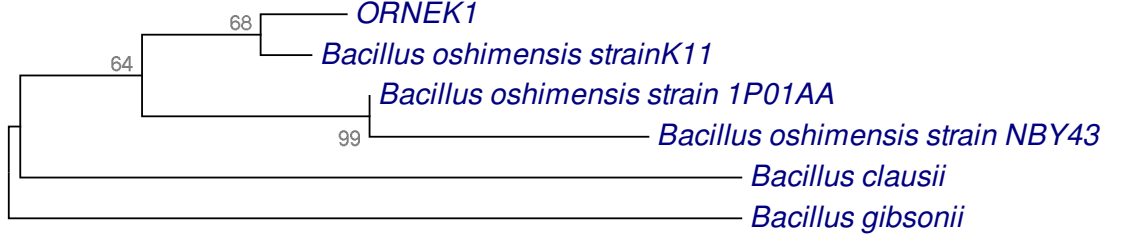
ORİJİN

```

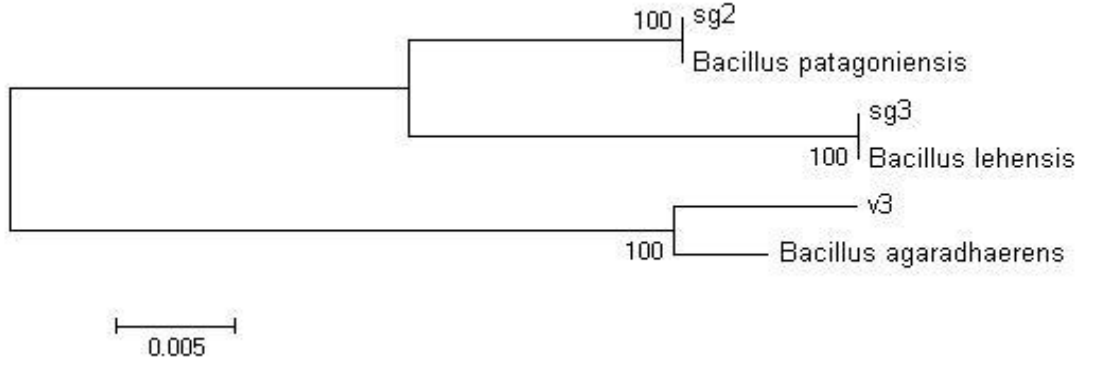
1   TTCGGGGTGA AGCCGGTGGA ATGAGCGGCG GACGGGTGAG TAACACGTGG GCAACCTACC
61  TTGTAGACTG GGATAACTCC GGGAAACCGG GGCTAATACC GGATGATCAT TTGGATCGCA
121 TGATCCGAAT GTAAAAGTGG GGATTTATCC TCACACTGCA AGATGGGCCC GCGGCGCATT
181 AGCTAGTTGG TAAGGTAATG GCTTACCAAG GCGACGATGC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG
241 ATCGGCCACA CTGGAAGTGA GACACGGTCC AGACTACTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT
301 CATCCGCAAT GGGCGAAAGC CTGACGGTGC AACGCCGCGT GAACGATGAA GGTTTTCGGA
361 TCGTAAAGTT CTGTTATGAG GGAAGAACAA GTGCCGTTTCG AATAGGTCGG CACCTTGACG
421 GTACCTCACG AGAAAGCCCC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGGG
481 CAAGCGTTGT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGCGCGCAG GCGGTCTCTT AAGTCTGATG
541 TGAAAGCCCC CGGCTCAACC GTGGAGGGTC ATTGGAAACT GGGGGAATTG AGTGTAGGAG
601 AGGAAAGTGG AATTCCACGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATGTGGAGG AACACCAAGT
661 GCGAAGGCGA CTTTCTGGCC TACAAGTAC GCTGAGGCGC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA
721 GGATTAGATA CCTGGTAGTC ACGCCGTAAA CGATGAGTGC TAGGTGTTAG GGGTTTCGAT
781 ACCTTAGTGC CGAAGTTAAC ACATTAAGCA CTCCGCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGGCTG
841 AAAC TCAAAG GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCAGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGAAG
901 CAACGCGAAG AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCTCTGACA CCTCTGGAGA CAGAGCGTTC
961 CCCTTCGGGG GACAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG
1021 TTGGGTAAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTGATCTTAG TTGCCAGCAT TCAGTTGGGC
1081 ACTCTAAGGT GACTGCCGGT GATAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAATCATCAT
1141 GCCCCTTATG ACCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGATG GTACAAAGGG CAGCGAGACC
1201 GCGAGGTTAA CGGAATCCCA TAAAGCCATT CTCAGTTCGG ATTGCAGGCT GCAACTCGCC
1261 TGCATGAAGC CGGAATTGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA TACGTTCCCC

