T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEREL *Bacillus* İZOLATLARINDAN ALFA AMİLAZLARIN KLONLANMASI ve REKOMBİNANT *amy*28 ALFA AMİLAZININ ENZİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

MERVE TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEREL *Bacillus* İZOLATLARINDAN ALFA AMİLAZLARIN KLONLANMASI ve REKOMBİNANT *amy*28 ALFA AMİLAZININ ENZİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

MERVE TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

GEBZE

2013

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ	**DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU**

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/10/2013 tarih ve 2013/55 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 22/10/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK 'ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : YRD. DOÇ. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

ÜYE : PROF. DR. TAMER YAĞCI

ÜYE : PROF. DR. NEŞ'E BİLGİN

ÜYE : DOÇ. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

ÜYE : YRD. DOÇ. DR. F. İNCİ ÖZDEMİR

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

α- Amilaz (EC 3.2.1.1) nişasta ve benzeri karbohidratlardaki α-1,4 glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyerek oligosakkarit ve glukoz oluşturan, önemli endüstriyel enzimlerden biridir. Gıda, tekstil, kağıt, deterjan ve farmasötik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan amilazlar, dünya enzim pazarının yaklaşık % 30'unu oluşturmaktadır. Bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebildiği halde endüstriyel uygulamalarda genellikle mikrobiyal olanları tercih edilir. Bu çalışmada, Türkiye'deki çeşitli kaynaklardan izole edilmiş *Bacillus* soylarının α-amilaz genleri iki PCR basamağı kullanılarak ligaz bağımlı olmayan bir yöntemle klonlandı ve *E. coli*'de eksprese edildi. Elde edilen klonlardan, en yüksek α-amilaz aktivitesine sahip olanı enzim saflaştırma ve nitelendirme çalışmalarına alındı. Rekombinant enzim % 22 verimle 16 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin biyokimyasal nitelendirme çalışmaları sonucu, enzimin 70°C'ta ve pH 6.0'da optimal aktivite gösterdiği görüldü. Rekombinant α-amilaz, pH 5.0-12.0 aralığında ve 70°C'a kadar olan sıcaklıklarda kararlılık gösterdi. 2-merkapto etanolün enzimin 50°C'taki kararlılığını arttırdığı, bununla birlikte 10 mM EDTA ve PMSF, % 30 gliserol, etilen glikol ve DMSO'nun enzimi inhibe ettiği görüldü.

Anahtar Kelimeler: α-amilaz, *Bacillus*, Ligaz-bağımlı Olmayan Klonlama, Saflaştırma, Biyokimyasal Nitelendirme.

SUMMARY

α-Amylase (EC 3.2.1.1) is one of the most important industrial enzymes which catalyze the hydrolysis of α-1,4 glycosidic bonds in starch components and related carbohydrates, yielding oligosaccharides and glucose as end products. Amylases constitute a class of industrial enzymes representing approximately 30 % of the world enzyme production. They have wide number of applications in food, textile, paper, detergent and pharmaceutical industries. Although amylases can be derived from a several sources, including plants, animals and microorganisms, microbial enzymes generally have been preferred to industrial applications. In this work, the α-amylase genes from *Bacillus* strains which have been isolated from various sources in Turkey was cloned with a ligase-independent method via two-step PCR and expressed in *Escherichia coli*. Among the clones, higher α-amylase producing strain was selected for enzyme purification and characterization studies. The recombinant enzyme was purified ~16 fold with 22 % yield. Biochemical characterization studies of purified enzyme showed that the enzyme had an optimal activity at 70°C and at pH 6.0. The amylase was stable at pHs ranging from 5.0 to 12.0 and temperature up to 70°C. 2-ME was increased the stability of the enzyme at 50 ^{o}C. However, it can be partially inhibited by 10 mM EDTA and PMSF, as well as 30 % of glycerol, ethylene glycol and DMSO.

Keywords: α-amylase, *Bacillus*, Ligase-independent Cloning, Purification, Biochemical Characterization.

TEŞEKKÜR

Prof. Dr. Füsun Gümüşel, Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever Öztürk, Prof. Dr. Tamer Yağcı, Dr. Nagihan Akbulut, Dr. Alp Kibaroğlu, Uzman Hüseyin Balcı, Veysel Süzerer, Prof. Dr. Aziz Tanrıseven, Doç. Dr. Kadriye Tuzlakoğlu, Şevket Gökhan Öztürk ve Aileme teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmanın bir bölümü Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (2007 A-10).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. NİŞASTA ve α-AMİLAZLAR	3
2.1.Nişasta	3
2.2. Nişastayı Parçalayan Enzimler	4
2.2.1. α-Amilazlar	5
2.2.1.1. Amilazların Mikrobiyal Kaynakları	6
2.2.1.2. Mikrobiyal α-amilazların Üretimi	6
2.2.1.3. Üretimi Etkileyen Faktörler	7
2.2.1.4. α-Amilazların Domain Organizasyonu	8
2.2.1.5. α-Amilazların Katalitik Mekanizması	9
2.2.1.6. α-Amilazların Biyokimyasal Özellikleri	10
2.2.1.7. α-Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi	11
2.2.1.8. α-Amilazların Saflaştırılması	12
2.2.1.9. α-Amilazların Endüstriyel Süreçlerde Kullanımı	13
2.2.1.10. Biyoteknolojik Uygulamalar	14
2.2.1.11. *Bacillus* Cinsinin Biyoteknolojideki Yeri	18
3. KLONLAMA	20
4. GEREÇ	22
4.1. Kullanılan Sarf Malzemesi	22
4.2. Kullanılan Cihazlar	25

5. YÖNTEM 27
5.1. Tez Kapsamında Kullanılan Biyolojik Materyaller 27
5.2. Yerel *Bacillus* Soylarının Genomik DNA İzolasyonu 28
5.3. Yerel Soyların Alfa Amilaz Genlerinin PCR ile Çoğaltılması 28
5.4. Çoğaltılan genlerin restriksiyon endonükleazları ile kontrolü 30
5.5. Genomdan PCR ile Doğrudan Klonlama 30
5.6. Transformasyon 33
5.7. Klon Adaylarında α-amilaz Geni Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler 34
5.7.1. STET Plazmit İzolasyonu Yöntemi 34
5.7.2. "Promega Wizard miniprep kit" Plazmit DNA İzolasyonu 35
5.8. Klonlanan Genlerin DNA Dizi Analizi 36
5.9. Klonların Ekspresyon Çalışması 37
5.9.1. 3 ml Besi yerinde Yapılan Ekspresyon Çalışması 37
5.9.2. Hücre İçi Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi için Hücrelerin Ultrasonik Ses Dalgaları ile Parçalanması 39
5.9.3. 15 ml Besi Yerinde Yapılan Ekspresyon Çalışması 40
5.10. A28/1 Klonunun α-Amilazının Saflaştırılması 40
5.10.1. Protein Miktarının Belirlenmesi 41
5.10.2. Saflaştırılan Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizi 42
5.10.2.1. SDS-PAGE 42
5.10.2.2. Zimogram 43
5.11. Enzim Nitelendirme Çalışmaları 43
5.11.1. pH'nın Enzim Aktivite ve Kararlılığına Etkisi 44
5.11.2. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi ve Kararlılığına Etkisi 44
5.11.3. Metal İyonları ve Amonyum Tuzlarının Etkisi 45
5.11.4. Çeşitli Kimyasalların ve Stabilize Edici Ajanların Enzim Aktivitesine Etkisi 45
5.11.5. Deterjanların Etkisi 45
5.11.6. Çeşitli substratların % 1 konsantrasyonda göreceli aktivitelerinin belirlenmesi 46
5.11.7. İstatistiksel analizler 46
6. BULGULAR 47

6.1. Yerel *Bacillus* Soylarından α-Amilaz Genlerinin PCR ile Çoğaltılması 47
6.2. Çoğaltılan Genlerin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kontrolü 51
6.3. Genomdan PCR ile Doğrudan Klonlama 52
6.4. PCR ile Yapılan Klonlamadan Elde Edilen Klonların Ekspresyon Çalışmaları 55
6.4.1. 3 ml Besi Yerinde Büyütülerek Yapılan Ekspresyon Çalışması 55
6.4.2. 15 ml Besi Yerinde Yapılan Ekspresyon Çalışması 58
6.5. Klonların Dizi Analizi Sonuçları 60
6.6. *amy*28 α-Amilazının Saflaştırılması 64
6.7. *amy*28 α-Amilazının Nitelendirilmesi 66
6.7.1. pH'nın Rekombinant Enzimin Aktivite ve Kararlılığına Etkisi 66
6.7.2.Sıcaklığın Rekombinant α- Amilaza Etkisi 67
6.7.3. Metal İyonlarının ve Amonyum Tuzlarının Rekombinant α- Amilaz Üzerindeki Etkisi 68
6.7.4. Deterjanların α-Amilaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 69
6.7.5. Çeşitli Kimyasal Ajanların Enzimin Kararlılığı Üzerine Etkisi 70
6.7.6. *amy*28 α-amilazının % 1 konsantrasyondaki substratlar ile aktivitesinin belirlenmesi 71
7. TARTIŞMA 72
8. SONUÇ 83
9. ÖNERİLER 85

KAYNAKLAR 86
ÖZGEÇMİŞ 94
EKLER 95

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
α	:	Alfa
β	:	Beta
^{o}C	:	Derece santigrat
µg	:	Mikrogram
µm	:	Mikrometre
µM	:	Mikromolar
APS	:	Amonyum persülfat
ATP	:	Adenozin trifosfat
$BaCl_2$	:	Baryum Klorür
bç	:	Baz çifti
BSA	:	Sığır serum albümin
$CaCl_2$	:	Kalsiyum Klorür
$CoCl_2$	:	Kobalt Klorür
$CuCl_2$	:	Bakır Klorür
dk	:	Dakika
DNA	:	Deksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksiribonükleotit trifosfat
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
DTCS	:	Dye Terminator Cycle Sequencing
EDTA	:	Etilendiamintetraasetikasit
EtOH	:	Etanol
$FeCl_2$	:	Demir II klorür
$FeCl_3$	:	Demir III klorür
$FeSO_4$	:	Demir sülfat
g	:	Gram
HCI	:	Hidroklorik asit
IPTG	:	İzopropil thio-β-D-galaktozid
kb	:	(kilo) baz
kDa	:	(kilo) Dalton

KCl	:	Potasyum klorür
$LiCl_2$	:	Lityum klorür
M	:	Molar
Mg^{+2}	:	Magnezyum iyonu
$MgCl_2$	:	Magnezyum klorür
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
Mn^{+2}	:	Mangan iyonu
$MnCl_2$	:	Mangan klorür
$MgCl_2$	:	Magnezyum klorür
NaAc	:	Sodyum asetat
NaCl	:	Sodyum klorür
NaH_2PO_4	:	Sodyum dihidrojen fosf at
Na_2HPO_4	:	Disodyum hidrojen fosfat
nm	:	Nanometre
NH_4Ac	:	Amonyum asetat
$(NH_4)_2SO_4$	:	Amonyum sülfat
$NiCl_2$	:	Nikel klorür
OD	:	Optik yoğunluk
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG8000	:	Polietilen glikol 8000
PMSF	:	Fenil metil sülfonil florid
pmol	:	Pikomol
rDNA	:	Ribozomal DNA
rpm	:	Dakika başına rotasyon
SDS	:	Sodyumdodesilsülfat
sn	:	Saniye
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
U	:	Ünite
UV	:	Ultraviyole
V	:	Volt
$ZnCl_2$	:	Çinko klorür
$ZnSO_4$	:	Çinko sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		**Sayfa**
2.1:	Nişastanın yapısı.	3
2.2:	Nişastanın bileşenleri. a) Amiloz b) Amilopektin.	4
2.3:	Nişastayı parçalayan enzimler.	5
2.4:	*B. subtilis* α- amilazı (AmyQ (GenBank accession number JQ768415)) için önerilen yapısal bir model.	8
2.5:	Glikozil hidrolazların katalitik mekanizması. I. Glikozidik oksijenin protonlanması, II. Bir su molekülünün aktivasyonu ve C1-D231 kovalent bağının kırılması, III. Başlangıç durumuna geri dönüş.	9
2.6:	Nişasta yıkım süreçlerinde enzimlerin kullanımı.	15
6.1:	12AF-13AG primer çifti ile çoğaltılan PCR ürünlerinin % 1 agaroz jel profili.	49
6.2:	18AF-19AG primer çifti (kuyu :1-5 ve 7-10), 14AF-15AG primer çifti (kuyu: 11-16) ve 16AF-17AG primer çifti (kuyu: 17 ve 19-23) ile çoğaltılan PCR ürünlerinin % 1 agaroz jel profili.	50
6.3:	1FA-2GA primer çifti ile çoğaltılan P21 soyu PCR ürünlerinin % 1 agaroz jel profili.	49
6.4:	Preparatif olarak üretilen PCR ürünlerinin % 1 agaroz jel profili.	50
6.5:	Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve kesilmemiş PCR ürünlerinin agaroz jel profili.	53
6.6:	Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve kesilmemiş PCR ürünlerinin agaroz jel profili.	52
6.7:	PCR klonlama ile elde edilen kolonilerin plazmit izolasyonu sonrası çift enzim kesimi.	53
6.8:	A3 soyu α-amilaz geninin PCR eliyle pUC19'a klonlanması sonucu elde edilen plazmitlerin *Hind*III-*Kpn*I kesimi.	54
6.9:	P17 soyu amilaz geni için ikinci PCR klonlama denemesi ile elde edilen kolonilerin plazmit izolasyonu sonrası çift enzim (*Pst*I-*Kpn*I) kesimi.	57

6.10: Klon A28/1'in 15 ml besi yerinde yapılan ekspresyon ile elde edilen aktivite ve hücre yoğunluğu grafiği. 60

6.11: a) SDS-PAGE görüntüsü. Kuyu1. Protein uzunluk belirteci, kuyu2. Jel filtrasyonu sonrası oluşturulan enzim havuzu, b) Enzim havuzunun zimogram görüntüsü. 65

6.12: *amy*28 α-amilazının optimal pH grafiği. Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir. 68

6.13: 4 ^{o}C (■) ve 50 ^{o}C (▲)'ta pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkisi. Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir. 67

6.14: *amy*28 α-amilazının optimal sıcaklık grafiği. Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir. 67

6.15: 50°C (eşkenar dörtgen), 60°C (kare), 70°C (üçgen dolgu) ve 80°C'ta (çarpı) sıcaklığın *amy*28 α-amilazının kararlılığına etkisi. Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir. 70

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
4.1:	Kullanılan sarf malzemeleri	22
4.2:	Kullanılan cihazlar	25
5.1:	Kullanılan yerel izolatlar, izole edildiği kaynak özellikleri ve tiplendirme çalışmaları sonucunda önerilen tür adları.	27
5.2:	Kullanılan primerler.	29
5.3:	Alfa amilaz genleri için PCR koşulları ve programı.	29
5.4:	Genomdan fragman çoğaltmak için yapılan PCR koşulları ve programı.	31
5.5:	Klonlama PCR'sinde kullanılan koşul ve program.	32
5.6:	Dizi analiz reaksiyonunda uygulanan PCR koşul ve programı.	36
5.7:	Maltoz standardının tüplere dağılımı.	38
5.8:	SDS-PAGE'de kullanılan jeller.	42
6.1:	Preparatif PCR için seçilen primer çiftleri ve $MgCl_2$ konsantrasyonları.	50
6.2:	Ligasyonsuz klonlama sonucunda elde edilen α-amilaz klon adayları ile 0,1 mM IPTG ile uyarımlı koşullarda 3 ml besi yerinde gerçekleştirilen ekspresyon çalışması sonucunda elde edilen hücre dışı enzimatik aktivite ve hücre büyümesi değerleri.	56
6.3:	A4 ve P17 soylarının ligasyonsuz klonlama sonucunda elde edilen α-amilaz klon adayları ile 0,1 mM IPTG ile uyarımlı koşullarda 3 ml besi yerinde gerçekleştirilen ekspresyon çalışması sonucunda elde edilen hücre dışı enzimatik aktivite ve hücre büyümesi değerleri.	57
6.4:	α-amilaz klon adaylarıyla 15 ml besi yerinde 0,1 mM IPTG ile uyarımlı koşullarda yapılan ekspresyon çalışmasının sonucunda elde edilen hücre dışı aktivite ve hücre yoğunluğu değerleri.	59
6.5:	α-amilaz klon adaylarıyla 15 ml besi yerinde 0,1 mM IPTG ile uyarımlı koşullarda yapılan ekspresyon çalışmasının sonucunda elde edilen hücre içi aktivite (U/ml) değerleri.	60
6.6:	A3 yerel soyundan elde edilen klonun (A3/9) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.	61
6.7:	A23 yerel soyundan elde edilen klonun (A23/5) taşıdığı fragmanın	61

benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.
6.8: A26 yerel soyundan elde edilen klonun (A26/3) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. 61
6.9: A28 yerel soyundan elde edilen klonun (A28/1) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. 62
6.10: P19 yerel soyundan elde edilen klonun (P19/3) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. 62
6.11: A4 yerel soyundan elde edilen klonun (A4/8) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. 62
6.12: P17 yerel soyundan elde edilen klonun (P17/12)taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. 63
6.13: *amy*28 α-amilazının saflaştırılması. 65
6.14: Metal iyonlarının *amy*28 α-amilazına etkisi. 69
6.15: Deterjanların *amy*28 α-amilazına etkisi. 70
6.16: Çeşitli kimyasal ajanların amy28 α-amilazının kararlılığına etkisi. 70
6.17: *amy*28 α-amilazının % 1 konsantrasyondaki substratlara göreceli aktivitesi. 71

1.GİRİŞ

Nişasta, glukoz ünitelerinin birbirine glikozidik bağlarla C1 pozisyonunda bulunan oksijenden bağlanmasıyla oluşan bir polimerdir. Amilazlar nişastada bulunan bu glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir ve çok çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan izole edilebilmektedir. Bu geniş çeşitliliğe rağmen endüstriyel üretimde maliyet, zaman, üretim alanı, sürecin modifikasyonu ve optimizasyonu gibi avantajlarından dolayı mikrobiyal kaynaklı olanlar tercih edilmektedir.

Bugün α-amilazlar gıda, deterjan, tekstil ve kağıt endüstrilerinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca farmasötik ve kimyasal endüstrilerinde de kullanım potansiyeli mevcuttur. Böylece, nişastanın endüstriyel süreçlerdeki kimyasal hidrolizinin yerini mikrobiyal α-amilazlar almıştır. Buna rağmen spesifik uygulamalar için gereklilikleri karşılayacak özellikte yeni ve gelişmiş α-amilazların bulunmasına yönelik ilgi devam etmektedir.

1.1. Tezin Amacı, İçeriği ve Bilime Katkısı

Yaban tipteki bir enzimin uygun vektörler aracılığıyla güvenli ve kolay manipüle edilebilen bir konakçıya klonlanması ve ekspresyonu birçok enzim özelinde çalışılmıştır. Bununla birlikte, literatürde klonlamada karşılaşılan sıkıntılar dikkat çekicidir. Klonlama basamağını restriksiyon kesimi ve ligaz kullanmaksızın tek bir PCR basamağıyla gerçekleştiren yeni bir çalışma, yapışkan uçlu klonlama ile klonlanamayan genlerin klonlanması için farklı bir yaklaşım olarak göze çarpmaktadır. Çoğaltılmış genlerin istenilen bir plazmit vektöre PCR temelli bir yöntemle klonlanması henüz çok yeni bir klonlama yaklaşımıdır.

Bu tez çalışmasında, alfa amilaz üreticisi yerel soyların ilgili genlerinin PCR temelli bir yöntemle klonlanması, elde edilen aktif klonların enzim genlerine ait DNA dizilerinin belirlenmesi ve ekspresyonunun optimizasyonunun yanı sıra, en aktif olduğu belirlenen bir klonun α-amilazının saflaştırılması ve enzim özelliklerinin belirlenmesine yönelik nitelendirme çalışmaları yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucu, ligaz bağımlı olmayan, PCR temelli klonlama yaklaşımı ile yerel *Bacillus* soylarının ilgili genleri genomdan doğrudan

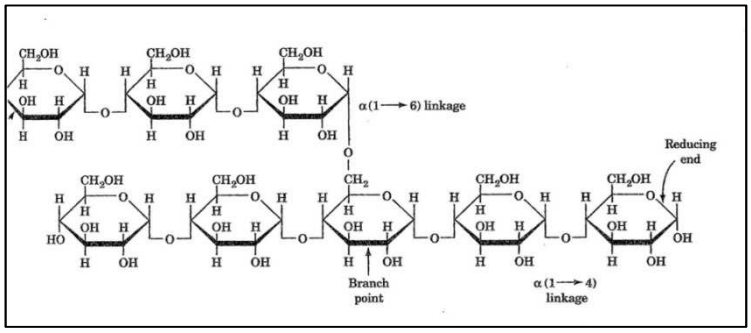
klonlanabilmiştir. Bu klonlama yöntemi, klonlamada karşılaşılan sıkıntıların giderilmesinde uygun bir yaklaşım olarak literatürde bu konuda yapılan çalışmalara katkı sağlayacaktır.