```

Ek. 7.7. Filogenetik Değerlendirme Sonucu

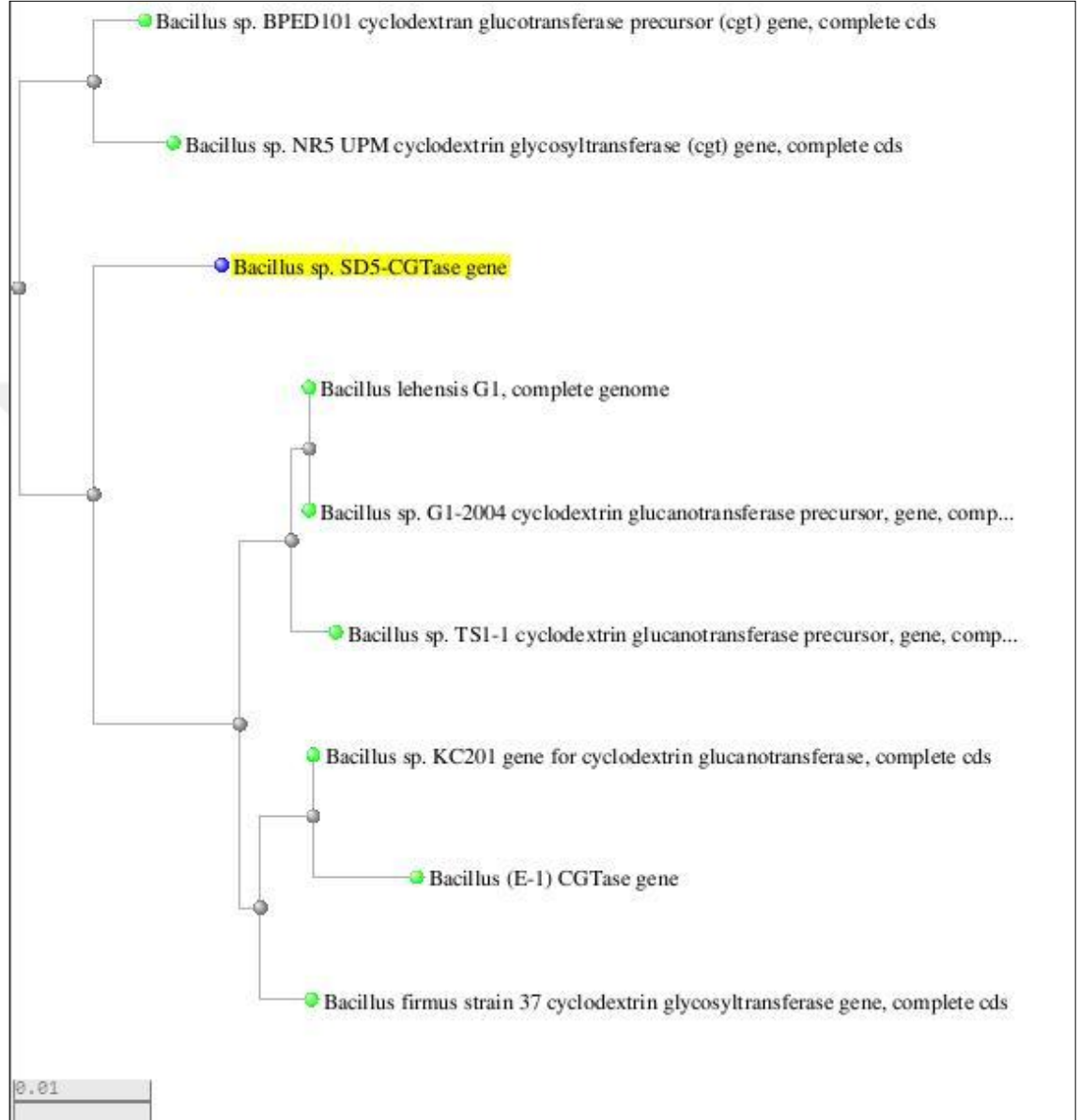


Bacillus SD5 suşuna ait 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre tarafımıza gönderilmiş olan filogenetik ağaç.



Bacillus SG2, SG3 ve V3 suşlarına ait 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre tarafımıza gönderilmiş olan filogenetik ağaç.

Ek. 7.8. SGTaz Geni Filogenetik Değerlendirme Sonucu



Ek. 7.9. SGTaz Geni Dizisinin NCBI Veritabanında Diğer Suşlara Ait Gen Dizileriyle Karşılaştırılması

```

FILE: Multiple_Sequence_Alignment
PROJECT:
NUMBER: 5
MAXLENGTH: 2025
NAMES: Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni Bacillus_sp._KC201-
SGTaz_geni Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni
MAXNAMELEN: 31
FEATURES
ORIGIN
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      GACGTAACAAACAAAGTCAATTACTCAAAAGATGTGATTT      40
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  -----t-----a-----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      ACCAGGTTGTTACCGATCGATTCTCTGACGGGAATCCTGG      80
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    -----a-----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  -----a-----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      CAACAATCCTTCAGGCGCTATCTTTAGTCAAACTGTATA      120
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  -----c-----a-----g-----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      GATCTCCATAAGTATTGTGGTGGGGACTGGCAAGGGATTA      160
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----t-----
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    -----t-----g-----
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      TAGACAAAATCAATGACGGTTACTTAACTGATTTAGGCAT      200
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      TACGGCACTATGGATTTCTCAGCCGGTCGAAAATGTTTAC      240
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----a-----c-----t
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    -----a-----c-----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  -----c-----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    -----a-----c-----t
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      GCCTTACACCCAAGCGGCTATACCTCCTACCATGGATATT      280
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  ---c-----
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    ---c-----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    ---c-----
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      GGGCTCGAGATTACAAAAAGACAAACCCTTACTATGGGAA      320
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    -----c-----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      TTTTGATGACTTTGATCGTTTAAATGAGTACCGCACATAGC      360
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni  ---c-----a-----
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni    -----
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni      AATGGGATAAAGGTAATCATGGATTTACGCCAAATCATT      400
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni  -----