2. NİŞASTA VE α-AMİLAZLAR

2.1. Nişasta

Nişasta temel olarak büyük bitkilerin tohum, kök ve tüberlerinde bulunur. Bazı algler de “fitoglikojen” olarak adlandırılan benzer bir depo polisakkarit üretirler. Bitkiler nişastayı fotosentezin bir sonucu olarak üretirler. Plastisitlerde sentezlenen nişasta ışıksız periyotlarda bitkilerde solunumda kullanılmak üzere depo edilir. Ayrıca tohum, kök ve tüberlerde bulunan amiloplastlarda uzun süreli depo materyali olarak sentez edilir. Çok sayıda bitki nişasta üretmesine rağmen, sadece birkaç bitki endüstriyel nişasta süreçleri için önemlidir. Bunlar patates, buğday, darı ve tapyokadır.

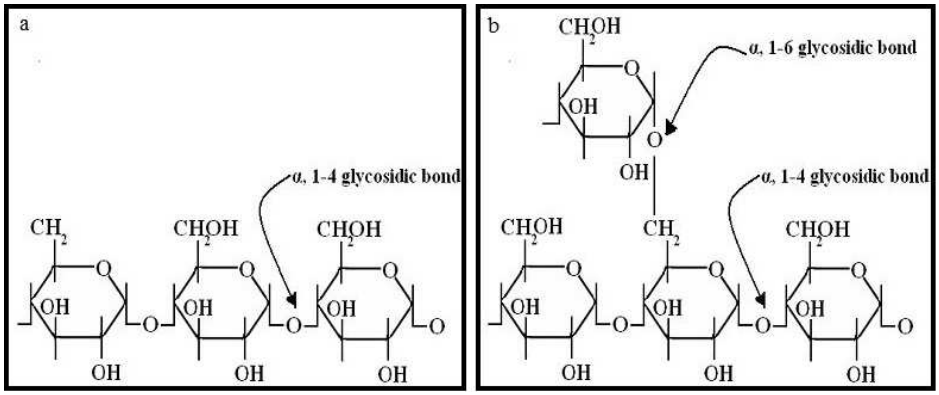
Nişasta glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış glukoz ünitelerinden meydana gelen bir polimerdir (Şekil 2.1). Bu bağ, yüksek pH’da stabil iken düşük pH’da hidroliz olur. Polimerik zincirin ucunda bir aldehit grubu mevcuttur. Bu grup “indirgen uç” olarak da bilinir. Nişastada iki tip glukoz polimeri vardır: Amiloz ve amilopektin [van der Maarel et al., 2002].



Şekil 2.1: Nişastanın yapısı.

Amiloz; α, 1-4 glukozidik bağlarla bağlanmış, sayıları 6000’i bulabilen glukozdan oluşan lineer bir polimerdir. Glukoz rezidülerinin sayısı “DP” (degree of polymerization) olarak da bilinir ve bu sayı orijine göre değişkenlik gösterir. Nişastanın kaynağına bağlı olarak amiloz ve amilopektin içeriği de değişebilmektedir. Mısır, arpa ve buğday gibi birçok nişasta çeşidinde ortalama amiloz içeriği % 20-30’dur [van der Maarel et al., 2002].

Amilopektin; kısa zincirli 10-60 glukoz ünitesinden oluşan, α, 1-4 bağlı lineer zincirleri ile bunları birbirine bağlayan, 15-45 glukoz ünitelik α,1-6 yan zincirlerinden oluşur. Amilopektindeki dallanma noktalarının sayısı ortalama % 5'tir, ancak bu oran bitkisel kaynağa göre değişkenlik gösterebilir. Bütün bir amilopektin molekülü yaklaşık 2.000.000 glukoz ünitesi içerir, böylelikle doğada bilinen en büyük moleküldür. Amilopektin suda çözünebiliyorken, amiloz ve nişasta granülünün kendisi soğuk suda çözünmez [van der Maarel et al., 2002]. Nişastanın bileşenleri Şekil 2.2'de [El-Fallal et al., 2012] yer almaktadır.



Şekil 2.2: Nişastanın bileşenleri, a) Amiloz b) Amilopektin.

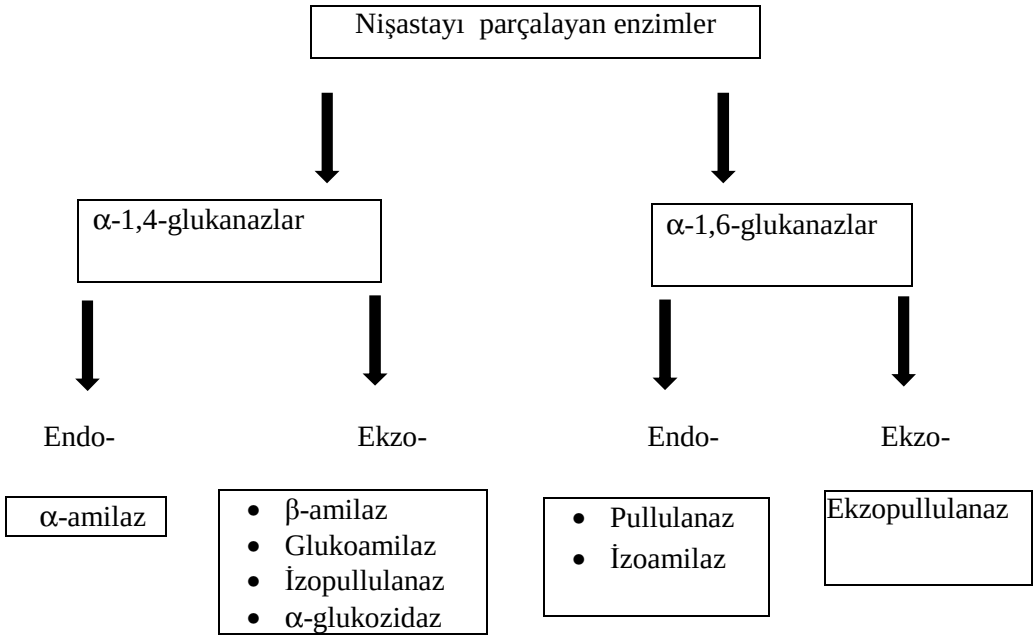
Doğal nişasta kısmen kristal yapıdadır. Son yıllarda kabul gören tasarıma göre amiloz amorf bir formda iken amilopektin nişastanın kristalin içeriğini oluşturmaktadır.

2.2. Nişastayı Parçalayan Enzimler

Nişastanın karmaşık yapısından dolayı hücreler nişastanın oligosakkaritlere ve glukoz ve maltoz gibi daha küçük şekerlere ayrılması için uygun enzimlere gereksinim duyarlar. Bu enzimler basit olarak 2 gruba ayrılır:

- "Endo-acting" ya da "endo-hidrolaz" adı verilen içten hidroliz eden enzimler.
- "Exo-acting" ya da "ekzo-hidrolaz" adı verilen dıştan hidroliz eden enzimler.

α-Amilaz gibi içten etki eden enzimler nişasta polimerinin içteki bağlarını rastgele hidroliz ederek, doğrusal ve dallanmış oligosakkaritlerin oluşumunu sağlarlar [Bertoldo and Antranikian, 2002]. Ancak α-amilazlara dirençli nişastanın da bulunduğu bilinmektedir [Bergmann et al., 1998]. Dıştan etkileyen nişasta hidrolazları β-amilaz, glukoamilaz ve α-glukozidaz olup, bu enzimler substratın indirgenmemiş ucunda küçük oligosakkaritler oluşturur [Bertoldo and Antranikian, 2002], [Duedahl-Olesen et al., 2000]. Nişastayı parçalayan enzimler Şekil 2.3'te [Synowiecki, 2007] verilmektedir.



Şekil 2.3: Nişastayı parçalayan enzimler.

2.2.1. α-Amilazlar

α-Amilazlar nişasta molekülünde bulunan α-1,4 glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Çeşitli kaynaklardan elde edilebilirler. Yaşayan tüm organizmalarda bulunmakla birlikte, aktivite, özgüllük ve gereklilik, türden türe hatta dokudan dokuya bile değişkenlik gösterir. Çiğ nişastayı parçalayan amilazlar insandan hayvana, mikroorganizmadan mayaya ve mantara kadar geniş çeşitlilikte organizma tarafından üretilirler.

2.2.1.1. Amilazların Mikrobiyal Kaynakları

Birçok α-amilaz üreticisi bakteri, mantar ve diğer mikroorganizma çeşidi uzun yıllardır izole edilmekte ve tanımlanmaktadır. Bakteriler ve mantarlar amilazları hücre dışına salarlar. Yüksek oranda amilaz üreten küf türleri arasında *Mucor* [Petruccioli and Federici, 1992], [Zare-Maivan and Shearer, 1988], türlerine ek olarak *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* [Aunstrup, 1979], *Thermomyces lanuginosus* [Arnesen et al., 1998] ve *Penicillium expansum* [Doyle et al., 1989] sayılabilir. Amilolitik mayalar amilaz salınımı ve nişasta hidrolizinin kapsamı bakımından oldukça farklıdır. *Filobasidiuim capsuligenum* soyları hem α-amilaz hem de glukoamilazı bir arada üreterek nişastanın ileri hidrolizini gerçekleştirebilmektedir [De Mot et al., 1984c], [McCann and Barnett, 1984]. Bakterilere bakıldığında, *Bacillus* ve yakın cinslerin çok geniş çeşitlilikte hücre dışı enzimleri ürettiği görülmektedir. Bunlar arasında bulunan α-amilazlar endüstriyel öneme sahiptir.

Bacillus cinsine ait bakteriler yüksek sıcaklıklarda kararlılık gösterebilen α-amilazların üretiminde ticari olarak kullanılırlar. *B. amyloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* gibi birçok *Bacillus* amilazının optimal pH'sı 5 ile 7 arasındadır. Çok sayıda alkali *Bacillus* amilazı da bulunmuştur. Bu alkali amilazlardan *Bacillus* sp. 707 ve *B. licheniformis* TCRDC-B13 suşu dışındakiler nişastanın "şekerleştirme" basamağını gerçekleştiren enzimlerdir [Bajpai and Bajpai, 1989], [Kimura et al., 1988].

E. coli ve *Streptococcus bovis*'de hücre içi α-amilaz kodlayan genler [Satoh et al., 1997], [Whitehead and Cotta, 1995] rapor edilmiştir. Bazı nitelendirme çalışmaları yapılmış olmasına rağmen her iki organizmada da bu enzim için açık bir fizyolojik rol tanımlanmamıştır. Bununla birlikte *S. bovis*'te hızlı hücre büyümesinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.

2.2.1.2. Mikrobiyal α-amilazların Üretimi

α-Amilazların üretiminde mikroorganizma kullanımının en büyük avantajı, ekonomik "bulk" üretim kapasitesi ve mikroorganizmaların istenen nitelikteki enzimlerin sağlanması amacıyla kolay manipüle edilebilmeleridir. α-amilaz

üreticilerinin taranması, üretim için anahtar basamaktır. Nişasta hidrolizi genellikle koloni etrafında oluşan zonlar ile agar yüzeyinde doğrudan tespit edilir. Hidroliz alanının çapı, amilazın gücü ile ilişkilidir.

2.2.1.3. Üretimi Etkileyen Faktörler

α-Amilazların besi yerinde üretimi ve kararlılığı çeşitli fizikokimyasal faktörlerden etkilenmektedir. İnkübasyon periyoduna bağlı olarak, birçok araştırıcı hücre dışı enzim üretiminin büyümeyle ilişkili olduğunu göstermiştir [Abou Dobara et al., 2011], [Asoodeh et al., 2010], [Murthy *et* al., 2009]. Kritik bir konsantrasyonun üzerindeki şeker birikmesinin enzim üretimini inhibe ettiği bilinmektedir. α-amilaz üretimi ve kararlılığını etkileyen fiziksel parametreler arasında, besi yeri sıcaklığı ve pH önemli yer tutar. Genellikle, α-amilaz üretiminde sıcaklığın etkisi organizmanın büyümesi ile ilişkilidir. Böylece, enzimin optimum sıcaklığı mikroorganizmanın mezofilik, termofilik ya da psikrofilik olması ile bağlantılıdır. Mantar ve aktinomisetler'de 25 °C- 40 °C arasında enzim üretimi açısından optimal verim sağlanmıştır [Gupta et al., 2003]. Bununla birlikte termofilik mantarlarda optimal sıcaklığı 50-55 ^{o}C olan α-amilaz üreten türler de bulunmaktadır (*Thermomyces lanuginosus* [Mishra and Maheshwari, 1996], *Thermomonospora fusca* [Busch and Stutzenberger, 1997] and *Thermoactinomyces vulgaris* [Abou Dobara et al., 2011]. Diğer yandan, *Thermococcale* ve *sulfolobus* türlerinde 90 °C'a kadar optimal sıcaklığı olan α-amilaz üreten soylar da bulunmaktadır [Leuschner and Antranikian, 1995], [Sunna et al., 1997]. Ayrıca üretim için enzim sentezinin başlangıç ve bitimindeki pH değerlerinin belirleyici olduğu rapor edilmiştir. Çünkü pH değişikliği besi yerindeki α-amilaz kararlılığını etkilemektedir. Aktif bölgesinde çok sayıda yüklü grubun bulunması birçok α-amilazın optimum pH'sının asidik-nötral aralıkta olmasını açıklar [Bozic et al., 2011], [Pandey et al., 2000], [Sun et al., 2010].

Genellikle, amilaz aktivitesi substrat kullanımı ile ilişkilidir. α-amilazların indüklenebilir olduğu farklı organizmalarda kanıtlanmıştır. α-amilaz üretimi ayrıca diğer indüklenebilen enzimlerde olduğu gibi substrat hidroliz ürünleri ile (maltoz ve glukozla) katabolik represyona uğrayabilmektedir. Bununla birlikte *Bacillus*

soylarında α-amilaz sentezinin monosakkaritler ile katabolit represyonunun olmadığı gösterilmiştir [Kalishwaralal et al., 2010]. Gupta et al. (2003) ksiloz ve fruktozun α-amilaz sentezini büyük oranda baskıladığını işaret etmiştir. Nişastanın besi yerine eklenmesinin α-amilaz üretimini tetiklediği literatürde çeşitli mikroorganizmalarda gösterilmiştir [Gupta et al., 2003].

Besi yerinin bazal elemanlarından olan nitrojen kaynağı α-amilaz üretiminin oldukça fazla etkiler. Organik nitrojen kaynaklarının çeşitli bakterilerde α-amilaz üretimini arttırdığına yönelik birçok çalışma bulunmakla birlikte, çeşitli inorganik tuzların mantarlarda üretimi desteklediği örnekler bulunmaktadır [Gupta et al., 2003].

2.2.1.4. α-Amilazların Domain Organizasyonu

α-Amilazlar, glikozil hidrolaz aile 13' ün üyesidir. Bu ailenin başlıca özellikleri arasında;

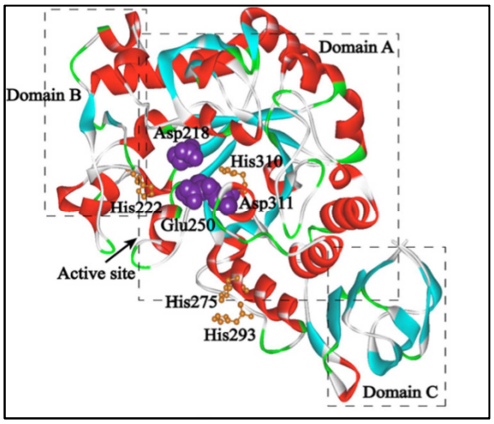
- α- Glikozidik bağlara etki ederek α-anomerik mono-oligosakkarit oluşturma ya da transglikolizasyon veya bu iki aktiviteyi birlikte taşımak,
- birincil dizilerde 4 korunmuş bölgenin bulunması,
- katalitik rezidüleri içinde bulunduran "$(\beta/\alpha)_8$ barrel" (TIM barrel) yapısının varlığı yer almaktadır.

Aile üyeleri genellikle çok az dizi benzerliği göstermekle birlikte (bütün dizide sadece ~%10 benzerlik), katalizde ve aktif bölgede yer aldıkları yönlendirilmiş mutagenez, X-ışını kristalllografi ya da teorik çalışmalarla kanıtlanmış 3 amino asit; Asp 206, Glu 230 ve Asp 297 (numaralandırma *B. licheniformis* α-amilazına (BLA) göre yapılmıştır) oldukça iyi korunmuştur.

α-Amilaz ailesi enzimleri arasındaki çok düşük dizi benzerliği, değişmez rezidülerin sayısının sadece 10 ile sınırlı olmasından anlaşılmaktadır. Bu rezidülerden yedisi aktif bölge ile ilgili iken, diğer üçünün yapısal olarak önemli olduğu kanıtlanmıştır.

Aile üyeleri için tanımlanan domainler; A, B, C, D ve E' dir. En iyi korunmuş domain TIM barrel' i içeren A domainidir. Domain B'nin işlevi tam olarak

bilinmemekle birlikte kalsiyum bağlanmasında rol alan bir korunmuş bölgesi bulunmaktadır. İşlevi bilinen bir diğer domain olan E, nişastanın bağlanmasında görev alır. D domainin tam olarak tanımlanmayan ancak olası işlevi, domain E' ye substrat bağlanmasında eşlik etmektir. C domaini üzerinde yapılan mutasyonlar sonucu bu bölümün aktivite üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır [D'Amico et al., 2000], [Janecek, 1997], [Kaur and Sharma, 2006]. *B. subtilis* α-amilazı için önerilen yapısal model Şekil 2.4'te [Yang et al., 2013] yer almaktadır.

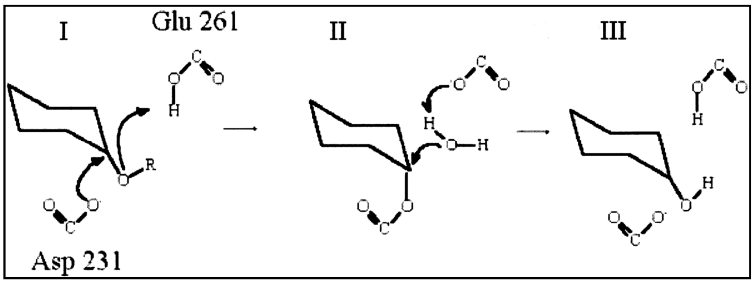


Şekil 2.4: *B. subtilis* α- amilazı (AmyQ (GenBank accession number JQ768415)) için önerilen yapısal bir model.

2.2.1.5. α-Amilazların Katalitik Mekanizması

Genel olarak, α-amilazlar nişasta polimerinde iç kısımlarda bulunan α-1,4 glikozidik bağların hidrolizini gerçekleştiren "endo amilazlar" olarak bilinirler. Glikozil hidrolazların diğer üyelerine benzer şekilde α-amilazlar, üç basamaklı bir katalitik mekanizma kullanır (Şekil 2.5). Birinci basamak, glikozidik oksijenin bir proton verici (Glu261) tarafından protonlanmasıdır. Bunu, -1 alt bögesindeki şeker rezidüsünün C1 karbonuna katalitik bir nükleofilin (Asp231) nükleofilik atak yapması takip eder. Substratın "aglikon" parçasının ayrılmasından sonra bir su molekülü muhtemelen protonunu vermiş olan Glu261 tarafından aktif hale getirilir. Bu su molekülü, nükleofilin oksijeni ile şeker rezidüsünün C1 karbonu arasındaki kovalent bağı hidroliz eder ve böylelikle katalitik döngü tamamlanır. Aktif bölgedeki üçüncü korunmuş amino asit olan Asp328 katalitik mekanizmada doğrudan rol

almaz. Bu amino asidin substratın bağlanma ve geçiş durumu kararlılığında rol oynağı düşünülmektedir [Nielsen and Borchert, 2000].



Şekil 2.5: Glikozil hidrolazların katalitik mekanizması, I. Glikozidik oksijenin protonlanması, II. Bir su molekülünün aktivasyonu ve C1-D231 kovalent bağının kırılması, III. Başlangıç durumuna geri dönüş.

2.2.1.6. α-Amilazların Biyokimyasal Özellikleri

Moleküler ağırlık: α-Amilazların molekül ağırlıkları 10 ile 210 kDa arası değişiklik gösterir. Bilinen en küçük α-amilaz, 10 kDa büyüklüğü ile *B. caldolyticus*'ta, en büyük ise 210 kDa büyüklüğü ile *Chloroflexus aurantiacus*'ta bildirilmiştir. Geniş çeşitlilikte mikrobiyal α-amilaz olmasına rağmen, moleküler ağırlıkları genellikle 40-70 kDa arasında değişmektedir [Gupta et.al., 2003]. Bununla birlikte bazı soylarda moleküler ağırlık işlenme ve proteoliz gibi basamaklar sonucu değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin; *Thermoactinomyces vulgaris*'te olduğu gibi glikolizasyon ile 140 kDa'a çıkabiliyorken [Abou Dobara et al., 2011], yine *T. vulgaris*'in bir suşunda (AmyTV1) proteoliz sonucu daha küçük peptidlere ayrılabilmektedir [Hofemeister et al., 1994].

Substrat özgüllüğü: α-Amilazın substrat özgüllüğü mikroorganizmalar arasında değişkenlik gösterir. Genelde, α-amilazlar en yüksek özgüllüğü nişastaya, daha sonra sırasıyla amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioza gösterirler [Gupta et.al., 2003].

Optimum pH ve kararlılık: α-amilazların optimum pH' ları 2 ile 12 arasında değişir. Birçok bakteriyel ve fungal amilaz asidik- nötral aralıklarda optimum pH gösterir. *Alicyclobacillus acidocaldarius* α-amilazı pH 3'te optimum aktivite gösterirken, alkalofilik *Bacillus* türlerinden pH 9-10.5 arasında optimıum aktivite gösteren alkali amilazlar rapor edilmiştir. Uç düzeyde alkalofilik bir α-amilaz *Bacillus sp.* GM8901' de bulunmuş ve optimal pH değeri 11-12 olarak belirtilmiştir.

Optimum pH *B. stearothermophilus* DONK BS-1' de olduğu gibi sıcaklığa ya da *B. stearothermophilus*' ta olduğu gibi kalsiyuma bağlı olabilir. α-Amilazlar genellikle 4-11 gibi geniş bir pH aralığında kararlıdır, ancak dar pH aralıklarında kararlılık gösteren α-amilazlar olduğu da bildirilmiştir [Gupta et.al., 2003].

Optimum sıcaklık ve kararlılık: α-Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık mikroorganizma büyümesine bağlıdır. En düşük optimum sıcaklık *F. oxysporum* amilazı için 25-30 °C ve en yüksek optimum sıcaklık ise *Pyrococcus furiosus* ve *Pyrococcus woesei* amilazları için sırasıyla 100 ve 130 °C olarak bildirilmiştir [Gupta et.al., 2003]. Sıcaklık kararlılığı gösteren α-amilazlar, kullanıldıkları süreçlerdeki yüksek sıcaklık gereksiniminin yanı sıra, genellikle uygulamalarda kontaminasyon riskinin azalması ve reaksiyon zamanının kısalması nedeniyle de tercih edilirler [Pandey et.al., 2000]. Sıcaklık kararlılığını etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar; kalsiyum, substrat ve diğer kararlı kılan faktörlerin varlığıdır [Gupta et.al., 2003].

İnhibitörler: Birçok metal katyonu, özellikle ağır metal iyonları, sülfidril grubu bileşikleri, N-bromosüksinimid, p-hidroksil merküribenzoik asit, iyodoasetat, BSA, EDTA ve EGTA α-amilazları inhibe etmektedir [Gupta et.al., 2003].

α-Amilaz kararlılığı ve kalsiyum**:** α-Amilaz en az bir Ca^{2+} iyonu içeren bir metallo enzimdir. Ca^{2+}' un α-amilaza olan ilgisi diğer iyonlardan daha güçlüdür. Enzime bağlı kalsiyum miktarı 1-10 arasında değişmektedir. Kristal yapıdaki Taka-amilaz A (TAA)'nın 10 tane Ca^{2+} iyonu içermesine karşın bunlardan sadece bir tanesi enzime sıkı bağlıdır. Diğer sistemlerde enzim kararlılığı için genellikle bir Ca^{2+} iyonu yeterlidir. Ca^{2+} amilazlardan diyaliz ya da elektrodiyalizle ayrılabilir. Kalsiyumsuz enzimler bu iyonun eklenmesiyle reaktive edilebilmektedir. α-Amilazlar Ca^{2+} varlığında sıcaklığa, bu iyonun bulunmadığı koşullara görece çok daha dayanıklıdır. Ancak buna rağmen Ca^{2+}' un enzim üzerinde hiçbir etki göstermediği durumlar da bildirilmiştir [Gupta et.al., 2003].

2.2.1.7. α-Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Aktivite ölçümü için temel olarak dört farklı tipte substrat bulunmaktadır: doğal substrata benzetilmiş çözünür olmayan, saflaştırılmış substratlar; modifiye çözünür olmayan substratlar; çözünür modifiye polisakkaritler ve çözünür

oligosakkaritler. Katalitik aktivite genellikle oluşan çözünür şekerlerin ve kromoforik aglikonların ölçümü ile belirlenir.

Çözünür veya çözünür olmayan polimerik substratlardan meydana gelen çözünür ürünlerin ölçümü sıklıkla oluşan indirgen şekerlerin tayini anlamına gelir. Bunlardan en basit ve en yaygın olarak kullanılanı 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemidir. Ayrıca,

- Nişasta- iyot renk yoğunluğunda azalış
- Dekstrinleşme aktivitesi tayini
- Sandstedt Kneen ve Blish metodu
- Indian pharmacopoeia metodu
- Nişasta süspansiyonunun viskozitesindeki azalış
- Falling number (FN) metodu
- Amilograf / Farinograf testi

α-amilaz aktivite tayininde kullanılmakta olan yöntemlerdendir [Gupta et.al., 2003].

2.2.1.8. α-Amilazların Saflaştırılması

Hücre protein kalıntılarının ve diğer kontaminasyonların kaldırıldığı basamak olan saflaştırma, enzim üretiminde anahtar basamaktır. Enzimlerin özelliklerinin belirlenmesi veya endüstriyel/biyoteknolojik süreçlerde kullanılmasından önce saflaştırılmaları için enzimlerin özelliklerine dayalı farklı saflaştırma yöntemleri geliştirilmiştir. α-amilazın ticari kullanımı genellikle saf enzim gerektirmez. Fakat gıda endüstrisi, farmasötik ve klinik sektörlerinde yüksek saflıkta α-amilaz kullanılmaktadır. Ayrıca saf haldeki enzim, yapı-fonksiyon çalışmaları ve biyokimyasal çalışmalarda da kullanılmaktadır.

Amilazların saflaştırılmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ancak birçok saflaştırma protokolü birden fazla basamak gerektirmektedir. Saflaştırma protokolünün seçimi doğal olarak amaca yönelik olmakla birlikte daha fazla saflık ve verim ayrıştırma yöntemi ve basamak sayısı ile bağlantılıdır.

α-amilazların mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılmasında genellikle klasik saflaştırma yöntemleri kullanılmaktadır. Bu doğrultuda, kültürün fermentasyon

ortamından ayrılması ve amonyum sülfat veya organik çözücüler ile çöktürülmesini takiben ham enzime kromatografi uygulanır. En çok kullanılan kromatografi teknikleri afinite, iyon değişimi ve jel filtrasyondur. Çapraz bağlı nişasta ya da nişasta türevleri bakteriyel amilazların saflaştırılmasında kullanılan afinite matris elemanlarıdır.

Klasik kromatografi yöntemlerine ek olarak, immunoafinite kromatografisi yüksek saflıkta amilazların eldesinde kullanılmaktadır [Jang et al., 1994]. Amilazların fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini ve matriks materyalinin seçiciliği ve kapasitesini anlamaya yönelik yeni ilerlemeler saflaştırma yöntemlerinin tasarımına büyük katkı sağlasa da amilazların ayrımında kullanılan yöntemler henüz tamamen başarıya ulaşmış sayılmaz.

2.2.1.9. α-Amilazların Endüstriyel Süreçlerde Kullanımı

Endüstriyel uygulamalar için seçilen enzimlerin kararlılığı sıklıkla sınırlayıcı faktördür. Bunun sebebi, biyoteknolojik süreçlerin birçoğunun yüksek sıcaklık ve uç pH gereksinimidir. Böylece, enzimlerin kararlılığının arttırılması ile ilgili sürekli bir talep vardır.

Sıcaklık, proteinlerin geliştirilmesi ve ticarileştirilmesinde göz önünde tutulması gereken tartışmasız en önemli faktördür. Genel olarak, sıcaklığın, doğrudan ya da dolaylı olarak protein agregasyonu üzerinde karmaşık bir etkisi vardır [Wang et al., 2010]. Endüstriyel süreçlerde, sıcaklık kararlılığı olan α-amilazların kullanımının avantajları, kontaminasyon riskinin azalması, difüzyon oranının artması ve dıştan soğutma maliyetindeki azalmadır. Ayrıca, geniş pH aralığında etkin α-amilazlar hem glukoz şurupları için gerekli asidik hem de deterjan endüstrisi için gerekli alkali uygulamalar için uygun olabilir [El-Fallal et al., 2012].

Bununla birlikte, yeni bir eğilim olarak orta sıcaklıkta kararlı (ITS:intermediate temperature stable) α-amilazlar [Gupta et al., 2003] ekmeğin yapışkanlığının giderilmesinde kullanılmakta, böylelikle enzimi fırıncılık endüstrisi için uygun hale getirmektedir. Ayrıca, tüketiciler arasında bulaşık ve çamaşır yıkamada düşük sıcaklıkların kullanımı yaygınlaşmıştır. Düşük ve orta dereceli sıcaklıklar ve alkali ortamda çalışabilen α-amilazlar bu endüstride tercih edilmektedir. Çok geniş

çeşitlilikte mikrobiyal α-amilaz bulunmasına rağmen, “ITS” özelliği olan az sayıda enzim rapor edilmiştir [El-Fallal et al., 2012].

Endüstriyel süreçlerde istenen diğer bir özellik ise kalsiyuma bağımlı olmamaktır. Birkaçı dışında bilinen birçok amilaz korunmuş bir Ca^{2+} bağlanma bölgesi taşır [Linden et al., 2003], [Prakash and Jaiswal, 2010]. Bu da kalsiyumu enzim aktivitesi için önemli kılar. Fruktoz şurubunun üretiminde Ca^{2+} iyonları sürecin final basamağında kullanılan glukoz izomeraz enzimini inhibe eder ve inorganik çökeltiler oluşmasına yol açabilir. Bu iyonun ortamdan uzaklaştırılması pahalı ve zaman alıcı bir süreç olduğundan yüksek sıcaklıklarda Ca^{2+} iyonuna ihtiyaç duymadan kararlı ve fonksiyonel olan α-amilazlar daha uygun olabilir [El-Fallal et al., 2012].

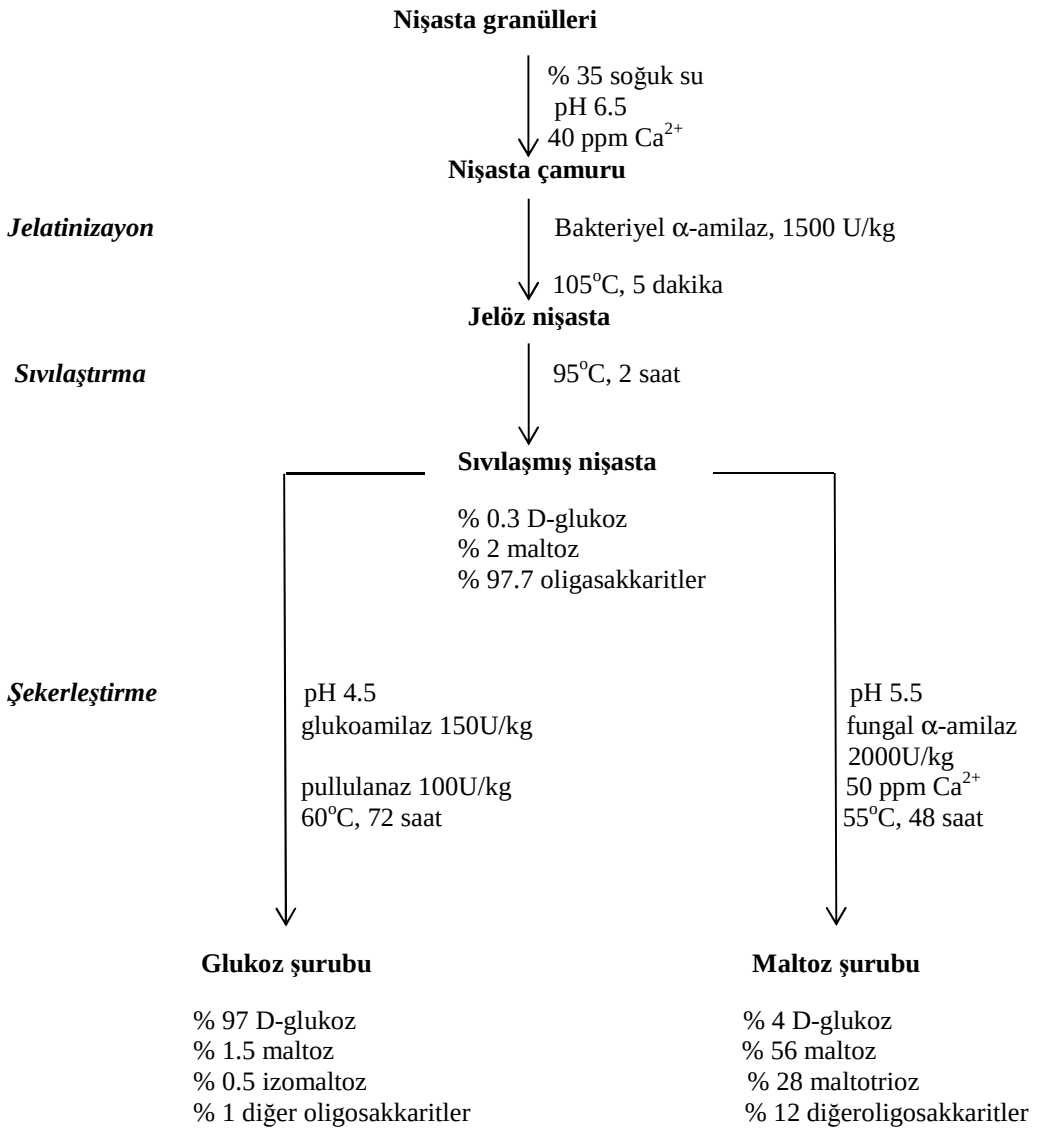
2.2.1.10. Biyoteknolojik Uygulamalar

α-Amilazlar nişastaya dayalı bütün endüstriler için en önemli hidrolitik enzimlerdir. α-Amilazın ticarileşmesi ilk olarak 1984’te sindirim bozukluğu hastaları için farmasötik olarak kullanılmasıyla başlar. Bugün amilazlar birçok endüstriyel süreçte (gıda, deterjan, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi) nişasta hidrolizi için uygulama alanı bulmaktadır. Bu bağlamda, mikrobiyal amilazlar nişasta endüstrisinde kimyasal hidrolizin yerini tamamen almıştır. Ayrıca α-amilazlar farmasötik ve kimya endüstrilerinde de kullanım alanı bulunmaktadır. Günümüzde amilazlar dünya enzim pazarındaki en büyük paya sahiptir [Gupta et al., 2003].

- Nişastadan endüstriyel glukoz ve fruktoz üretimi

Nişastanın glukoza yıkımı için asit hidroliz metodunun yerini üç veya dört enzim (ki bunların başında α-amilaz gelmektedir) kullanımı ile gerçekleştirilen enzimatik uygulama almıştır [Crabb and Shetty, 1999]. Nişastadan enzimatik yol ile glukoz şurubunun oluşumunda ilk basamak nişastanın çözünür, kısa zincirli dekstrinlere sıvılaşmasıdır. pH’sı 6 olan kuru-katı nişasta bulamacı (% 30-35) α-amilazla karıştırılır ve 95-105 ^{o}C’ta nişasta-yağ kompleksinin kaldırılması için sonra 90 dakika bekletilir. Bu aşamada önceki yıllarda *Bacillus amyloliquefaciens* α-amilazı [Demirkan et al., 2005] kullanılırken, son yıllarda yüksek sıcaklıklardaki kararlılıkları nedeniyle *Bacillus stearothermophilus* veya *Bacillus licheniformis* α-

amilazı [Bertoldo and Antranikian, 2002] tercih edilmektedir. Ancak bu α-amilazların kullanımının en önemli dezavantajı, kullanılan yüksek sıcaklıklarda pH 5.9'un altında bu enzimlerin aktif olmamalarıdır. Bu nedenle nişasta çamurunun pH'sı 4.5'ten 6'ya yükseltilir. Ayrıca kullanılan enzimlerin Ca^{2+} bağımlı olmasından dolayı ortama bu iyon eklenir. Bir sonraki basamak nişasta hidrolizat şurubunun yüksek konsantrasyonlu (%95'inden fazlası glukoz) glukoz şurubuna şekerleşmesidir. Bu işlem nişastayı dıştan içe doğru parçalayan bir enzim olan glukoamilaz kullanılarak gerçekleştirilir. Son basamakta ise glukoz şurubu, glukoz izomeraz enzimi kullanılarak fruktoz şurubuna dönüştürülür. Nişastanın enzimatik yol ile yıkım süreci Şekil 2.6'da [Chaplin and Bucke, 1990] özetlenmektedir.



Şekil 2.6: Nişasta yıkım süreçlerinde enzimlerin kullanımı.

- Fırıncılık

Fırıncılık endüstrisinde α-amilazlar yüzyıllardır geniş çeşitlilikte yüksek kalitede ürün elde edilmesi için kullanılmaktadır. Son yıllarda, malt ve mikrobiyal kökenli enzimler oldukça fazla kullanılmaktadır. Bu enzimler ekmek ve simitlerde bu ürünleri daha fazla kabartmak, daha iyi renk eldesi ve daha fazla yumuşaklık için kullanılır. Bugün, ekmek endüstrisinde birçok enzim preparasyonu (proteazlar, lipazlar, ksilanazlar, pullulanazlar, pentosanazlar, selülazlar, gulukoz oksidazlar, lipoksigenazlar vb.) çeşitli amaçlar için kullanılmakla birlikte hiçbirisi α-amilazların yerini tutamamaktadır. Bugüne dek, pastacılıkta kullanılan α-amilazlar arpa maltından elde edilen tahıl enzimi ile bakteri ve funguslardan elde edilen mikrobiyal enzimlerdir. Fungal α-amilazlar 1955'ten itibaren ABD'de ve 1963' ten bu yana İngiltere'de güvenli kabul edildikten sonra ekmek katkı maddesi olarak kullanılmalarına izin verilmiştir. Şimdilerde ise bütün dünyada farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Yeni endüstriyel α-amilaz uygulamalarından biri, ürünlerin bayatlama sürelerinin geciktirilmesi, bir diğer deyişle bu ürünlerin raf ömrünün arttırılmasıdır. Ekmeğin bayatlamasını önlemek ve ürünlerin yapısını geliştirmek için geleneksel olarak çeşitli maddeler eklenmektedir. Bunlar, küçük şekerler, enzim/enzim kombinasyonları, süt tozu, emülsifiye edici maddeler, monogliseritler/digliseritler, şeker esterleri, lektin gibi kimyasal maddeler olabilmektedir. Yeni eğilim ise hamur geliştirilmesinde bayatlamayı önlemek için α-amilaz, maltojenik amilaz, β-amilaz, amiloglukozidazlar gibi enzimlerin kullanılmasıdır. Ayrıca pullulanaz ve α-amilaz kombinasyonu da bayatlamaya karşı etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, gereğinden fazla kullanılan α-amilaz ekmekte istenmeyen bir yapışkanlığa neden olabilir. Bundan dolayı ara sıcaklıklarda kararlı α-amilazların kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu enzimler nişastanın jelatinizasyonundan sonra aktiftir ve pişirme süreci tamamlanmadan çok önce aktivitelerini kaybederler. Birçok çeşit mikrobiyal α-amilaz bilinmesine rağmen, bu özelliğe sahip olan α-amilaz sadece birkaç mikroorganizmada rapor edilmiştir [Gupta et.al., 2003].

- Siklodekstrin oluşumu

Siklodekstrinler 6-8 glukoz rezidüsünün α,1-4 bağı ile bağlanması sonucunda oluşan halkasal oligosakkaritlerdir. Halkasal yapıdaki glukozlar, iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik olacak şekilde yerleşirler. Siklodekstrinler bu özelliklerinden

dolayı çeşitli hidrofobik moleküller ile inklüzyon cisimcikleri oluşturabilirler. İnklüzyon komplekslerinin oluşumu, bu moleküllerin ışık veya oksijene duyarlılık, çözünürlük, tat ve kokularında iyileşmeler gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesine yol açar. Bu değişen özellikler siklodekstrinlerin analitik kimya, ziraat, farmasötik, gıda ve kozmetik alanlarında çeşitli uygulamalarda kullanımına olanak sağlar. Siklodekstrinlerin endüstriyel üretimi için nişasta öncelikle sıcaklık kararlılığı olan α-amilazla sıvılaştırılır, sonrasında halkasal yapı siklodekstrin glikozil transferazlar ile meydana getirilir [Riisgaard, 1990].

- Tekstil endüstrisi

Kumaşların modern üretim süreçlerinde, dokuma sırasında dokunun zarar görmemesi gerekir. İplik bu süreçlerde kopmadan korunmalıdır. Bu yüzden ipliklerin üzerine kaldırılabilir bir tabaka uygulanır. Bu özellikte tabakalar oluşturmak için kullanılan materyaller oldukça farklıdır. Nişasta ucuz olması ve kolay bulunabilmesi nedeniyle bu iş için çok uygun bir maddedir ve nişastanın kumaştan kaldırılması sadece bu tabakaya etki eden ve lifleri (iplikleri) etkilemeyen α-amilazlar uygulanılarak başarılır. Enzim nişastayı suda çözünebilen ve yıkamayla giderilebilen dekstrinlere parçalar [Gupta et al., 2003].

- Kağıt endüstrisi

Kumaşlarda olduğu gibi kağıt da süreç boyunca mekanik zararlardan korunmalıdır. Bu, kağıdın son halinin kalitesini, sertliğini, dayanıklılığını ve silinebilirliğini de iyileştirir. Bu tür uygulamalar için nişasta uygun bir maddedir. Nişasta kağıda presleme aşamasında uygulanır ve kağıt ruloları aradaki nişasta sayesinde kolayca yuvarlanır. Bu süreç 45-60 °C sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Bu aşamada tekrar edilebilir sonuç alınabilmesi için nişasta akışkanlığı sabit olmalıdır. Diğer bir deyişle kullanılan nişastanın akışkanlığı elde edilen kağıt kalitesini belirleyen başlıca etkenlerden birisidir. Doğal nişastanın viskozitesi kağıt biçimlendirmek için çok yüksektir. Bu nedenle, kullanılacak nişasta, α-amilaz ile kısmen parçalanarak uygun akışkanlığa ayarlanmaktadır. Koşullar kullanılan nişasta ve α-amilazın kaynağına bağlıdır. Amizyme® (PMP fermantation Products, Peoria, USA), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Denmark) ve α-amylase G 9995® (Enzyme Biosystems, USA) kağıt endüstrisinde kullanılan ticari amilazlardır [Gupta et al., 2003].