```

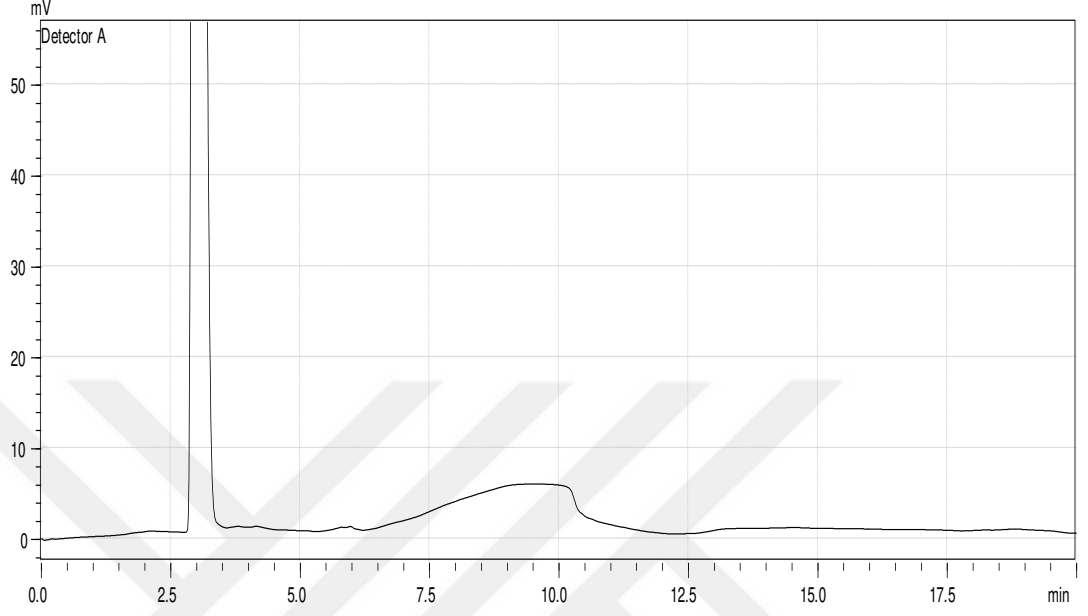
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	400
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	400
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----	400
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	CATCACCTGCACTTGAAACAAACCCCTAACTATGTTGAAAA	440
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----g-----g-----	440
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----g-----g-----	440
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	440
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----g-----g-----	440
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TGGTGCGGTTTATAATAATGGCGCATTATTAGGCAACTAT	480
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	---g---a-a---g-----a-----t-----	480
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	---g---a-a---g-----a-----t-----	480
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a-a---g-----a-----	480
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	---g---a-a---g-----a-----t-----	480
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TCAAATGATCAACATAACCTCTTTACCATAATGGCGGAA	520
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a-----c-----	520
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a-----c-----	520
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a-----c-----	520
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a-----c-----	520
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	CAGACTTCTCTTCTTATGAAGATAGCATCTACAGAACTT	560
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	---t-----a-----t-----	560
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	---t-----a-----t-----	560
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	---t-----a-----	560
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	---t-----a-----t-----	560
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	ATATGATTGGCAGACTATGATTAAACAACACAGTCATG	600
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----c-----	600
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----c-----	600
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	600
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----c-----	600
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GATCAGTATTTAAAGGAGTCGATTAAGTTCTGGTTAGATA	640
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	---a-----a-----	640
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	---a-----a-----	640
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	640
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	---a-----a-----	640
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	AAGGGATTGATGGCATTGAGTAGATGCCGTTAAGCATAT	680
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	680
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----c-----	680
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----t-----g-----	680
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----	680
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GTCAGAAGGGTGGCAAACCTCTTTAATGAGCGAAATCTAT	720
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	720
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	720
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----c-----	720
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----	720
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TCGCATAAACCTGTTTTCACTTTTGAGAAATGGTTTTAG	760
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a-----	760
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a-c-----	760
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a-----	760
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a-----	760
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GATCAGGAGAAGTTGATCCCCAAAACCATCACTTCGCTAA	800
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----t-----	800
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	800
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----tt-----c-----c--	800
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----t-----	800
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TGAAAGTGGTATGAGTTTATTAGATTTCCAATTCGGTCAA	840
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	840
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	840
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----c-----g-----t-----	840
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----	840
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	ACCATTTCGAAACGTCTTAAAAGATCGCACAAGCAACTGGT	880
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----t-----	880
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----t-----	880
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----t-----	880

Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----t-----	880
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	ATGATTTTCATGACATGATAAAAAAGTACTGAAAAAGAGTA	920
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	920
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----a--	920
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	920
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	920
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TAACGAGGTCATTGATCAAGTAACCTTTATTGATAATCAC	960
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	960
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	960
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	960
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	960
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GACATGAGTCGTTTTTCGGTAGGATCATCTTCAAACCGTC	1000
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1000
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1000
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1000
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1000
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	AGACAGATATGGCACTAGCTGTCTTGCTTACTTCTCGTGG	1040
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----c-----	1040
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----c-----	1040
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----g--t-----c-----	1040
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----c-----	1040
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TGTACCGACAWTTTACTACGGGACAGAGCAGTATGTAACA	1080
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a--ga-----	1080
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a--ga-----c---	1080
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----ga-----c-----	1080
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a--ga-----	1080
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GGTGGCAACGACCCTGAAAATCGCAAACCATTGAAAACAT	1120
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1120
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1120
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1120
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1120
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TTGATCGGTCTACCAACTCCTATCAAATCATCAGTAAACT	1160
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1160
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1160
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1160
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1160
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TGCTTCACTACGCCAAACAAATTCGCCTTAGGCTATGGC	1200
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1200
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1200
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----g-----	1200
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1200
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	ACTACAACCTGAACGTTGGCTGAACGAAGACATTTATTTTT	1240
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1240
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1240
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1240
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1240
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TTGAAAGAAAGTTTGGCACTAGTATTGTATTAACTGCTGT	1280
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	a-----c-----a-----	1280
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	a-----c-----a-----	1280
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	a-----c-----a-----	1280
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	a-----c-----a-----	1280
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	CAATAGCAGTAATAGTAACCAGACGATCACTAATTTAAAC	1320
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	a-----c-----a-----	1320
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	a-----c-----a-----	1320
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----c-----	1320
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	a-----c-----a-----	1320
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	ACCTCTTTACCTCAAGGGAACATACAGATGAACTACAGC	1360
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1360
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1360
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----g-----	1360
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----a----a-----t-cc-----a-----	1360

Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	AACGTTTAGATGGAAACACGATTACTGTAAACGCCAATGG	1400
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1400
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	1400
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	1400
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----	1400
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	CGCCGTAAATTCCTTTCCATTACGAGCAAATAGCGTAGCG	1440
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	a-----a-----	1440
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a-----	1440
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	1440
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	a-----a-----	1440
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GTTTGGCAAGTAAGCAACCCCTCTACGTCTCCTCTAATCG	1480
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1480
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----t-----	1480
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	1480
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----	1480
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GCCAAGTAGATCCTATGATGGGTAAGGCCGGGAATACCAT	1520
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----g-g-----t-----	1520
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----g-g-----	1520
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----g-----	1520
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----g-g-----t-----	1520
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	AACAGTAAGCGGTGAAGGATTTGGTGATGAGAGAGGAAGC	1560
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1560
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	1560
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----c-----g---	1560
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----	1560
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GTTCTCTTTGACTCAACCTCTTCTGAAATTATTCTTGGT	1600
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----t-----	1600
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----t-----	1600
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	--a-----t-----	1600
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----t-----	1600
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	CAAATACAGAAATAAGCGTAAAGGTGCCTAATGTAGCAGG	1640
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1640
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a-----	1640
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	1640
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----	1640
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	CGGTTATTATGATCTATCCGTCGTAACGCAGCAAACATA	1680
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----t-----	1680
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	1680
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----t-----	1680
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----t-----	1680
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	AAAAGCCCTACTTACAAAGAGTTTGAAGTATTGTCAGGCA	1720
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1720
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	1720
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----g-----	1720
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----	1720
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	ATCAAGTCAGTGTCGCTTTGGTGTTAACAATGCCACAAC	1760
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1760
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	1760
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----t-----	1760
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----c-----	1760
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GAGCCCAGGAACCAATTTATATATATCGTTGGGAATGTGAGC	1800
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1800
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----a-a-----	1800
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	1800
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----	1800
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GAGCTGGGGAATTGGGATGCTGATAAAGCAATTGGACCTA	1840
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1840
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	1840
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	1840
Bacillus_sp._TS1-l-SGTaz_geni	-----t-----	1840
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TGTTTAACCAAGTGATGTACCAATACCCAACGTGGTACTA	1880
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----a-----	1880

Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	1880
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	1880
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----t-----t-----	1880
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TGATATTAGCGTTCCTGCCGAAAAAACCTTGAATACAAA	1920
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1920
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----c-----	1920
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----t-----	1920
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----	1920
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	TACATTAAAAAGATCAGAACGGTAACGTTGTCTGGCAAA	1960
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	1960
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	1960
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	1960
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----c-----	1960
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	GTGGCAATAATCGAACCTATACGTCACCTACTACCGGAAC	2000
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----c-----g-----	2000
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----g-----	2000
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	2000
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----	2000
Bacillus_sp._SD5-SGTaz_geni	AGATACGGTTATGATTAATTGGTAA	2025
Bacillus_sp._G1-2004-SGTaz_geni	-----	2025
Bacillus_sp._KC201-SGTaz_geni	-----	2025
Bacillus_sp._NR5_UPM-SGTaz_geni	-----	2025
Bacillus_sp._TS1-1-SGTaz_geni	-----	2025

Ek. 7.10. Salt Nişasta İçeren Bir Çözeltiye Ait Kromatogram



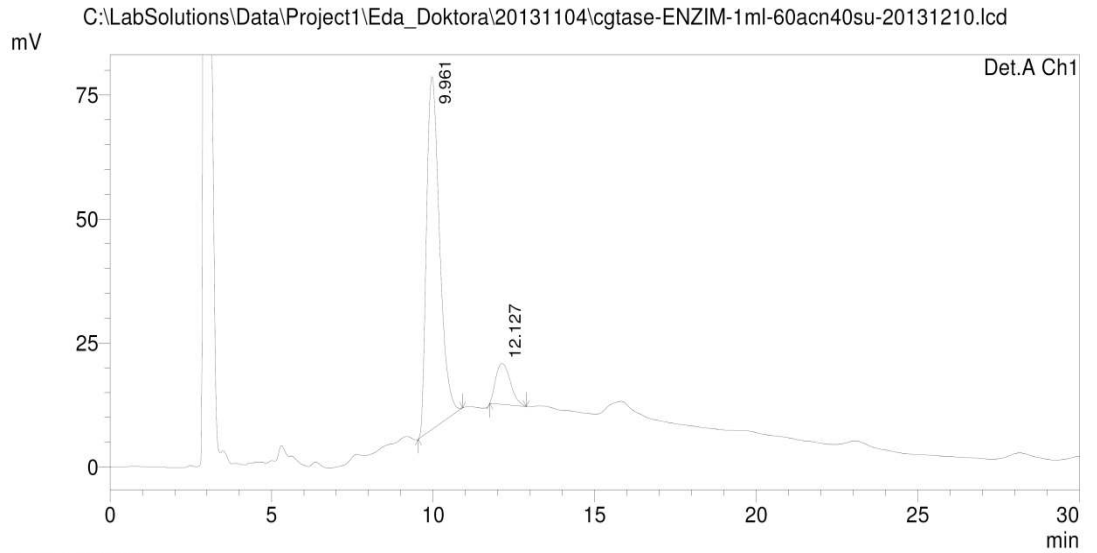
Salt nişasta içeren bir çözeltinin meydana getirdiği temel hattın kromatogram görüntüsü