• Deterjan endüstrisi

Enzimler günümüzde kullanılan deterjan katkı maddeleri arasında önemli yer tutmaktadır. Enzim içeren deterjanların en büyük avantajı, enzimsiz deterjanlarla kıyaslandığında daha ılımlı koşullarda kullanılabilmeleridir. İlk üretilen bulaşık deterjanları çok sertti ve hasar yaratıyordu. Bu durum deterjan endüstrisinin daha yumuşak ve çok daha etkili materyaller aramasına yol açmıştır. α-Amilazlar 1975 yılından bu yana çamaşır deterjanlarında kullanılmaktadır. Günümüzde, sıvı bulaşık deterjanlarının % 90'ı α-amilaz içermektedir ve bulaşık makineleri için α-amilaz kullanımı giderek artmaktadır. Deterjanlarda α-amilaz kullanımını sınırlayan etkenlerden birisi enzimin kalsiyuma duyarlı olması ve düşük kalsiyumlu bir ortamda kararlılığının şiddetle azalmasıdır. Ek olarak bir çok yaban tipi α-amilaz deterjanların içeriğinde bulunan oksidanlara duyarlıdır. Ev tipi deterjanlarda oksidanlara karşı kararlılık proteaz gibi diğer enzimler kullanılarak başarılabilmektedir. İki büyük deterjan üreticisi firma olan Novozymes ve Genencore amilazların kararlılığını arttırmak üzere protein mühendisliği teknikleri kullanmışlardır [Gupta et al., 2003].

• Etanol üretimi

Büyük ölçekli süreçler için nişastalı materyalin etanola biyodönüşümü çok faydalıdır. Çünkü etanol biyoyakıt olarak ve çeşitli kimyasallar için başlangıç materyali olarak kullanılabilir. Nişastalı biyokütleden etanolün oluşumu üç basamaklı bir süreçtir: nişastanın yoğunluğunun azaltılması için α-amilaz gibi bir endoamilazla sıvılaştırılması; düşük moleküllü sıvılaştırma basamağı ürünlerinin enzimatik yolla şekerleştirilmesi; glukoz oluşumu ve glukozun fermentasyonu.

Etanol üretiminde geliştirilmiş düşük maliyetli fermentasyon sistemleri olmasına rağmen, bu süreçlerde kullanmak üzere nişasta içerikli maddelerin hidrolizinde kullanılmak üzere hala büyük miktarlarda amilolitik enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.1.11. *Bacillus* Cinsinin Biyoteknolojideki Yeri

Bacillus cinsi üyeleri başta hidrolitik enzimler olmak üzere birçok enzimi, bunun yanı sıra antibiyotik, yararlı biyokimyasallar ve insektisitleri üretmelerinden dolayı endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Bacillus*

türlerinin fermentasyonu ile elde edilen ve yılda yaklaşık 100 000 ton tüketilen bir Japon yiyeceği olan "Natto" bu cinsin gıda sektöründeki kullanımının bir diğer özgün şeklidir [Harwood, 1992].

Bacillus türleri, kolay üreyebilmeleri, bulundukları kültür ortamına enzim salgılayabilmeleri, belli türler bir yana insan ve hayvanlar için patojenitelerinin bulunmaması ve birçoğunun basit besin gereksinimleri nedeniyle endüstriyel süreçler için uygun enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır [Harwood, 1992].

Gıda, içecek ve deterjan endüstrilerindeki yaygın kullanımı ve düşük düzeydeki patojenitesi nedeniyle *B. subtilis* FDA (US Food and Drug Administation) tarafından güvenli (GRAS: Generally Regarded As Safe) kabul edilen bir mikroorganizmadır [Harwood, 1992].

Bacillus soyları büyüme ortamına büyük miktarlarda protein salgılamaları, kolay büyütülebilmeleri ve kanıtlanmış güvenilirliklerinden dolayı heterolog protein üretiminde kullanılmaktadırlar. *Bacillus* türlerince üretilen başlıca endüstriyel enzimler; α-amilaz, β-amilaz, β-glukanaz, alkalen fosfataz, alkalen proteaz, siklodekstrin glukanotransferaz, glukoz izomeraz, pullulanaz, lipaz, β-laktamaz ve nötral proteazdır [Harwood, 1992].

Endüstriyel uygulamalarda sıcaklık kararlılığının öneminin anlaşılmasından bu yana termofilik mikroorganizmalar, termofilik amilazların üretimi için özel ilgi odağı olmuştur [Pandey et.al., 2000]. Yüksek sıcaklıklar gerektiren endüstriyel süreçlerde özellikle sıcaksever *Bacillus* soyları tercih edilmektedir [Harwood, 1992].*Bacillus* türlerinin hemen hepsi amilaz üretmekle beraber, *B. azotoformans*, *B. badius*, *B. fastidiosus*, *B. insolitus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentimorbus*, *B. marinus*, *B. pasteurii*, *B. popilliae*, *B. pumilus*, *B. schlegelli* ve *B. sphaericus*'un nişasta hidrolizi yapmadığı bilinmektedir. Endüstride en çok kullanılan amilaz üreticileri ise *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*'tir [Gupta *et al.*, 2003].

3.KLONLAMA

PCR türevli DNA fragmanlarının başarılı bir şekilde klonlanması, çoğaltılmış DNA'ların sonraki analizleri için anahtar basamaktır. Geliştirilen birçok klonlama yönteminin yanı sıra çeşitli ticari klonlama kitleri de bulunmaktadır. Bu yöntemler ligasyon-bağımlı klonlama ve ligasyon-bağımsız klonlama olarak iki gruba ayrılır. Ligasyon bağımlı klonlama daha yaygın kullanılmaktadır [Guo and Bi, 2002].

PCR ürünlerinin ligasyon-bağımlı klonlanma yöntemleri DNA uçlarına göre kendi içinde 3 tipe ayrılır: küt uçlu klonlama, yapışkan uçların klonlanması ve T-A klonlama.

Uygun ligasyon bağımlı klonlama yönteminin seçiminde çeşitli faktörler göz önünde tutulmalıdır. Bunlardan birincisi, klonlama amacıdır. Örneğin seçilmiş klonlar protein ekspresyonunda kullanılacaksa bir ekspresyon vektöründe yönlü klonlama istenebilir. İkincisi, PCR ürünleri ile örtüşen uygun bir vektörün seçimi veya hazırlanmasıdır. Farklı DNA polimerazlar küt uçlu ya da yapışkan uçlu klonlama vektörleriyle uyumlu farklı DNA uçları olan PCR ürünleri oluştururlar. Üçüncüsü, genelde kullanılan plazmit vektörlerin klonlama kapasitesinin dışında kalan çok uzun PCR ürünlerinin (10 kb'den fazla) klonlanmasında kozmit ya da DNA vektörleri kullanımıdır. "Insert" içeren klonların seçimini kolaylaştırmak ve klonlama etkinliğini geliştirmek için pozitif klonların etkin bir tarama sistemi ile taranması da oldukça önemlidir [Guo and Bi, 2002], [Kahn and House, 2004].

Yapışkan uçlu klonlama, PCR ürünlerinin klonlanmasında birçok laboratuvarda rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde PCR primerlerinin 5' uçlarına restriksiyon bölgeleri yerleştirilir. Çoğaltma reaksiyonu devam ederken primerler PCR ürünlerinin içine entegre olur. İlgili restriksiyon enzimleriyle kesim sonrası PCR ürünlerinin iki ucunda yapışkan uçlar oluşur. Kesilmiş PCR ürünleri ve vektörler çok yüksek etkinlikte birleştirilebilir ve oldukça etkin yapışkan uçlu klonlama gerçekleştirilebilir. İki PCR primerindeki restriksiyon enzimleri aynı ya da farklı olabilir. Farklı oldukları koşullarda PCR ürünleri vektörlere yalnızca tek bir yönde girebilir [Guo and Bi, 2002].

Yapışkan uçlu klonlamada bazı problemler oluşabilmektedir. Birçok restriksiyon endonükleazı özellikle kesim bölgeleri çift iplikli PCR ürünlerinin 5' uçlarının yakınında olduğunda DNA uçlarına stabil olmayan bağlanmadan dolayı

etkili kesim yapamazlar. Bunun bir çözümü restriksiyon bölgesinin 5'ucunun önüne ekstra nükleotit eklenmesidir, ancak bu, bazı durumlarda primerlerin kalıba tutunma etkinliğini de düşürebilmektedir. Yapışkan uçlu klonlama için diğer bir problem, istenmeyen iç kesim bölgelerinin bulunabilmesidir. Bu problemi öngörmek zordur, çünkü genellikle "insert" dizileri bilinmez. Bir diğer problem ise primer dimerlerinin oluşumudur. Restriksiyon tanıma dizileri genellikle ters tekrarlı (palindromik) dizilerdir ki bu da primer dimerlerinin oluşumu ve sonuçta amplifikasyon etkinliğinin düşmesine yol açar [Guo and Bi, 2002].

Birçok DNA polimeraz gibi *Taq* DNA polimeraz da küt uçlu DNA fragmanlarının 3' uçlarına ilave nükleotitler ekleyebilir. *Taq* polimeraz tercihen çift iplikli DNA'nın küt uçlarına bu terminal transferaz aktivitesi sayesinde tek bir 3'-A ekler. Böylelikle *Taq* polimerazla çoğaltılmış birçok PCR ürünü iki ucunda tek bir 3'A çıkıntısına sahiptir. İki ucunda 3'-A çıkıntıları olan PCR ürünlerinin doğrudan klonlanmasında uçlarında 3'-T çıkıntısı olan lineer bir T-vektörü kullanılabilir. Vektördeki 3'-T ile PCR ürünündeki 3'-A çıkıntıları arasındaki tamamlayıcılık *Taq* ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin T-vektörüne doğrudan ligasyonunu sağlar ve strateji genellikle "TA klonlama" olarak adlandırılır. TA klonlama stratejisi hem basit hem de küt uçlu klonlamadan daha etkindir [Zhou and Gomez-Sanchez, 2000].

Geleneksel ligasyon-bağımlı yöntemlerin yanı sıra enzimsiz veya ligazsız klonlama olarak da adlandırılan ligasyona bağımlı olmayan klonlama yöntemleri de kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu yöntemlerde de çok sayıda primer gereksinimi, kullanılacak konakçının sınırlı sayıda olabilmesi, kullanılan vektör ve "insert"in PCR ile çoğaltılabilmesi gibi birtakım sınırlandırmalar bulunmaktadır [Guo and Bi, 2002], [Tillett and Neilan, 1999].

4. GEREÇ

4.1. Kullanılan Sarf Malzemesi

Tablo 4.1: Kullanılan sarf malzemeleri.

Kullanılan Malzeme	Üretici Firma
2-propanol	RIEDEL 24137
3,5-dinitro salisilik asit	SIGMA D0550
500 bp DNA belirteci	FERMENTAS
Agar	BD 214010
Agaroz	SİGMA A-6013
Akrilamit	SIGMA A 8099
Alfa-siklodekstrin	APPLICHEM A2146
Amonyum persülfat (APS)	BIORAD 161-0700
Amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$	MERCK 1.01216
Ampisilin	ROCHE 10835269 001
Aquazide II	CALBIOCHEM
Asetik asit	RIEDEL 27225
Aseton	MERCK 100013
$BaCl_2$	FLUKA
$BaCl_2$	SİGMA-ALDRİCH 217565
Beta-siklodekstrin	APPLICHEM A2147
Bisakrilamit	BIORAD 161-0201
Bradford protein assay dye	BIORAD 500-0006
Brillant blue R	SIGMA B 7920
Bromofenol blue	SIGMA B-6131
BSA	SİGMA-ALDRİCH A7906
$CaCl_2$	SIGMA C-3306
$CoCl_2$	SIGMA C 2644
CTAB (setil trimetil amonyum bromid)	SIGMA H 6269
$CuCl_2$	SIGMA C-6641

Tablo 4.1: devamı.

Diyaliz membranı	ROTH 0653.1
DMSO (Dimetil sülfoksit)	SIGMA D 5879
dNTP (PCR grade nucleotide mix)	ROCHE 04 728 874 001
*Eco*RI	ROCHE 11 175 084 001
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	SIGMA E 5134
Etanol	J. T. BAKER 8228
Etidyum bromür	SİGMA E-7637
$FeCl_2$	FLUKA 44939
$FeCl_3$	MERCK
$FeSO_4$	SIGMA F-7002
Filtre kağıdı	3 MM Whatman
Gliserol	RIEDEL 15524
Glisin	SIGMA G 7126
Glukoz	SIGMA G8270
HCl	MERCK 1.00314
Hekzamin kobalt klorit	SIGMA H7891
*Hind*III	ROCHE 10 656 321 001
HiPrep Q FF 16/10	GE Healthcare
IPTG (İzopropil-β-D-tiogalaktozit)	Roche 724815
İzoamil alkol	MERCK 1.00978.1000
KCI	RIEDEL 12636
KH_2PO_4	MERCK 104877
Kpn I	TAKARA 1068
$LiCl_2$	ALDRİCH 213233
Lizozim	MERCK 105281
Maltoz	SIGMA 2250
Maya özütü	MERCK 1.03753
$MgCl_2$	MERCK 105832
$MgSO_4$	SIGMA M2773
$MnCl_2$	MERCK 105917

Tablo 4.1: devamı.

Na_2HPO_4	MERCK 106586
NaAc	MERCK 106268
NaCl	MERCK 1.06400.1000
NaH_2PO_4	RIEDEL 04269
NaOH	MERCK 1.06462.1000
NH_4Ac	RİEDEL
NH_4Cl	SIGMA A9434
$NiCl_2$	SIGMA N 5756
Nutrient broth	DIFCO 234000
Oligonükleotitler	IDT
PEG8000	SİGMA P2139
Pepton	MERCK 107214
Pfu polimeraz	STRATAGENE 600670
PMSF (Fenilmetilsülfonilflorid)	SIGMA 7626
Potasyum asetat	SIGMA P3542
Potasyum hidroksit	RIEDEL 6005
Protein belirteci (PAGE-Ruler)	FERMENTAS SM0671
Protein standardı	SIGMA SDS-6H
*Pst*I	ROCHE 10621633001
RNase	ROCHE 11 119 915 001
SDS	SIGMA 5750
Sefakril S100HR	SIGMA-ALDRICH
Sodyum deoksikolat	SİGMA
Sodyum potasyum tartarat	SIGMA 2377
Soluble starch	SIGMA S2004
Sukroz	SİGMA S0389
T4 DNA ligaz	ROCHE 10 716 359 001
Taq DNA polimeraz	ROCHE 1 418 432
TEMED	SIGMA T 7024
Tris baz	SIGMA T-1503
Triton X-100	MERCK

Tablo 4.1: devamı.

Tween 20	SIGMA P 1379
Tween 80	SIGMA P 8074
$ZnCl_2$	Anonim
$ZnSO_4$	Anonim
β-merkaptoetanol	SIGMA M-6250
λ DNA	MBI-FERMENTAS

4.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 4.2. Kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	Üretici Firma
+4 ^{o}C soğutucu	ARİSTON NOFROST
-20 ^{o}C dondurucu	ARİSTON NOFROST
-80 ^{o}C dondurucu	HERAEUS INSTRUMENT
Agaroz jel elektroforez sistemi	BIOMETRA AgaGel Mini
Akta saflaştırma sistemi	GE, Healthcare
Buz makinesi	BAR LINE BF 85
Çalkalamalı su banyosu	JULABO-SW 21
Çalkalamalı su banyosu	GFL 1083
Çalkalamalı yer inkübatörü	CERTOMAT-BS-T
Etüv	EDMUNT BÜHLER-TH 15
Hassas terazi	SARTORİUS-BL 210S
İnkübatör	EDMUND BÜHLER KS-15
Jel görüntüleme sistemi	VİLBER LOURMAT
Jel görüntüleme yazıcısı	SONY
Liyofilizatör	JOUAN RC-10.10
Liyofilizatör soğutucu motoru	JOUAN RCT 90
Liyofilizatör vakum motoru	ALCATEL- Pascal 2005 C1
Manyetik karıştırıcı	HEİDOLPH MR3001
Masa üstü soğutmalı santrifüj	HERAEUS Sepatech, Biofuge 15R

Tablo 4.2. devamı.

Masa üstü soğutmalı santrifüj	BECKMAN COULTER, Allegra 25R
Mikro plaka okuyucu	BMG Labtech, Fluostar Omega
Mikrosantrifüj	BECKMAN Microfuge 18
Mikrodalga fırın	BEKO-1550
Mikropipet 2 µl	GILSON
Mikropipet 1000 µl	GILSON
Mikropipet 200 µl	GILSON
Mikropipet 5000 µl	GILSON
Orbitral karıştırıcı	BIOMETRA WT12
Otoklav	HIRAYAMA-HICLAVE HVE-50
Otoklav	VARIOKLAV-Dampfsterilizator 300
Otomatik dizi analizi sistemi	BECKMAN COULTER CEQ 8000
pH metre	İNOLAB pH LEVEL 1
Protein elektroforez sistemi	BIORAD Mini Protean II
Spektrofotometre	BIORAD-Smartspec 3000
Steril kabin	HERAEUS-Herasafe-HS 12
Pastör fırını	BİNDER-ED115
Soğutmalı su banyosu	VWR 1160S
Sonikatör	BRANSON Digital Sonifier 250
Tek kullanımlık steril filtre (0.45 µm)	SCHLEİCHER&SCHUELL10462200
Tek kullanımlık steril filtre (0.22 µm)	SARTORİOUS STEDİM 17597
Terazi	SARTORİUS-BL 3100
Termal döngü cihazı	BİOMETRA T3
U.V transillüminatör	VILBER LOURMAT V026347
Vorteks	VORTEX GENIE-2

5. YÖNTEM

5.1. Tez Kapsamında Kullanılan Biyolojik Materyaller

Tez kapsamında, Enzim Moleküler Genetiği ve Kızılay Pendik Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' nın ortak çalışmasıyla yerel ekosistemlerden izole edilerek, morfolojik ve fizyolojik özellikleri "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"'ye [Sneath, 1986] göre tanımlanmış, enzim üretkenlikleri test edilmiş 11 α-amilaz üreticisi *Bacillus* soyu kullanıldı. Önceki çalışmalarda bu soyların biyokimyasal karakterizasyonunun yanı sıra API50CHB/E, API20E kitleri ile VITEK sistemi kullanılarak tanılama çalışmaları yapılmış, bu soyların moleküler temelli yöntemlerle tiplendirilmesi ile ilgili bir TÜBİTAK projesi (105T-188) 2009 yılında tamamlanmıştır (İşsever Öztürk, 2008). Kullanılan soylara ve izole edildikleri kaynakların özelliklerine ait bilgiler Tablo 5.1'de yer almaktadır.

Tablo 5.1: Kullanılan yerel izolatlar, izole edildiği kaynak özellikleri ve tiplendirme çalışmaları sonucunda önerilen tür adları.

İzolat Kodu	İzole Edildiği Kaynağının Yeri ve Özellikleri				ÖNERİLEN TÜR ADI
	Örnek Kaynağı	Tipi	pH	Sıcaklık (° C)	
A3	Gönen Dağ Ilıcası-1	kaplıca suyu	7	43	*B. subtilis*
A4	Gönen Dağ Ilıcası-1	kaplıca suyu	7	43	*B. cereus*
A7	Afyon Heybeli Kaplıcası	toprak	9	48	*B. subtilis*
A18	Edremit Zeytin İşletmasi	pirina	?	?	*B. subtilis*
A23	Bursa Karamustafa Kaplıcası	kaplıca suyu	7, 2	63	*B. subtilis*
A26	Manyas Serpin Kaplıcası	kaplıca suyu	7	53	*B. licheniformis/?*
A28	Afyon Heybeli Kaplıcası	kaplıca suyu	8	53	*B. subtilis/ B. amyloliquefaciens*
P17	Afyon Heybeli Kaplıcası	kaplıca suyu	8	58	*B. cereus*
P19	Gönen Yıldız Otel G-7	kaplıca suyu	7,2	58	*B. subtilis*
P21	Afyon Ömerli Kaplıcası	toprak	?	80	*B. licheniformis*
P22	Gönen Dağ Ilıcası	toprak	?	35	*B. megaterium/?*

5.2. Yerel *Bacillus* Soylarının Genomik DNA İzolasyonu

Yerel *Bacillus* soylarının genomik DNA izolasyonu "Promega Wizard Genomik DNA İzolasyon Kiti" kullanılarak yapıldı.

- Promega Wizard Genomik DNA İzolasyon Kiti Protokolü

2 ml LB besi yerinin yerel *Bacillus* izolatlarının -20 °C stokları ile % 1 oranında aşılanması ve gece boyu 37 °C'ta, 175 rpm'de inkübe edilmesi ile elde edilen kültürlerin 1 ml'si ependorf tüpüne alındı ve aşağıda verilen kit protokolü uygulandı.

- Kültür 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvılar uzaklaştırıldı ve çökelekler 480 µl 50 mM EDTA, pH 8.0 içinde çözülüp, üzerlerine 120 µl lizozim (10 mg/ml) eklenerek 37 °C'ta 30-60 dakika süreyle inkübe edildi.
- 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj sonrası üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra 600 µl "nuclei lysis" çözeltisi eklendi, mikropipet ile nazikçe karıştırıldı ve -80 °C'ta 5 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına soğutulup, 3 µl RNase çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve 37 °C'ta 15-60 dakika inkübe edilip, oda sıcaklığına soğutuldu.
- 200 µl "protein çöktürme" çözeltisi eklenerek vortekslendikten sonra 5 dakika buzda bekletildi ve 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip üst sıvı, oda sıcaklığında, 600 µl izopropanol içeren yeni bir eppendorf tüpüne alınarak karıştırıldı.
- 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek, üst sıvı uzaklaştırıldı ve 600 µl % 70 etanol (oda sıcaklığında) eklenerek karıştırıldıktan sonra 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırılarak liyofilizatörde 10-15 dakika kurutuldu.
- Elde edilen genomik DNA çökeleği 100 µl "sulandırma" çözeltisi içinde 65 °C'ta 1 saat ya da +4 °C'ta gece boyu çözünmeye bırakıldı.

5.3. Yerel Soyların Alfa Amilaz Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

Bu bölümde yer alan çalışmalarda Ausubel et al. (2001) ve Sambrook et al., (1989) tarafından uygulanan temel moleküler biyolojik yöntemler kullanılmıştır.

Yerel *Bacillus* soylarının α-amilaz genlerinin PCR ile çoğaltılması amacıyla, veri tabanlarında bulunan ilgili α-amilaz gen dizilimlerinden yararlanılarak ileri ve geri primerler oluşturuldu ve sentez ettirildi. Kullanılan primerlerin dizisi ve restriksiyon endonükleazı kesim bölgeleri Tablo 5.2'de verildiği gibidir.

Tablo 5.2: Kullanılan primerler.

Primer Adı	Soy	Dizi
12AF	*B. subtilis*	5'- TAC GA↓A GCT TGA TGT TTG CAA AAC GAT TCA AAA CC -3' *Hind*III
13AG	*B. subtilis*	5'- TAC GGG TAC↓ CTT ATC AAT GRG GAA GAG AAC CGC -3' *Kpn*I
14AF	*B. megaterium*	5'- TAC GA↓A GCT TGA TGA GGG GAT CTC TCA GGA TAA AG -3' *Hind*III
15AG	*B. megaterium*	5'- TAC GGG TAC↓ CCT ACC TCT GGA CAT ATA TAG AAA CTG -3' *Kpn*I
16AF	*B. megaterium*	5'- TAC GA↓A GCT TGA TGA AAG GGA AAA AAT GGA CAG C -3' *Hind*III
17AG	*B. megaterium*	5'- TAC GG↓A ATT CTT ATT TTA TTA AAA CCG TCC GAT TCG -3' *Eco*RI
18AF	*B. cereus*	5'- TAC GCT GCA ↓GGA TGC TTA AAG ACG CCA TCT ATC ATA GG -3' *Pst*I
19AG	*B. cereus*	5'- TAC GGG TAC↓ CTT ACC ATT TTA ATA TGG AGA ATC CAT ATG G-3' *Kpn*I
1FA	*B. licheniformis*	5'- TAC GTA↓ AGC TTG ATG AAA CAA CAA AAA CGC CTT -3' *Hind*III
2GA	*B. licheniformis*	5'- TAC GTG↓ AAT TCA AAG AAA TTT ATA AGA CGG GCA -3' *Eco*RI

PCR reaksiyonları Tablo 5.3'de verilen koşul ve programda yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jelde kontrol edildi.

Tablo 5.3: Alfa amilaz genleri için PCR koşulları ve programı.

PCR koşulları	PCR programı
• 200 ng kalıp DNA • 80 ng primer • 1,5; 3 ve 4 mM $MgCl_2$ • 200 µM dNTP • 1X *Taq* buffer • 0,9 U *Taq* DNA	94 °C 5' 94 °C 30'' } 30x 64°C 30'' } 30x 72 °C 120" } 30x 72 °C 10'

5.4. Çoğaltılan genlerin restriksiyon endonükleazları ile kontrolü

Elde edilen jel profiline bakılarak seçilen PCR ürünleri, çalışmanın bir sonraki basamağı olan klonlamada kullanılacak restriksiyon enzimleri ile gen içi enzim kesim bölgesi bulunup bulunmadığının kontrolü için ilgili restriksiyon endonükleazları ile kesime alındı.

- Kesim Protokolü
  - 1 µg PCR ürünü
  - 3 U/ µg DNA restriksiyon endonükleaz
  - 1X tampon

37 °C' ta 1 saat sürdürülen kesim sonrası örnekler, kesilmemiş örnekleri ile birlikte % 2 agaroz jelde kontrol edildi.

5.5. Genomdan PCR ile Doğrudan Klonlama

Plazmit üzerinde bulunan genlerin ligaz olmayan, tek bir PCR basamağı ile pUC19 vektörü [Yanisch-Perron et.al., 1985] üzerine klonlanması; An ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışma modifiye edilerek gerçekleştirildi. Buna göre, 5'- uçlarında pUC19 vektörünün çoklu klonlama bölgesine yakın bir bölgeye tutunabilecek kuyruklar olan ileri ve geri primerler tasarlanarak sentez ettirildi. Klonlamanın gerçekleştirilebilmesi için, bu primerlerin kullanıldığı ve Tablo 5.4' te verilen koşul ve programlar ile α-amilaz genleri uçlarında pUC19 vektörüne tutunma bölgeleri olacak şekilde *Bacillus* genomlarından PCR ile çoğaltıldı.

- Klonlamada kullanılan oligonükleotitler
  - F1-F2: *B. subtilis* alfa amilazı için
  - F3-F4: *B. cereus* alfa amilazı için kullanıldı.

- **F1: 5' - GAC CAT GAT TAC GCC AAG CTT GAT GTT TGC AAA ACG ATT CAA AAC-3'**
  pUC19'a tutunma bölgesi *Hind*III *B. subtilis* amilazı ileri primer

- **F2: 5' – CCA GTG AAT TCG AGC TCG GTA CCT TAT CAA TGR GGA AGA GAA CCG C-3'**
  pUC19'a tutunma bölgesi *Kpn*I *B. subtilis* amilazı geri primer

- **F3: 5'- GCC AAG CTT GCA TGC CTG CAG GAT GCT TAA AGA CGC CAT CTA TC-3'**
  pUC19'a tutunma bölgesi *Pst*I *B. cereus* amilazı ileri primer

- **F4: 5' – CAG TGA ATT CGA GCT C GG TAC C TT ACC ATT TTA ATA TGG AGA ATC-3'**
  pUC19'a tutunma bölgesi *Kpn*I *B. cereus* geri primer

Tablo 5.4: Genomdan fragman çoğaltmak için yapılan PCR koşulları ve programı.

PCR koşulları	PCR Programı
• 80 ng primer • 200 ng kalıp DNA • 0,2 mM dNTP • 1,5-3 mM $MgCl_2$ • 0,9 U Taq DNA polimeraz • 1X PCR tamponu	94 ^oC 5' 94 ^oC 60'' 55 ^oC 60'' (F1-F2 primer çifti için) } 4X 53^oC 60"(F3-F4 primer çifti için) 72 ^oC 120'' 94 ^oC 30'' 64^oC 30'' } 30X 72 ^oC 120'' 72 ^oC 10'

Elde edilen PCR ürünleri % 1 agaroz jelde kontrol edildi. Paralel olarak, klonlama vektörü olarak kullanılan pUC19, F1 ve F2 primerleri ile çoğaltılan α-amilaz genleri için *Hind*III-*Kpn*I, F3 ve F4 primerleri ile çoğaltılan α-amilaz genleri için ise *Pst*I-*Kpn*I restriksiyon endonükleazları ile lineer hale getirildi ve PCR ürünleri ile birlikte % 1 agaroz jelden izole edilerek klonlama PCR'si için hazır hale getirildi. Klonlama PCR'si Tablo 5.5'te verilen koşul ve programda uygulandı. Elde edilen PCR ürünü doğrudan *E. coli* JM109 kompetan hücrelerine TSS yöntemi ile transforme edildi. Transfromasyon sonucu elde edilen kolonilerde α-amilaz geninin varlığı, STET (Bölüm 5.7.1) yöntemi ile plazmit izolasyonu sonucu elde edilen

plazmitlerin ilgili restriksiyon endonükleazlar ile kesim sonrasında doğrulandı. Ayrıca seçilen klonların α-amilaz gen dizilimleri dizi analizi ile belirlendi.

Tablo 5.5: Klonlama PCR'sinde kullanılan koşul ve program.

Klonlama PCR koşulları	Klonlama PCR Programı
• 250 ng vektör (ilgili enzim çiftleri ile kesilmiş pUC19) • Molar düzeyde vektörün 5 katı kadar fragman • 200 µM dNTP • 1X Taq buffer • 2,5 U *Taq* DNA-*Pfu* polimeraz (1:1)	94 ^{o}C 3' 94 ^{o}C 30'' 55 ^{o}C 30'' 72 ^{o}C 300" } 30x + 1 U *Taq* DNA pol. 72 ^{o}C 10'

- Restriksiyon enzimleri ile vektör için kesim protokolü
  - 10 µg pUC19
  - 4U/ µgDNA restriksiyon endonükleazı
  - 1X tampon
  - Kesim süresi: Her enzim için 37 ^{o}C'ta 120'

Kesim sonrası sodyum asetat-etanol çöktürmesi uygulanan örnekler, hız-vakum santrifüjünde etanolün uzaklaştırılmasının ardından uygun hacimlerde çözülerek jelden izole edilmek üzere % 1 agaroz jele yüklendi. "Promega PCR clean-up and gel isolation kit" kullanılarak jelden geri kazanılan örneklere miktar tayini yapıldıktan sonra ligasyon basamağına geçildi.

- Promega PCR clean-up and gel isolation kit protokolü
  - Jel parçası tamamen çözünene değin 50-65 ^{o}C'ta bekletildi.
  - Elektroforez sonrasında kesilen DNA parçası 1,5 ml eppendorf tüpe alınarak tartıldı.
  - Her 1 mg jel başına 1 µl "membrane binding solution" eklenerek vortekslendi.
  - Jel parçası tamamen çözünene değin 50-65 ^{o}C'ta bekletildi.
  - Çözünen jel karışımı toplama tüpünün içine yerleştirilmiş SV mini kolona aktarıldı.
  - Oda sıcaklığında 1 dk. bekletildi.

- 16 000 g'de 1 dk. santrifüjün ardından toplama tüpündeki sıvı döküldü, mini kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- 700 µl "membrane wash solution" eklendi. 16 000 g' de 1 dk. santrifüj edildi, toplama tüpündeki sıvı döküldü, mini kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- 500 µl "membrane wash solution" eklenen örnekler 16 000 g'de 5 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak mini kolon yine aynı tüpe alındı. Kalan etanolün uçması için santrifüjün kapağı kullanılmadan 16 000 g'de 1 dk. daha santrifüj edildi.
- Mini kolon 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µl "nuclease-free water" eklenerek oda sıcaklığında 1 dk. bekletildi.
- 16 000 g'de 1 dk. santrifüjün ardından mini kolon atıldı. Tüpte toplanan örnek +4 veya -20 ^{o}C'ta saklandı.

5.6. Transformasyon

İkinci PCR sonucu elde edilen ürünlerin *E.coli* JM109 kompetan hücrelerine transformasyonunda TSS transformasyon yöntemi kullanıldı.

TSS Transformasyon Yöntemi

- Kompetan hücre hazırlanması
  - 2 ml LB besi yeri, tek koloni ile veya -20 ^{o}C ya da -80 ^{o}C hücre stoğunun 20 µl'si ile aşılandı. Hücre için uygun sıcaklıkta, 200 rpm çalkalama hızı ile gece boyu büyütüldü.
  - Gece boyu büyütülen kültürün 1 ml'si 500 ml'lik erlende bulunan 100 ml LB besi yerine aşılanarak uygun sıcaklıkta, 200-220 rpm çalkalama hızı ile büyütüldü.
  - OD_{600} değeri 0,5 olunca kültür önceden soğutulmuş santrifüj tüpüne alındı ve buzda 20 dk. bekletildi.
  - Süre bitiminde +4 ^{o}C'ta 7000 rpm'de 10dk. santrifüj edildi.
  - Üst sıvı atıldı. Pelet buzda soğutulmuş 10 ml TSS içinde çözüldü ve kompetan hücre transformasyona hazır hale getirildi.
  - Kullanılmayan miktar bekletilmeden -80 ^{o}C'ta stoklandı.

- TSS (100 ml): 10 g PEG8000 ve 5 ml DMSO LB ile 95 ml'ye tamamlanarak 121 ^{o}C'ta 20 dk. otoklavlandı. Soğuduktan sonra içine filtre ile steril edilmiş 1 M $MgCl_2$'den 5 ml eklenerek karıştırıldı. +4 ^{o}C'ta saklandı.

- Transformasyon aşaması
  - Tüplere ligasyon materyalinin 5 µl'si dağıtıldı.
  - Üzerine 200 µl kompetan hücre eklenerek karıştırıldı.
  - Tüpler 30-60 dk. buz içinde bekletildi.
  - 42 ^{o}C'ta 2 dk. ısı şoku uygulanan tüpler hemen buza alınarak 2-5 dk. bekletildi.
  - Her bir tüpe 1 ml LB eklenerek 37 ^{o}C'ta 1 saat çalkalanarak inkübe edildi.
  - Süre sonunda tüpler 10 000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi.
  - Üst sıvı dökülerek pelet dipte bırakılan sıvı içinde çözülerek LB+ampisilinli petrilere yayıldı.
  - Gece boyu uygun sıcaklıkta büyütüldü.

- LB :10 g/l nutrient broth, 5 g/l yeast extract, 8 g/l NaCl, 0,52 g/l Trizma base
- LB –agar : 10 g/l nutrient broth, 5 g/l yeast extract, 8 g/l NaCl, 15 g/l agar
- Ampisilin**:** 10 mg/ml stok çözeltisi hazırlandı. 1 g ampisilin, 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü ve çözelti pH'sı 1M NaOH ile 8.5' e ayarlandı. 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek -20°C'ta saklandı.

5.7. Klon Adaylarında α-amilaz Geni Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

5.7.1. STET Plazmit İzolasyonu Yöntemi

- Gece boyu 10 ml ampisilin içeren LB besi yerinde büyütülen kültürler +4 ^{o}C'ta 3500 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi.
- Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelet 400 µl STET [STET (100 ml) :8 g sukroz, 5 ml Triton X-100, 5 ml 1M Tris-HCl pH 8.0, 1,86 g EDTA] içinde çözüldü ve eppendorf tüpe aktarıldı.
- 10 mg/ml lizozim solüsyonundan 25 µl eklenen tüpler bekletilmeden 1 dk. vokteklendi.

- 45 sn. kaynatılan tüpler oda sıcaklığında 13 000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Oluşan pelet steril kürdan yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Tüplere sırasıyla 200 µl 5M NH_4Ac ve 1 ml 2-propanol eklendi. Vortekslenen tüpler -20^oC'ta 5-10 dk. bekletildi.
- +4 ^oC'ta 13 000 rpm'de 10dk. santrifüjün ardından üst sıvılar uzaklaştırıldı, pelet kurutularak 50 µl steril dH_2O'da çözüldü.

5.7.2. "Promega Wizard miniprep kit" Plazmit DNA İzolasyonu

Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden seçilen birkaçının plazmit izolasyonunda ticari olarak satılan plazmit izolasyon kiti kullanıldı. Buna göre;

- Gece boyu büyütülen 5 ml hücre kültürü 4000 rpm'de 20 dakika süreyle çöktürülerek üst sıvı uzaklaştırıldı.
- Örnekler 250 µl "cell resuspension" solüsyonunda çözüldü ve eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Örneklere "cell lysis" solüsyonundan 250 µl eklendi. Tüpler alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- Bir sonraki basamakta tüplere 10 µl "alkaline protease" çözeltisi eklenerek alt-üst edilerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- Nötralizasyon çözeltisinden 350 µl eklenerek karışıtırıldı ve 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst sıvı özel tüplere yerleştirilmiş filtrelere aktarıldı ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Alt tüpte biriken sıvı boşaltılarak tekrar yerleştirildi. Üzerine 750 µl yıkama çözeltisi eklenerek 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 250 µl yıkama çözeltisiyle yeniden yıkanan membran 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kalan etanolün uzaklaşması için santrifüj kapağı açık şekilde 1 dakika daha santrifüj edildikten sonra filtre yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Son olarak örneklere 750 µl "nüklease free water" eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi ve böylelikle plazmit izolasyonu tamamlandı. İzolasyon süresince yapılan santrifüjler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

5.8. Klonlanan Genlerin DNA Dizi Analizi

Klonlamanın başarılı olup olmadığının ve klonlanan genin dizisinin kontrolü Beckman CEQ8000 otomatik dizi analizi sistemi kullanılarak yapıldı. Bu aşamada, elde edilen klon adaylarının plazmit DNA'sı "Promega Wizard miniprep kit" kullanılarak (Bölüm 5.3.7.2.) elde edildi. Elde edilen miniprep için miktar tayini yapıldıktan sonra dizi analizi reaksiyonuna geçildi.

Elde edilen plazmitlerin % 1 agaroz jelde miktar tayinleri yapıldı ve Tablo 5.6'da verilen PCR koşulları ve programı kullanılarak dizi reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 5.6: Dizi analiz reaksiyonunda uygulanan PCR koşul ve programı.

PCR koşulları	PCR programı
• 500 ng kalıp DNA • 6,4 pmol primer • 8 µl DTCS tamponu • dH_2O ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde tamamlandı.	94°C' ta 4' 96°C' ta 20'' 50°C' ta 20'' 60°C' ta 240'' } 30X

Reaksiyon sonunda örneklere "durdurma çözeltisi" (2 µl 3M NaAc, pH 5,2; 2 µl 100 mM EDTA; 1 µl 20 mg/ml glikojen) eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 60 µl % 95 soğuk etanol eklendi. +4 °C' ta 14 000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı uzaklaştırıldı. 200 µl % 70 soğuk etanol eklenen örnekler 4 °C' ta 14 000 rpm' de 5 dk. çöktürüldü ve üst sıvı atıldıktan sonra % 70 etanol basamağı tekrar edildi. Örnekler liyofilizatörde kurutuldu.

Dizi analizi için peletler 40 µl örnek yükleme solüsyonunda çözülerek dizi analizi cihazı örnek plakalarına yerleştirildi, üzerlerine bir damla mineral yağ damlatılarak okutuldu.

5.9. Klonların Ekspresyon Çalışması

5.9.1. 3 ml Besi yerinde Yapılan Ekspresyon Çalışması

Elde edilen klonların alfa amilaz üretip üretmediklerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle 3 ml % 1 nişasta içeren sıvı besi yerinde büyütülen kültürlerde hücre dışı enzim aktivitesi çalışıldı. Buna göre 0,1 mM IPTG ile uyarılan kültürlerden IPTG ile uyarım sonrası 5. saatte ve kültürün başlangıç saatinden 24 saat sonra örnek alınarak üst sıvıda hücre dışı aktivitenin varlığı test edildi. Paralel olarak her farklı gruptan bir örnek için uyarımsız örnek aynı koşullarda çalışıldı.

- % 1 nişasta içeren sıvı besi yeri: % 1 soluble starch, % 0.25($NH_4)_2SO_4$, % 0.03 $MgSO_4.7H_2O$, % 0.02 $CaCl_2$, % 0.2 peptone, % 0.2 yeast extract, % 0,002 $FeSO_4$.

- IPTG (İzopropil-β-D-tiogalaktozit): 100 mM stok çözeltisi hazırlandı. 0.283 g IPTG, 10 ml steril distile su içerisinde çözüldü. 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek -20°C'ta saklandı.

- α-Amilaz Aktivite Testi (3,5-di nitro salisilik asit yöntemi):Tez çalışmasında α-amilaz aktivitesi, Bernfeld'in (1955) 3,5-di nitro salisilik asit yöntemi ile belirlendi.

  - 500 µl hücre üst sıvısı alınarak, üzerine 500 µl substrat çözeltisi eklendi.
  - Vorteks ile hafifçe karıştırılan tüpler 37º C su banyosunda 3 dakika inkübe edildi.
  - İnkübasyon sonrası her bir tüpe 3 ml 3-5 dinitro salisilik asit çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırıldı.
  - Tüpler daha sonra 10 dakika kaynayan su içinde tutuldu.
  - Oda sıcaklığına gelinceye dek buza alınan tüplere 8 ml distile su eklenerek vorteks ile karıştırıldı.
  - A_{540} nm'de spektroskopik ölçüm yapıldı.

- Tampon: Aktivite testinde 6,7 mM NaCl içeren 20 mM NaH_2PO_4 tamponu (pH 6,9) kullanıldı. 0,5 M Na_2HPO_4 ve 0,5 M NaH_2PO_4 hazırlanarak pH'ları ölçüldü. Bu

çözeltilerden hareketle 20 mM M Na_2HPO_4 ve 20 mM NaH_2PO_4 hazırlandı. Bu iki çözelti pH 6.9 olacak şekilde birbiri ile karıştırıldı. Son konsantrasyonu 6,7 mM olacak şekilde 5 M NaCl eklendi.

- Substrat çözeltisi: 6,7 mM NaCI içeren 20 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 6.9) % 1 çözünür nişasta çözeltisi hazırlandı.