Ek. 7.11. HPLC Analizi Sonuçları

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Eda_Doktora\20131104\cgtase-ENZIM-1ml-60acn40su-20131210.lcd
Acquired by : Admin
Sample Name : cgtase-ENZIM-1ml-60acn40su-20131210
Sample ID : cgtase-ENZIM
Tray# : 1
Vail # : 2
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : cgtase-ENZIM-1ml-60acn40su-20131210.lcd
Method File Name : CD_cal.lcm
Batch File Name : 20131107.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 10.12.2013 19:11:03
Data Processed : 07.05.2015 14:07:03

<Chromatogram>



1 Det.A Ch1/

Quantitative Results

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	alpha_CD	0.000	0	0	0.000
2	beta_CD	9.961	2002864	71152	3366.596
3	gamma_CD	12.127	260309	8238	420.138

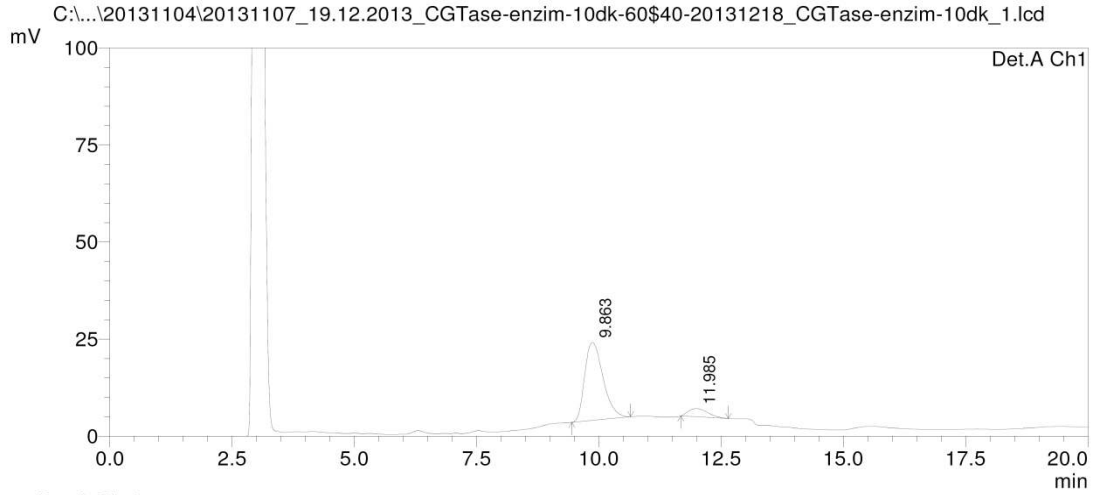
Rekombinan SGTaz enziminin nişasta ile 24 saat reaksiyonu sonrası HPLC analizi sonuçları

HPLC Analizi Sonuçları'nın devamı

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\...\20131104\20131107_19.12.2013_CGTase-enzim-10dk-60\$40-20131218_CGTase-enzim-10dk_1.lcd
Acquired by : Admin
Sample Name : CGTase-enzim-10dk-60/40-20131218
Sample ID : CGTase-enzim-10dk
Tray# : 1
Vail # : 7
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 20131107_19.12.2013_CGTase-enzim-10dk-60\$40-20131218_CGTase-enzim-10dk_1.lcd
Method File Name : CD_cal.lcm
Batch File Name : 20131107.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 19.12.2013 18:33:01
Data Processed : 20.04.2015 15:47:20

<Chromatogram>



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	9.863	525361	20093	90.021	852.494
2	11.985	58237	2100	9.979	89.602
Total		583598	22193	100.000	

Rekombinan SGTaz enziminin nişasta ile 10 dk reaksiyonu sonrası HPLC analizi sonuçları

ÖZGEÇMİŞ

Eda KABACAOĞLU 1985 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğrenimini Manisa ve Bursa, orta ve lise öğrenimini Bursa'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2009 yılında Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. Şubat 2010 Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Aynı Anabilim Dalı'nda eğitimine devam etmektedir.