- Dinitro salisilik asit çözeltisi*:* 10 g 3,5-di nitro salisilik asit tartıldı ve 500 ml distile su ile karıştırıldı. Üstüne 200 ml NaOH (2 M) eklenerek karıştırıldıktan sonra yavaş yavaş 300 g sodyum potasyum tartarat eklendi. Dinitro salisilik asitin çözünmesi zor olduğu için 1 gece manyetik karıştırıcıda bırakılarak karıştırıldı. Tamamen çözündüğünde distile su ile 1litreye tamamlandı.

- α-Amilaz için 1U: 37 ºC'ta pH 6.9'da 1 dakikada 1 µmol maltoz açığa çıkaran enzim miktarıdır.

- Kalibrasyon eğrisi: 6,7 mM NaCI içeren 20 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 6.9) çözünmüş maltoz (5 µmol/ml) standart olarak kullanıldı. Maltozun seri dilüsyonları Tablo 5.7'de verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 5.7: Maltoz standardının tüplere dağılımı.

	0 (kör)	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Maltoz (5 µmol/ml)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
dH_2O (ml)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-

Her tüpe 3 ml 3-5 dinitro salisilik asit solüsyonu eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Tüpler kaynar suyun içinde 10 dakika süreyle kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelinceye dek buzda soğutulan tüplere daha sonra 8 ml distile su eklenerek karıştırıldı. A_{540} nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapılan örneklerin iki seti için elde edilen değerlerin ortalaması alınarak, maltoz konsantrasyonuna karşı 540

nm'deki absorbans grafiği çizildi. Hazırlanan grafikten elde edilen eğim enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanıldı.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml)} = [\,(A_{540} / \text{Eğim}) \times (1000 / MA_{Maltoz}) \times RH\ (ml)] \,/\, [E\ H(ml) \times RS(dakika)] \quad (5.1)$$

- Reaksiyon Hacmi (RH): 1 ml
- Enzim Hacmi (EH): 0,5 ml
- Reaksiyon Süresi (RS): 3 dakika
- M.A (maltoz) : 360,3 g/mol
- Eğim: 0,078

5.9.2. Hücre İçi Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi için Hücrelerin Ultrasonik Ses Dalgaları ile Parçalanması

A4 ve P17'den türevlenen klonlarda hücre dışı amilaz aktivitesinin yok denecek kadar az olması nedeniyle bu klonlarda hücre içi aktiviteye de bakıldı.

- Sonikasyon protokolü
  - (-20) ^{o}C'ta saklanan 10 ml hücre peleti 1 ml $CaCl_2$ (100 mM) içinde süspanse edildi ve 1 saat buzda bekletildi.
  - 7000 rpm'de 30 dk. santrifüjün ardından üst sıvı atıldı, pelet 1,1 ml 100 mM Tris-HCl/10 mM gliserol, pH 8.0 tamponunda çözüldü ve ardından 55 µl lizozim (10 mg/ml) eklendi, 15 dk. buz içinde çalkalandı.
  - 2,31 µl EDTA (0,5 M) eklenerek buzda 45 dk. çalkalandı.
  - 42 ^{o}C'ta 1 dk. şok uygulamasının ardından buza alınan hücrelere sonikasyon işlemi uygulandı.
  - % 10 şiddette 20 sn.'lik toplam 6 vuruş (30 sn. aralıklarla) olacak şekilde hücreler parçalandı.
  - 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjün ardından üst sıvı aktivite testi için kullanıldı.

5.9.3. 15 ml Besi Yerinde Yapılan Ekspresyon Çalışması

Her bir soydan elde edilen seçilmiş klonlar için tüpte (3 ml besi yerinde) yapılan çalışmada en yüksek aktiviteyi verenler ile ölçek büyütülerek ekspresyon çalışması yapıldı. Buna göre, I. ön kültür için ampisilinli (100 µg/ml) LB besi yeri, klonların -20 °C hücre stokları ile % 1 oranında aşılanarak 37 °C'ta, 175 rpm'de gece boyu büyütüldü. Ertesi gün I. ön kültür ile % 1 oranında aşılanan II. ön kültür ise 50 ml'lik erlende 1/10 havalandırma oranı ile yine ampisilinli LB besi yerinde aynı şartlarda büyütüldü. Ana kültür, aynı havalandırma oranı ile 150 ml'lik erlende % 1 nişasta içeren ampisilinli sıvı besi yerinde 24 saat süreyle aynı koşullarda gerçekleştirildi. Bakteri kültürleri, hücre yoğunluğu (OD_{600}) 0,6-0,8'e ulaştığında final oranı 0,1 mM olacak şekilde IPTG ile uyarıldı. Belirlenen saatlerde örnek alınarak hücre büyümesi ölçüldü. Paralel olarak enzimatik aktivite testi yapıldı.

5.10. A28/1 Klonunun α-Amilazının Saflaştırılması

A28/1 klonunun α-amilazının saflaştırılması için klon, %1 nişasta içeren sıvı besi yerinde IPTG uyarımlı (0,1 mM) olarak 24 saat süreyle büyütüldü. Üst sıvı toplanarak süzüldü. (Whatman No:3). % 80 amonyum sülfat eklenerek gece boyu +4°C'ta karıştırıldıktan sonra 7000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi. Pelet 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponunda çözülerek aynı tampona karşı gece boyu diyaliz edildi. Diyaliz örneği 10000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra üst sıvı 0,45 µm filtreden geçirilerek iyon değişimi kromatografi matrisine (Q-Sepharose) yüklendi. Bu aşamada "ÄKTA Purifier" saflaştırma sistemi kullanıldı.

İyon değişim kromatografisinde, % 0-100 NaCl olacak şekilde lineer gradyan uygulandı. 1 ml/dk. akış hızıyla yürütülen kolonda 280 nm'de ölçülen absorbans değerleri dikkate alınarak amilaz aktivitesi bakımından fraksiyonların aktiviteleri kontrol edildi. Aktif fraksiyonlar toplanarak AquacideI ile konsantre edildi. Konsantre örnek, Sephacryl S100 kolonuna yüklendi ve 50 mM Tris-HCl pH8.0, 0,15 M NaCl tamponu kullanılarak 0,6 rpm akış hızı ile jel filtrasyon kromatografisi Bio-RAD saflaştırma sistemi kullanılarak yapıldı. Aktif fraksiyonlar SDS-PAGE ile kontrol edilerek 2 grupta toplandı (pool1 ve pool2).

- Saflaştırmada Kullanılan Kolonlar

  - Hi-prep Q-FF 16/10 (Güçlü anyon): Kolon hacmi: 20 ml, toplam iyonik kapasitesi: 0,18-0,25 mmol Cl^-/ml medium

  - Sephacryl S-100 (Jel Filtrasyon): Kolon hacmi: 30 ml

5.10.1. Protein Miktarının Belirlenmesi

Saflaştırma aşamalarında elde edilen örneklerin, fraksiyonları ve oluşturulan enzim havuzlarının protein miktar tayinleri Bradford (1976) tarafından tanımlanan "dye binding" yöntemi ile Coomasie Blue G-250 kullanılarak yapıldı. Belirlenen miktardaki enzim örneği, distile su ile 800 µl'ye tamamlandı. Tüplere 200 µl Coomassie Blue G-250 boyası eklendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Spektrofotometrede protein içermeyen "blank" tüpüne karşı 595 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Ölçümler, BSA'nın standart olarak kullanıldığı kalibrasyon eğrisi değerleri ile hesaplandı.

BSA kalibrasyon eğrisinin hazırlanması: Bradford analizi için kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında, standart olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanıldı. BSA'nın değişen konsantrasyonlarını (2-10 µg) içeren örnekler distile su ile 800 µl'ye tamamlandı ve her bir tüpe 200 µl Bradford boyası eklenerek, spektrofotometrede BSA içermeyen "blank"e karşı, 595 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Verilmiş BSA konsantrasyonlarına karşı elde edilen A595 değerleri ile çizilen grafiğin eğimi, protein konsantrasyonunun ve toplam protein miktarının belirlenmesinde kullanıldı.

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = A5_{95} / \text{Eğim} / \text{örnek hacmi (µl)} \quad (5.2)$$

$$\text{Toplam protein miktarı (mg)} = \text{Protein konsantrasyonu x örnek hacmi (µl)} \quad (5.3)$$

5.10.2. Saflaştırılan Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

5.10.2.1. SDS-PAGE

Saflaştırma aşamasında elde edilen protein örneklerinin moleküler ağırlıkları % 12'lik SDS-PAGE'de, protein belirteçleri yardımı ile belirlendi (Laemmli, 1970). SDS-PAGE için Tablo 5.8'de verildiği şekilde ayırma ve derişim jeli hazırlandı.

- Örneklerin hazırlanması

Örneklerden 10 µl alınarak üzerlerine 10 µl yükleme tamponu eklendi. Standart olarak seçilmiş protein belirtecinden 5 µl alınarak üzerine 15 µl yükleme tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler karıştırıldıktan sonra kısa süreli santrifüj edildi. 5 dakika süreyle kaynayan suda bekletilen örnekler jele yüklendi.

- Yükleme Tamponu
  - 50 mM Tris-HCl, pH 6.8,
  - % 1 SDS
  - 2 mM EDTA
  - % 1 β-merkaptoetanol
  - % 10 gliserol
  - % 0,002 Bromofenol blue

Tablo 5.8: SDS-PAGE'de kullanılan jeller.

Ayırma jeli	Derişim jeli
750 µl dH_2O 3750 µl 0,75 M Tris HCl, pH 8.8 / % 0.2 SDS 3 ml Akrilamit/ Bisakrilamit (30:1) 90 µl %10 APS 6 µl TEMED	1050 µl dH_2O 1500 µl 0,25 M Tris HCl, pH 6.8 / % 0.2 SDS 390 µl Akrilamit / Bisakrilamit (30:1) 60 µl % 10 APS 3 µl TEMED

Jeller dökülüp polimerize olduktan sonra hazırlanan örnekler ve protein belirteci kuyulara yüklendi. Tank 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu ve jel kasetleri yerleştirildi. Elektroforez, bantlar alt jele (ayırma jeli) geçene dek 100 Volt'ta, daha sonra 200 Voltta gerçekleştirildi. Yürütme tamamlandığında çıkarılan jel boyama çözeltisinde gece boyu hafifçe çalkalanarak bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra arıtma çözeltisinde bekletildi.

- Boyama çözeltisi: 100 ml % 10 asetik asit, 100 ml % 95'lik alkolde çözülmüş % 0,25 Coomassie Blue

- Arıtma çözeltisi: % 5 asetik asit, % 50 etanol

- 5X SDS-PAGE yürütme tamponu: 15 g Tris, 72 g glisin, 5 g SDS tartılarak distile su ile 1 litreye tamamlandı.

5.10.2.2. Zimogram

Zimogram analizi Yang ve arkadaşlarının (2004) kullandığı yöntem uyarlanarak yapılmıştır. Elektroforez tamamlandığında SDS-PAGE jeli % 2,5'lik (v/v) TritonX-100 solüsyonu ile 30 dk. hafifçe çalkalandıktan sonra iki kez distile su ile yıkandı. %1 nişasta (w/v) içeren 20 mM sodyum fosfat pH 6.0 tamponu içinde 50 ^{o}C' ta 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası jel, distile su ile yıkandı ve en son aşama olarak iyodin solüsyonu ile 5 dk. boyandı.

- İyodin solüsyonu: % 50 (v/v) metanol, % 1 (w/v) iyodin, % 10 (w/v) potasyum iyodit

5.11. Enzim Nitelendirme Çalışmaları

Amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyonu yöntemleri kullanılarak yapılan saflaştırma çalışmaları sonucu elde edilen aktif fraksiyonların toplandığı iki enzim havuzundan "pool-1" enzim nitelendirme çalışmalarında α-amilaz kaynağı olarak kullanıldı.

Bu bölümde yapılan bütün çalışmalar 3 kez tekrarlanmış ve ortalama değerler hesaplanarak sonuçlar bölümünde verilmiştir.

5.11.1. pH'nın Enzim Aktivite ve Kararlılığına Etkisi

Enzimin optimal pH'sı, standart aktivite testinde (Bölüm 5.6.1) substrat çözeltisi olarak; farklı pH'larda hazırlanan 20 mM tamponlarda çözünen %1 nişasta kullanılarak belirlendi. En yüksek aktivite elde edilen pH değeri % 100 kabul edilerek hesaplama yapıldı.

Enzimin hangi pH aralığında kararlı olduğunun belirlenmesi amacıyla enzimatik aktivite reaksiyonları enzimin farklı tamponlarda 50 ^{o}C' ta 1 saat ve 4 ^{o}C'ta 24 h ön inkübasyonu sonrası aktivitesi ölçülerek belirlendi. Kalan aktivite değerleri, +4 ^{o}C'taki enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek hesaplandı.

- Nitelendirme çalışmalarında kullanılan tamponlar
  - Sodyum asetat- asetik asit tamponu (pH 3-5,5): 40 mm sodyum asetat ve 40 mM asetik asit hazırlandı. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH ayarlandı, 50 ml alınarak dH_2O ile 100 ml'ye tamamlandı.
  - Fosfat tamponu (pH 6-8): 40 mM Na_2HPO_4 ve 40 mM NaH_2PO_4 hazırlandı. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH ayarlandı, 50 ml alınarak dH_2O ile 100 ml'ye tamamlandı.
  - Tris-HCl (pH 8,5-9): 40 mM Tris ve 40 mM HCl hazırlandı. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH ayarlandı, 50 ml alınarak dH_2O ile 100 ml'ye tamamlandı.
  - Glisin-NaOH (pH 9,5-12): 40 mM Tris ve 40 mM NaOH hazırlandı. Birbiri ile karıştırılarak istenen pH ayarlandı, 50 ml alınarak dH_2O ile 100 ml'ye tamamlandı.

5.11.2. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi ve Kararlılığına Etkisi

Enzimatik aktivitenin ilk basamağı olan 3 dk.lık inkübasyon pH 6.0'da, farklı sıcaklıklarda (30-90 ^{o}C) yapılarak enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık belirlendi ve % 100 olarak kabul edildi.

Sıcaklık kararlılığının belirlenmesi için enzim, 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) tamponunda farklı sıcaklıklarda tutuldu ve belirlenen zaman aralıklarında ölçüm yapıldı. Kalan aktivite değerleri +4 ^{o}C'ta bekletilen enzimin aktivitesi %100 kabul edilerek hesaplandı.

5.11.3. Metal İyonları ve Amonyum Tuzlarının Etkisi

Metal iyonları ($FeCl_2$, $FeCl_3$, $LiCl_2$, $ZnCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, $BaCl_2$, $CuCl_2$, $FeSO_4$, NaCl, KCl, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$) ve amonyum tuzlarının [$(NH_4)_2SO_4$, NH_4Ac] 10 mM konsantrasyonda enzimatik aktiviteye etkisinin belirlenmesi amacıyla, enzimin ilgili maddelerle 50 ^{o}C'ta 30 dk. bekletilmesinin ardından standart enzimatik aktivite testi yapıldı. Tuz eklenmemiş enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edildi.

5.11.4. Çeşitli Kimyasalların ve Stabilize Edici Ajanların Enzim Aktivitesine Etkisi

EDTA'nın farklı konsantrasyonlarının ve 10 mM PMSF ile β-ME'nin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla 50 ^{o}C'ta 30 dk. bekletilen enzimin aktivitesi ölçüldü. Kimyasal eklenmeyen enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edilerek kalan aktivite değerleri hesaplandı.

Stabilize edici ajanların enzimin sıcaklık kararlılığına etkisinin belirlenmesi amacıyla reaksiyon karışımına final oranı % 10 ve % 30 olacak şekilde gliserol, etilen glikol ve DMSO eklendi. Herhangi bir ajanın eklenmediği enzimatik aktivite değeri % 100 kabul edilerek kalan aktivite değerleri hesaplandı.

5.11.5. Deterjanların Etkisi

Deterjanların enzimatik aktiviteye etkisinin belirlenmesi amacıyla % 0,1 ve % 1 oranlarda CTAB, Na-deox, Triton X-100, Tween 20, Tween 80 ve SDS varlığında 50 ^{o}C'ta 30 dk. inkübe edilerek enzimin aktivitesi belirlendi. Deterjan eklenmeyen aktivite %100 olarak kabul edildi ve kalan aktivite değerleri hesaplandı.

5.11.6. Çeşitli substratların % 1 konsantrasyonda göreceli aktivitelerinin belirlenmesi

Enzimin çeşitli substratların üzerindeki göreceli aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla amiloz, amilopektin, mısır ve buğday nişastası ile maltoz, maltodekstrin ve α-, β-siklodekstrinin % 1 konsantrasyonları hazırlandı ve standart aktivite testinde substrat olarak kullanıldı. En yüksek değer alınan substratın aktivitesi %100 kabul edilerek göreceli aktiviteler hesaplandı.

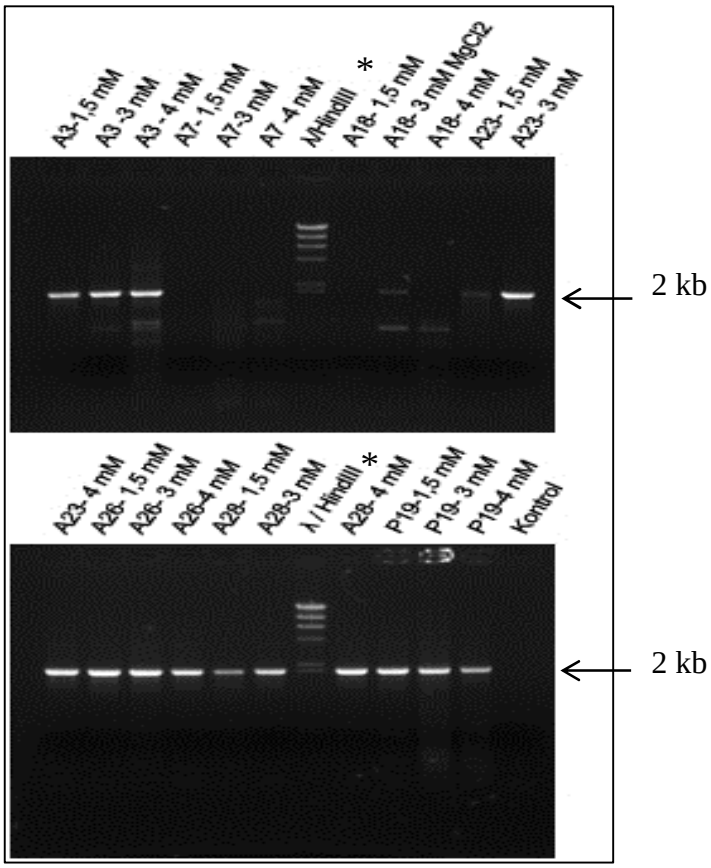
5.11.7. İstatistiksel analizler

Nitelendirme sonucu elde edilen veriler Student's *t* test kullanılarak değerlendirildi (SPSS software version 18), p değeri 0,05'ten küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

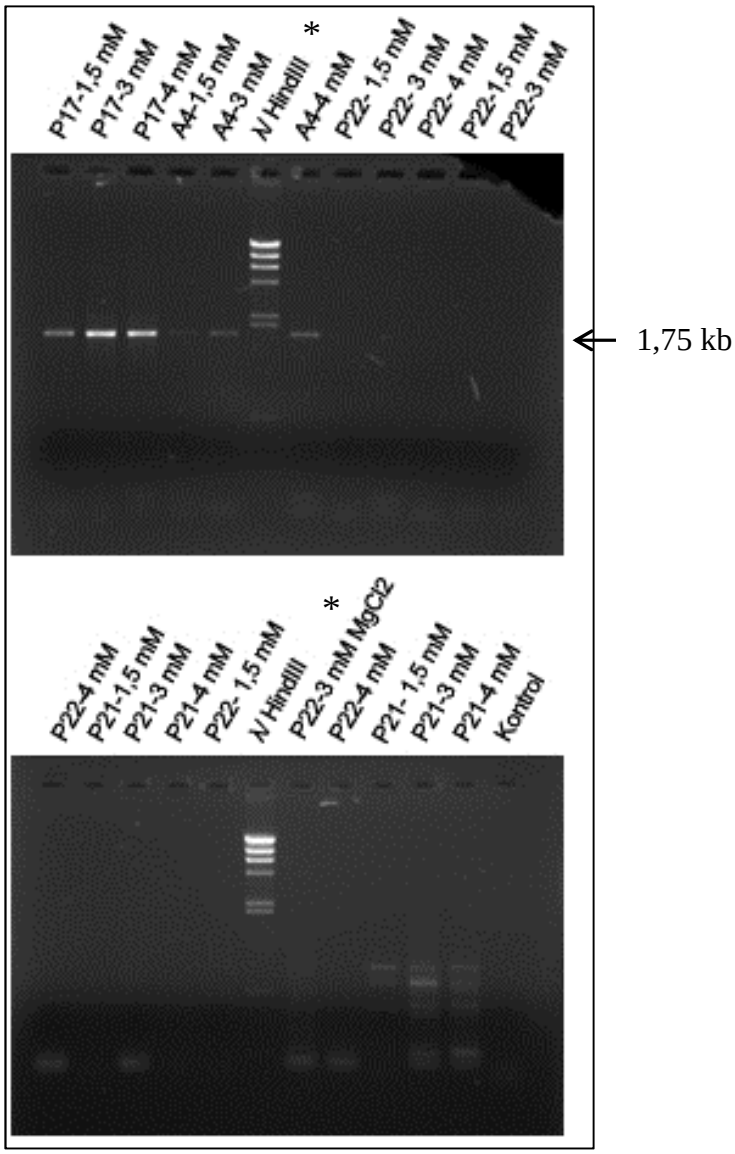
6. BULGULAR

6.1. Yerel *Bacillus* Soylarından α-Amilaz Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

Klasik ve moleküler tiplendirme çalışmalarından elde edilen verilerden hareketle amilaz üreticisi *Bacillus* soylarında ilgili genleri çoğaltmaya yönelik PCR reaksiyonları, tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirildi. PCR'nin kontrolü için yapılan, içinde DNA bulunmayan kontrol örneklerinde agaroz jelde bant oluşumu gözlenmedi ve bu sonuç, PCR'nin bulaşsız bir şekilde yapıldığını gösterdi. 3 farklı $MgCl_2$ (1,5; 3; ve 4 mM) konsantrasyonunda yapılan PCR'ler sonucu elde edilen jel profilleri Şekil 6.1 ve Şekil 6.2'de verildiği gibidir. * Belirteç olarak kullanılan *Hind*III ile kesilmiş λ DNA' sını (23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 125 bp) göstermektedir.



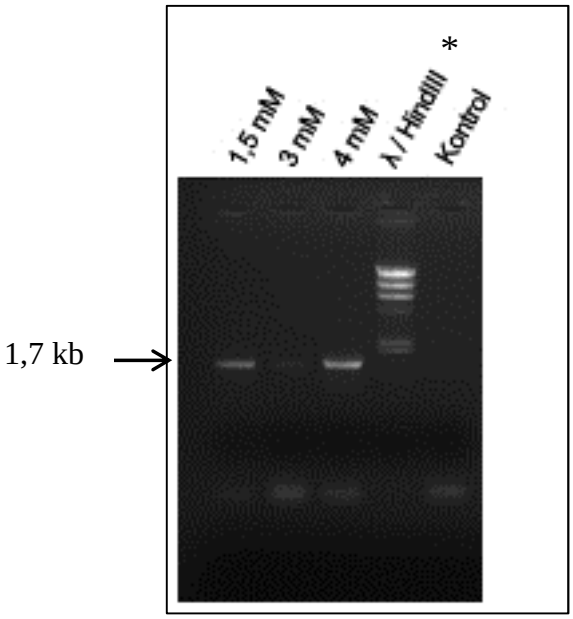
Şekil 6.1: 12AF-13AG primer çifti ile çoğaltılan PCR ürünlerinin % 1 agaroz jel profili.



Şekil 6.2: 18AF-19AG primer çifti (kuyu :1-5 ve 7-10), 14AF-15AG primer çifti (kuyu: 11-16) ve 16AF-17AG primer çifti (kuyu: 17 ve 19-23) ile çoğaltılan PCR ürünlerinin % 1 agaroz jel profili.

Şekil 6.1 ve 6.2'de verildiği gibi kalıp DNA kullanılmadan yapılan ve her iki şekilde de "kontrol" olarak belirtilen kuyularda bant gözlenmemesi, PCR'nin kontaminasyon olmadan yapıldığını gösterdi. % 1'lik agaroz jel profillerine bakılarak, elde edilen fragmanları boyları beklenen ile uyumlu olarak, *B. subtilis* olarak tanımlanan A3, A23, A26, A28, P19 için ~ 2 kb, A4 ve P17 soyları için 1,75 kb olarak tahmin edildi. Grubumuzun önceki çalışmalarında *B.licheniformis* α-amilaz geni çoğaltmak için kullanılmış 1FA ve 2GA primer çifti ile P21 soyu α-amilaz geni PCR ile çoğaltıldı. Beklenen ile uyumlu olarak agaroz jelde 1,7 kb büyüklüğünde tek bir bant görüldü. Elde edilen %1 agaroz jel profili Şekil 6.3'te

verildiği gibidir. * Belirteç olarak kullanılan *Hind*III ile kesilmiş λ DNA' sını (23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 125 bp) göstermektedir.



Şekil 6.3: 1FA-2GA primer çifti ile çoğaltılan P21 soyu PCR ürünlerinin % 1 agaroz jel profili.

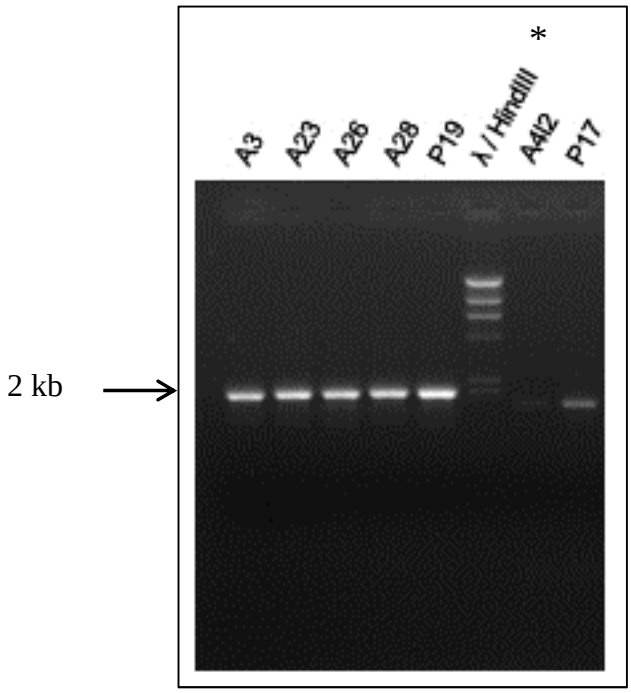
A7 soyu α-amilazı için ise 12AF ve 13AG primer çifti ile 1,5 ve 3 mM $MgCl_2$ konsantrasyonu kullanılarak yapılan PCR sonucu agaroz jelde bant oluşumu gözlenmedi (Şekil 6.1). 4 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunda ise beklenenden farklı, ~1 ve ~1,5 kb büyüklüğünde iki bant görüldü. Bu durum, söz konusu soyun α-amilaz geninin *B. subtilis* olduğu düşünülen diğer soylardan farklı olduğunu düşündürdü. A18 soyunda ise 1,5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunda bant oluşumu gözlenmezken, 3 mM $MgCl_2$' de beklenen ile uyumlu olarak ~2 kb büyüklüğünde bir bandın yanı sıra ~850 bç büyüklüğünde ilave bir bant görüldü. $MgCl_2$ konsantrasyonu 4 mM'a çıktığında ~2 kb'lik bandın kaybolduğu gözlendi. PCR'de hedeflenen şekilde, istenilen büyüklükle uyumlu tek bir bandın elde edilememesi nedeniyle bu soy da sonraki çalışmalarda kullanılmadı.

Bu sonuçlara göre A3, A23, A26, A28, P19, A4, P17 ve P21 soyları için seçilen $MgCl_2$ konsantrasyonlarında (Tablo 6.1) preparatif PCR yapıldı.

Tablo 6.1: Preparatif PCR için seçilen primer çiftleri ve $MgCl_2$ konsantrasyonları.

Soy	Primer çifti	PCR için seçilen $MgCl_2$ konsantrasyonu	Primer çiftinin üzerinde bulundurduğu restriksiyon kesim bölgeleri
A3	12AF-13AG	1,5 mM	*Kpn*I/*Hind*III
A23	12AF-13AG	3 mM	*Kpn*I/*Hind*III
A26	12AF-13AG	1,5 mM	*Kpn*I/*Hind*III
A28	12AF-13AG	3 mM	*Kpn*I/*Hind*III
P19	12AF-13AG	1,5 mM	*Kpn*I/*Hind*III
A4	18AF-19AG	3 mM	*Kpn*I/*Pst*I
P17	18AF-19AG	3 mM	*Kpn*I/*Pst*I
P21	1FA-2GA	1,5 mM	*Eco*RI/*Hind*III

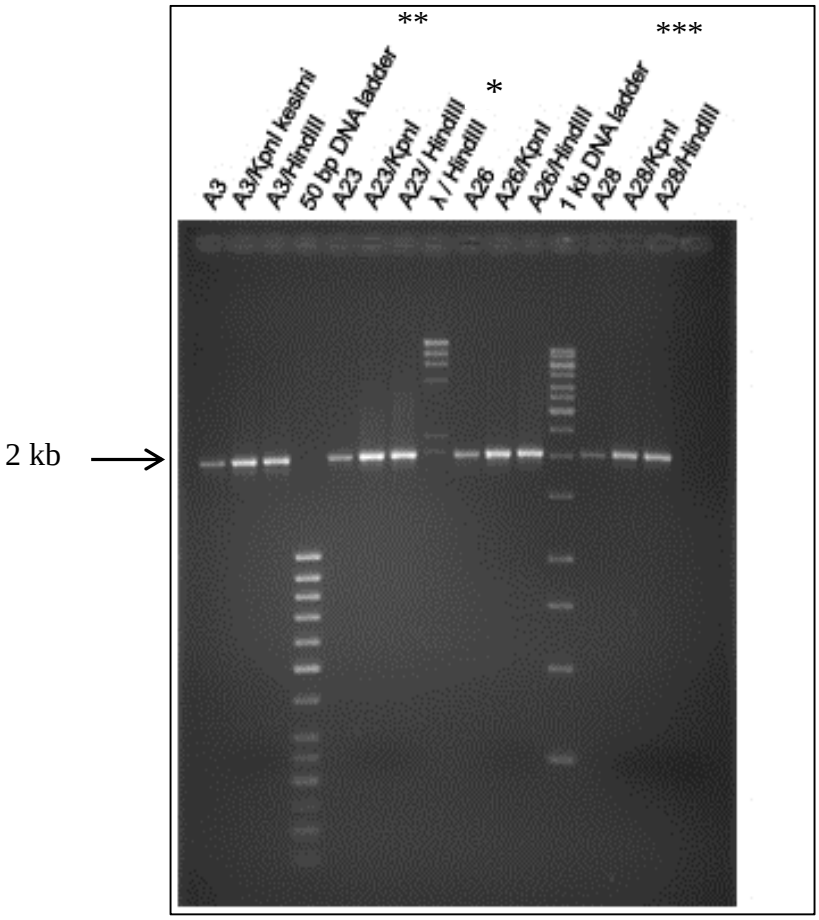
Preparatif PCR sonucu elde edilen ürünlerin jel profilleri Şekil 6.4'te gösterilmektedir. * Belirteç olarak kullanılan *Hind*III ile kesilmiş λ DNA' sını (23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 125 bp) göstermektedir.



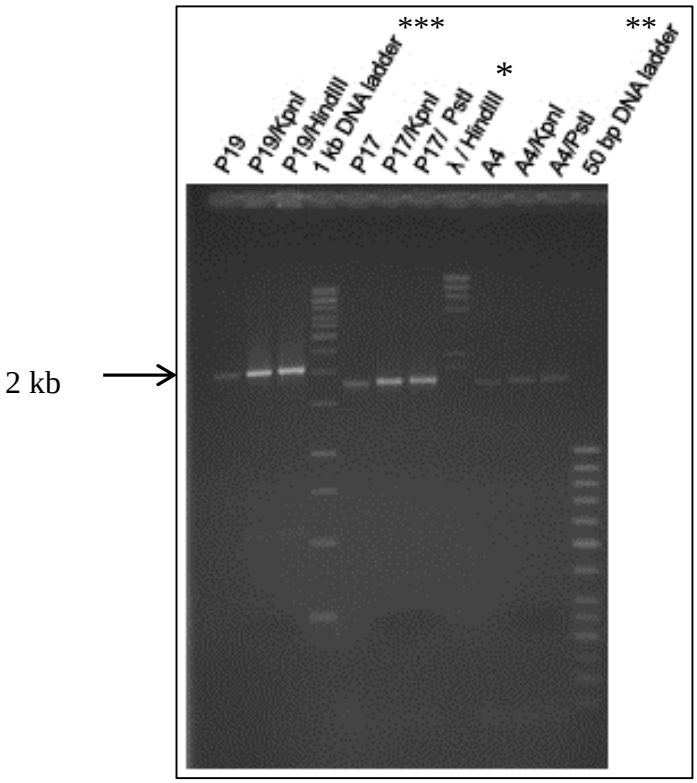
Şekil 6.4: Preparatif olarak üretilen PCR ürünlerinin % 1 agaroz jel profili.

6.2. Çoğaltılan Genlerin Restriksiyon Endonükleazlar ile Kontrolü

PCR ürünleri, çalışmanın bir sonraki basamağı olan klonlamada kullanılacak restriksiyon enzimleri ile gen içi enzim kesim bölgesi bulunup bulunmadığının kontrolü için ilgili restriksiyon endonükleazları ile kesime alındı. Elde edilen jel profillerinde (Şekil 6.5 ve 6.6), kullanılacak restriksiyon endonükleazlar için gen içi kesim bölgesinin olmadığı görüldü ve klonlamanın bir sonraki basamağı olan ligasyon reaksiyonuna geçildi. * Belirteç olarak kullanılan *Hind*III ile kesilmiş λ DNA' sını (23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 125 bp), ** 50 bp "DNA ladder"i (1000-900-800-700-600-500-400-300-250-200-150-100-50 bp), *** 1 kb "DNA ladder"i (10 000-8000-6000-5000-4000-3500-3000-2500-2000-1500-1000-750-500-250 bp) göstermektedir.



Şekil 6.5: Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve kesilmemiş PCR ürünlerinin agaroz jel profili.

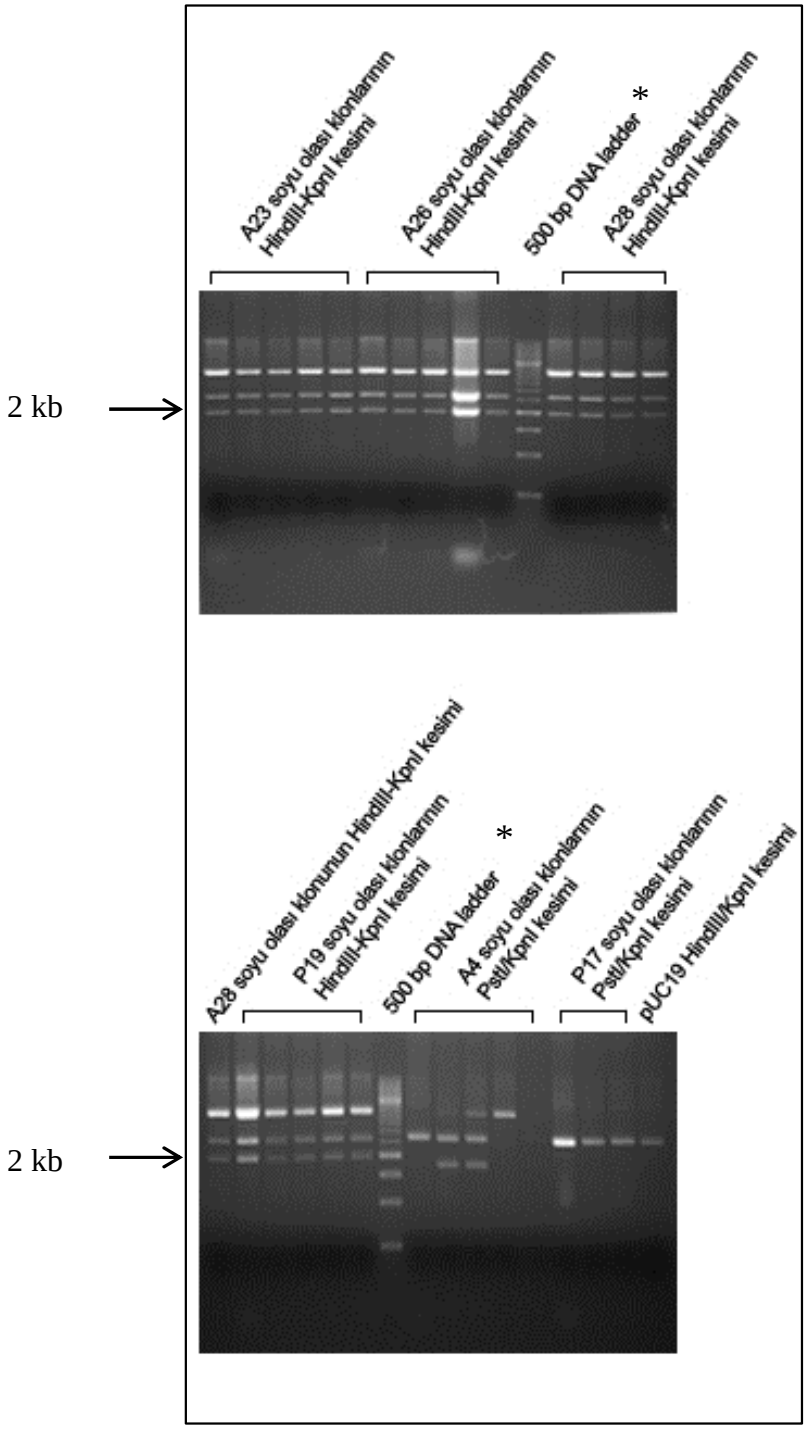


Şekil 6.6: Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve kesilmemiş PCR ürünlerinin agaroz jel profili.

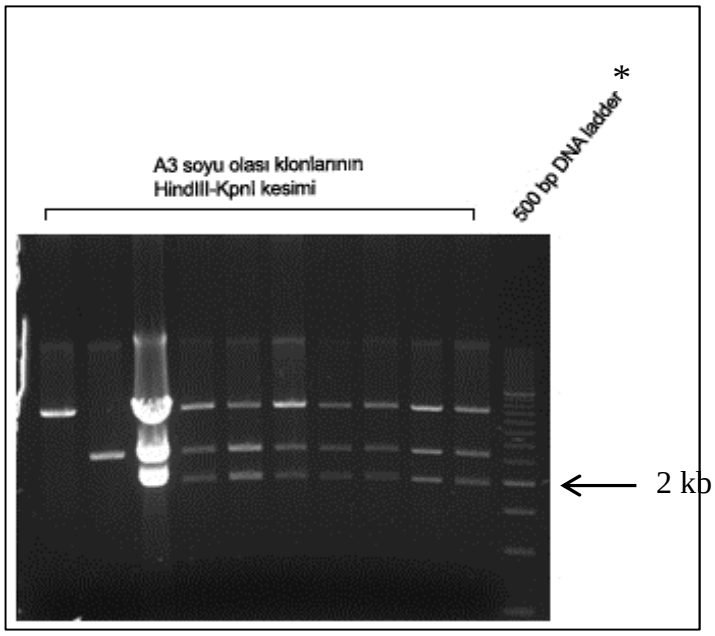
6.3. Genomdan PCR ile Doğrudan Klonlama

A3, A23, A26, A28, P19, A4 ve P17 soylarına ait genlerin genomdan hareketle PCR yöntemiyle klonlanmasına dair yeni bir yaklaşım denendi. Bir yanı pUC19' a tutunabilen diğer yanı ile genomdaki hedeflenen fragmanı çoğaltabilen primerler tasarlanarak sentez ettirildi. Bu aşamada birinci PCR'de genomdan ilgili fragmanlar çoğaltıldı. Bu fragmanlar jelden izole edilerek plazmitin bulunduğu ikinci bir PCR yapıldı. Bu PCR' lerden çıkan ürünler doğrudan *E. coli* JM109 hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonucu, A3, A23, A26, A28, P19 soyları için petri başına ortalama 150 koloni elde edildi. Buna karşın, A4 ve P17 soyları için transformasyon veriminin daha düşük olduğu (ortalama 20-30 koloni) gözlemlendi. Transformasyon sonucu elde edilen çok sayıda koloniden her soy için seçilen 5 tanesinden plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmitler ilgili enzimler ile kesilerek % 1 agaroz jelde A3, A23, A26, A28 ve P19 amilaz genleri için ~2 kb, A4 ve P17 soylarına ait amilaz genleri için ise ~1,7 kb büyüklüğünde bantların var olup olmadığı kontrol edildi. Buna göre P17 dışındaki tüm soylarda beklenen büyüklükte

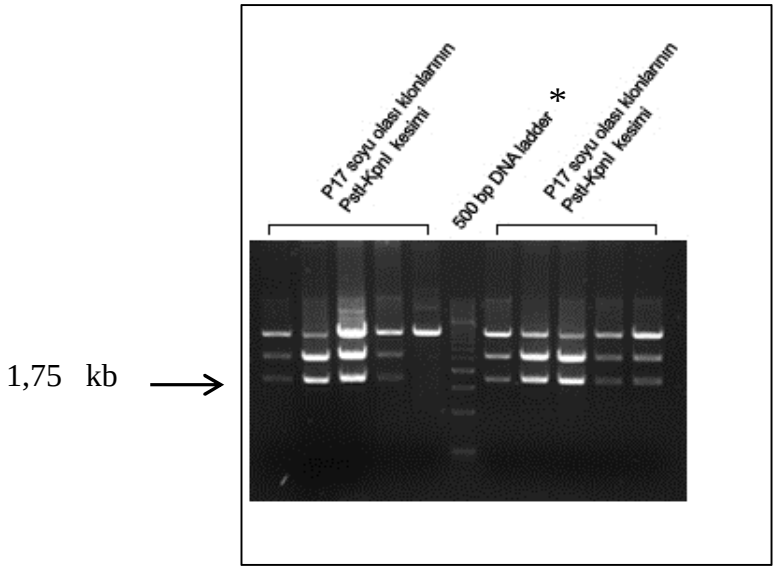
bantlar görüldü (Şekil 6.7 ve Şekil 6.8). P17 soyu için ise yeni bir PCR klonlama yapılarak bu soy için de “insert” içeren plazmitlerin bulunduğu koloniler belirlendi (Şekil 6.9). * 500 bp “DNA ladder”i (6000-5500-5000-4500-4000-3500-3000-2500-2000-1500-1000-500 bp) göstermektedir.



Şekil 6.7: PCR klonlama ile elde edilen kolonilerin plazmit izolasyonu sonrası çift enzim kesimi.



Şekil 6.8: A3 soyu α-amilaz geninin PCR eliyle pUC19'a klonlanması sonucu elde edilen plazmitlerin *Hind*III-*Kpn*I kesimi.



Şekil 6.9: P17 soyu amilaz geni için ikinci PCR klonlama denemesi ile elde edilen kolonilerin plazmit izolasyonu sonrası çift enzim (*Pst*I-*Kpn*I) kesimi.

6.4. PCR ile Yapılan Klonlamadan Elde Edilen Klonların Ekspresyon Çalışmaları

6.4.1. 3 ml Besi Yerinde Büyütülerek Yapılan Ekspresyon Çalışması

Elde edilen klonların α-amilaz üretip üretmediklerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle 3 ml % 1 nişasta içeren sıvı besi yerinde büyütülen kültürlerde hücre dışı enzim aktivitesi çalışıldı. Buna göre 0,1 mM IPTG ile uyarılan kültürlerden IPTG ile uyarım sonrası 5. saatte ve kültürün başlangıç saatinden 24 saat sonra örnek alınarak aktivite çalışması yapıldı. Paralel olarak her farklı gruptan bir örnek için uyarımsız örnek aynı koşullarda çalışıldı. Elde edilen klonların 3 ml besi yerinde yapılan ekspresyon çalışması sonuçları Tablo 6.2'de gösterilmektedir.

Tablo 6.2: Ligasyonsuz klonlama sonucunda elde edilen α-amilaz klon adayları ile 0,1 mM IPTG ile uyarımlı koşullarda 3 ml besi yerinde gerçekleştirilen ekspresyon çalışması sonucunda elde edilen hücre dışı enzimatik aktivite ve hücre büyümesi değerleri.

Klon Adı	Kültürün 10.saati (IPTG uyarımının 5. saati)		Kültürün 24.saati	
	OD600	Aktivite (U/ml)	OD600	Aktivite (U/ml)
A3/3	0,92	0,0	0,93	0,0
A3/7	1,03	2,3	1,08	17,9
A3/8	1,15	0,0	2,06	7,5
A3/9	1,13	13,3	1,12	35,0
A3/10	1,00	5,3	1,17	22,5
A23/1	1,08	10,9	1,07	34,0
A23/2	0,99	11,6	0,93	35,1
A23/3	1,03	13,8	0,91	35,9
A23/4	1,02	0,0	1,51	9,3
A23/5	0,96	15,5	0,96	40,2
A26/1	1,04	11,6	1,01	34,6
A26/2	1,03	13,4	0,96	35,0
A26/3	0,92	13,9	1,03	38,4
A26/4	1,02	12,0	1,03	35,7
A26/5	1,05	15,2	1,01	36,3
A28/1	0,79	21,6	0,9	43,9
A28/2	1,18	9,7	1,11	32,2
A28/3	1,21	10,3	1,11	33,1
A28/4	0,93	0,4	1,12	0,0
A28/5	0,82	0,7	0,94	0,0
P19/1	1,39	0,0	1,84	19,4
P19/2	1,3	6,5	1,43	31,0
P19/3	1	14,4	0,96	36,8
P19/4	1,08	13,3	1,02	36,0
P19/5	0,92	0,0	0,97	0,6
A4/2	1,17	0,0	1,42	0,0
A4/3	1,21	0,0	1,34	0,0
A3/7 K*	1,62	0,0	2,6	0,8
A23/2 K*	1,21	5,6	1,1	22,3
A26/2 K*	1,12	5,3	1,01	22,6
A28/2 K*	1,35	5,1	1,12	22,2
P19/2 K*	1,92	0,9	2,08	12,8
A4/2 K*	1,51	0,0	1,24	0,0

K*: IPTG ile uyarım yapılmayan örnek.

A4'ten türevlenen klonlarda hücre dışı enzim aktivitesinin olmadığı görüldüğünden, transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden miniprep kesimi sonrası uygun büyüklükte bant veren diğer örnekler (plazmit izolasyonu yapılan 10 koloniden 5'i enzim kesimine alınmış, iki tanesinde uygun büyüklükte bant görülmüştü. Kalan 5 plazmitin enzim kesimi sonrası uygun büyüklükte bant veren iki klonu bu kez aktivite testine alındı. Yanı sıra ikinci kez yapılan PCR klonlama sonucu elde edilen P17 soyu klonları da çalışmaya dahil edildi. Çalışma bir önceki ile aynı şartlarda yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 6.3'te gösterilmektedir.

Tablo 6.3: A4 ve P17 soylarının ligasyonsuz klonlama sonucunda elde edilen α-amilaz klon adayları ile 0,1 mM IPTG ile uyarımlı koşullarda 3 ml besi yerinde gerçekleştirilen ekspresyon çalışması sonucunda elde edilen hücre dışı enzimatik aktivite ve hücre büyümesi değerleri.

Klon Adı	IPTG 5. Saat (kültürün 10.saati)		Kültürün 24.saati	
	OD600	Aktivite (U/ml)	OD600	Aktivite (U/ml)
A4/8	1,23	0,0	1,31	0,1
A4/10	1,01	0,0	1,28	0,0
P17/11	1,22	0,0	1,74	0,0
P17/12	1,11	0,0	1,42	0,0
P17/13	1,14	0,0	1,56	0,0
P17/14	1,16	0,0	1,39	0,0
P17/16	1,02	0,0	1,27	0,0
P17/17	1,01	0,0	1,27	0,0
P17/18	1,15	0,0	1,35	0,0
P17/19	0,99	0,0	1,24	0,0
P17/20	1,19	0,0	1,34	0,0
A4/8 K*	1,21	0,0	1,40	0,0
P17/12 K*	1,26	0,0	1,44	0,0

K*: IPTG ile uyarım yapılmayan örnek.

A4 ve P17'den türevlenen klonlarda hücre dışı amilaz aktivitesi olmadığından, bu klonlarda hücre içi aktiviteye de bakıldı. Ancak her iki soyun klonlarında da hücre içi aktivitenin olmadığı görüldü.

6.4.2. 15 ml Besi Yerinde Yapılan Ekspresyon Çalışması

Her bir gup için tüpte yapılan çalışmada en yüksek aktiviteyi verenler ile daha büyük ölçekte yeni bir ekspresyon çalışması yapıldı. Buna göre % 1 nişasta içeren besi yerinde büyütülen örneklerden 0,1 mM IPTG ile uyarım sonrası 4 saatte bir örnek alınarak hücre büyümesi ve aktivite ölçüldü. Bir örnek (A28/1) için uyarımsız bir örneğin yanı sıra LB besi yerinde uyarımlı bir örnek de çalışmaya dahil edildi. Ekspresyon çalışmasının sonucunda elde edilen hücre dışı aktivite ve hücre yoğunluğu değerleri Tablo 6.4’te, hücre içi aktivite değerleri ise Tablo 6.5’te verilmektedir.

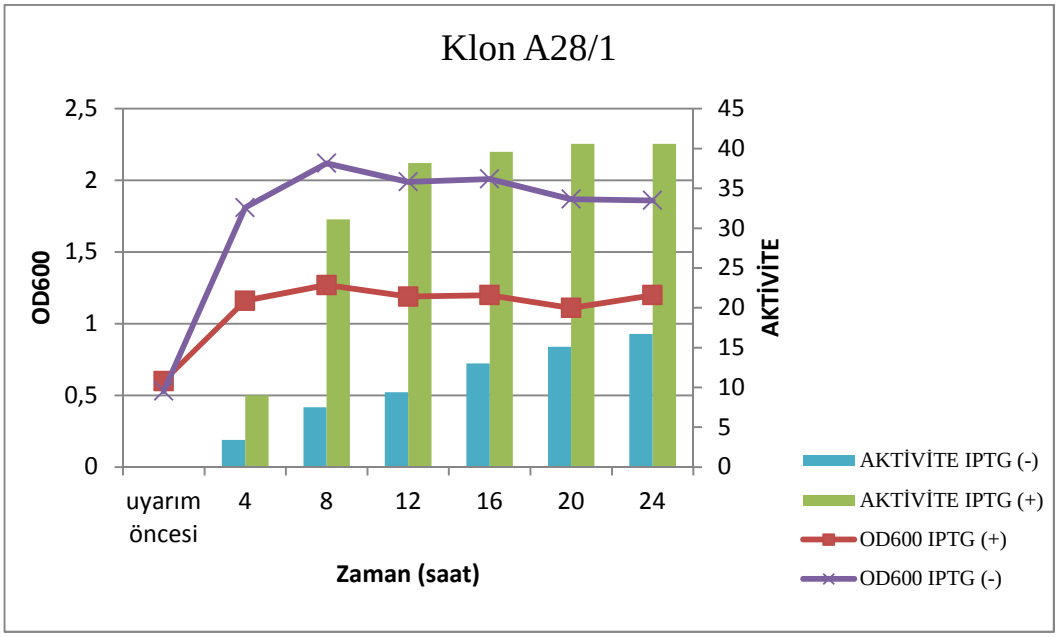
Tablo 6.4: α-amilaz klon adaylarıyla 15 ml besi yerinde 0,1 mM IPTG ile uyarımlı koşullarda yapılan ekspresyon çalışmasının sonucunda elde edilen hücre dışı aktivite ve hücre yoğunluğu değerleri.

Klon Adı	Uyarım öncesi		IPTG 4. saat		IPTG 8. saat		IPTG 12. Saat		IPTG 16. saat		IPTG 20. saat		IPTG 24. saat	
	OD600	Aktivite (U/ml)	OD600	Aktivite (U/ml)	OD600	Aktivite (U/ml)	OD600	Aktivite (U/ml)	OD600	Aktivite (U/ml)	OD600	Aktivite (U/ml)	OD600	Aktivite (U/ml)
A3/9	0,65	0,0	1,9	21,6	2,1	27,2	2,04	24,8	2,04	24,3	1,94	23,6	2,10	22,4
A4/8	0,635	0,0	1,15	0,3	1,26	0,0	1,21	0,0	1,25	0,0	1,24	0,0	1,25	0,0
A23/5	0,7	0,0	1,77	4,9	1,77	15,0	1,63	19,8	1,68	23,9	1,66	26,1	1,68	28,3
A26/3	0,597	0,0	1,31	7,9	1,27	25,4	1,31	32,8	1,32	36,6	1,34	36,4	1,23	38,5
A28/1	0,600	0,0	1,16	9,0	1,27	31,1	1,19	38,2	1,20	39,6	1,11	40,6	1,2	40,6
A28/1 cons.	0,530	0,0	1,81	3,4	2,12	7,5	1,99	9,4	20,1	13,0	1,87	15,1	1,86	16,7
A28/1LB	0,595	0,0	2,73	1,3	3,22	0,6	2,6	0,0	3,01	0,4	2,9	0,4	2,83	0,5
pUC19JM109	0,612	0,0	1,23	0,1	1,42	0,0	1,23	0,0	1,27	0,0	1,05	0,0	1,13	0,0
P17/12	0,605	0,0	1,17	0,0	1,32	0,0	1,28	0,0	1,21	0,0	1,26	0,0	1,08	0,0
P19/3	0,621	0,0	1,39	6,0	1,48	18,7	1,4	25,4	1,39	30,1	1,17	31,1	1,35	32,7

Tablo 6.5: α-amilaz klon adaylarıyla 15 ml besi yerinde 0,1 mM IPTG ile uyarımlı koşullarda yapılan ekspresyon çalışmasının sonucunda elde edilen hücre içi aktivite (U/ml) değerleri.

Klon Adı	Uyarım öncesi	IPTG 4. saat	IPTG 8. saat	IPTG 12. saat	IPTG 16. saat	IPTG 20. Saat	IPTG 24. saat
A4/8	0,2	1,3	1,2	1,3	1,6	1,4	1,4
P17/12	0,3	1,7	1,6	1,5	1,8	1,9	1,5

Yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda en yüksek hücre dışı α-amilaz aktivitesi gösteren rekombinant soy olan klon A28/1'e ait hücre yoğunluğu (OD_{600})-aktivite grafiği Şekil 6.10'da verilmiştir.



Şekil 6.10: Klon A28/1'in 15 ml besi yerinde yapılan ekspresyon ile elde edilen aktivite ve hücre yoğunluğu grafiği.

6.5. Klonların Dizi Analizi Sonuçları

Ekspresyon sonucu yüksek aktivite veren klonların α-amilaz genlerinin nükleotit dizileri belirlendi. Okunan nükleotit dizisi BLAST hızlı tarama programı kullanılarak veri tabanlarındaki bilinen diğer gen dizilimleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen BLAST sonuçları Tablo 6.6-6.12'de verilmiştir.

Tablo 6.6: A3 yerel soyundan elde edilen klonun (A3/9) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.

	Description	Query cover	E value	Max İdent	Accession
1	Bacillus subtilis strain xm-1 alpha-amylase (amyA) gene, complete cds	96%	0.0	98%	GQ153530.1
2	Bacillus subtilis gene amyEn+ for N-type alpha-amylase	88%	0.0	98%	X02150.1
3	B.subtilis alpha-amylase gene, complete cds	82%	0.0	99%	M79444.1
4	Bacillus subtilis 2633 gene for alpha-amylase	82%	0.0	99%	X07796.1
5	Bacillus subtilis strain KCC103 alpha-amylase (amyE) gene, complete cds	72%	0.0	99%	EU184860.1

Tablo 6.7: A23 yerel soyundan elde edilen klonun (A23/5) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.

	Description	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Bacillus subtilis strain A28 alpha-amylase gene, complete cds	96%	0.0	98%	JX163316.1
2	Bacillus subtilis strain FS321 alpha-amylase gene, complete cds	96%	0.0	97%	EU195860.1
3	Bacillus subtilis strain I527 amylase gene, complete cds	96%	0.0	96%	GU979529.1
4	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. BSP1, complete genome	96%	0.0	96%	CP003695.1
5	Bacillus subtilis strain HLSSK-3 amylase gene, complete cds	96%	0.0	96%	GU979525.1

Tablo 6.8: A26 yerel soyundan elde edilen klonun (A26/3) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.

	Description	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Bacillus subtilis strain A28 alpha-amylase gene, complete cds	93%	0.0	98%	JX163316.1
2	Bacillus subtilis strain FS321 alpha-amylase gene, complete cds	96%	0.0	97%	EU195860.1
3	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. BSP1, complete genome	93%	0.0	97%	CP003695.1
4	Bacillus subtilis strain HLSSK-3 amylase gene, complete cds	93%	0.0	97%	GU979525.1
5	Bacillus subtilis strain I527 amylase gene, complete cds	96%	0.0	96%	GU979529.1

Tablo 6.9: A28 yerel soyundan elde edilen klonun (A28/1) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.

	Description	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Bacillus subtilis strain FS321 alpha-amylase gene, complete cds	99%	0.0	98%	EU195860.1
2	Bacillus subtilis strain HLSSK-3 amylase gene, complete cds	99%	0.0	98%	GU979525.1
3	Bacillus subtilis strain I527 amylase gene, complete cds	99%	0.0	98%	GU979529.1
4	Bacillus subtilis strain HA401 alpha-amylase protein gene, complete cds	99%	0.0	98%	AY594351.1
5	Bacillus sp. HYC-1-3 amylase gene, complete cds	99%	0.0	98%	GU979526.1

Tablo 6.10: P19 yerel soyundan elde edilen klonun (P19/3) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.

	Description	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Bacillus subtilis strain A28 alpha-amylase gene, complete cds	93%	0.0	98%	JX163316.1
2	Bacillus subtilis strain FS321 alpha-amylase gene, complete cds	93%	0.0	97%	EU195860.1
3	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. BSP1, complete genome	93%	0.0	97%	CP003695.1
4	Bacillus subtilis strain HLSSK-3 amylase gene, complete cds	93%	0.0	97%	GU979525.1
5	Bacillus subtilis strain I527 amylase gene, complete cds	93%	0.0	97%	GU979529.1

Tablo 6.11: A4 yerel soyundan elde edilen klonun (A4/8) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.

	Description	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome	98%	0.0	96%	AE017355.1
2	Bacillus anthracis str. A0248, complete genome	98%	0.0	95%	CP001598.1
3	Bacillus anthracis str. CDC 684, complete genome	98%	0.0	95%	CP001215.1
4	Bacillus cereus AH820, complete genome	98%	0.0	95%	CP001283.1
5	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome	98%	0.0	95%	AE017334.2

Tablo 6.12: P17 yerel soyundan elde edilen klonun (P17/12) taşıdığı fragmanın benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu.

	Description	Query cover	E value	Max ident	Accession
1	Bacillus anthracis str. A0248, complete genome	98%	0.0	99%	CP001598.1
2	Bacillus anthracis str. CDC 684, complete genome	98%	0.0	99%	CP001215.1
3	Bacillus cereus AH820, complete genome	98%	0.0	99%	CP001283.1
4	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome	98%	0.0	99%	AE017334.2
5	Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome	98%	0.0	99%	AE017225.1

Yapılan ekspresyon sonucu, en yüksek hücre dışı enzimatik aktiviteye sahip olduğu görülen A28-1 klonu ***"amy*28"** olarak adlandırıldı. Bu klona ait α-amilaz gen dizilimi, kaynak mikroorganizma olan *Bacillus subtilis* A28 soyunun α-amilaz genini temsil ettiğinden, bu dizilim GenBank veri tabanına JX163316 giriş numarası ile depo edildi.

- >gi|401884723|gb|JX163316.1| Bacillus subtilis strain A28 alpha-amylase gene, complete cds

ATGTTTGCAAAACGATTCAAAACCTCTTTACTGCCGTTATTCGCTGGATTT
TTATTGCTGTTTCATTTGGTTCTGGCAGGACCGGCGGCTGCGAGTGCTGA
AACGGCGAACAAATCGAATGAGCTTACAGCACCGTCGATCAAAAGCGGA
ACCATTCTTCATGCATGGAATTGGTCGTTCAATACGTTAAAACATAATAT
GAAAGATATTCATGATGCAAGATATACAGCCATTCAGACATCTCCGATTA
ACCAAGTAAAGGAAGGGAACCAAAGAAATAAAAGCATGTCGAACTGGT
ACTGGCTCTATCAGCCGACATCGTACCAAATTGGCAACCGTTACTTAAGA
ACTGAACAAGAATTTAAAGAAATGTGTGCAGCCGCTGAAGAATATGGCA
TAAAGGTCATTGTTGACGCCGTCATCAATCATACCACCAGTGACTATGCA
GCGATTTCCAATGAAATTAAGAGTATTCCAAACTGGACACATGGAAACA
CACAAATTAAAAACTGGTCTGATCGATGGGATGTCACGCAGAATTCATTG
CTCGGGCTGTATGACTGGAATACACAAAATACACAAGTACAGTCCTATCT
GAAACGGTTCTTAGAAAGAGCATTGAATGACGGGGCAGATGGATTTCGC
TTTGATGCCGCCAAACATATAGAGCTTCCGGATGATGGCAGTTACGGCAG

TCAATTTTGGCCGAATATCACAAATACAGCTGCAGAGTTCCAATACGGAG
AAATCCTGCAAGATAGTGCCTCCAGAGATGCTTCATATGCGAATTATATG
AATGTGACAGCGTCTAACTATGGGCATTCCATAAGGTCCGCTTTAAAGAA
TCGCAATCTGGGCGTGTCGAATATCTCCCACTATGCATCTGATGTGTCTG
CGGACAAGCTAGTGACATGGGTGGAGTCGCATGATACGTATGCCAATGA
TGATGAAGAGTCGACATGGATGAGCGATGATGATATCCGTTTAGGCTGG
GCGGTGATAGCTTCTCGTTCAGGCAGTACGCCTCTTTTCTTTTCCAGGCCT
GAGGGAGGCGGAAATGGTGTGAGATTCCCGGGGAAAAGCCAAATAGGC
GATCGCGGGAGTGCTTTATTTGAAGATCAGGCTATCACTGCGGTCAATAG
ATTTCACAATGTGATGGCAGGACAGCCTGAGGAACTCTCGAACCCAAAT
GGAAACAACCAGATATTTATGAATCAGCGCGGCTCACATGGCGTTGTGCT
GGCAAATGCAGGTTCATCCTCTGTTTCTATCAATACGCCAACAAAATTGC
CTGATGGCAGATATGACAATAAAGCTGGGGGCAGGTTTCATTTTCAAGTG
AATGATGGTAAACTGACAGGCACGATCAATGCCAGGTCTGTGGCTGTGCT
TTATCCTGATGATATTGCAAAAGCGCCTCATGTTTTTCTTGAGAATTACAA
AACAGGTGTAACACATTCTTTCAATGATCAACTGACGATTACCTTGCGTG
CAGATGCGAATACAACAAAAGCCGTTTATCAAATCAATAATGGACCAGA
GACGGCGTTTAAGGATGGAGATCAATTCACAATCGGAAAAGGAGATCCA
TTTGGCAAAACATACACCATCATGTTAAAAGGAACGAACAGTGATGGTA
TAACGAGGGCCGAGGAATACAGTTTTGTTAAAAGAGATCCAGCTTCGGC
CAAAACCATCGGCTATCAAAATCCGAATCATTGGAGCCAGGTAAATGCTT
ATATCTATAAACATGATGGGAGCCGGGCAATTGAATTGACCGGATCTTGG
CCTGGAAAACCAATGACTAAAAATGCAGACGGAATTTACACGCTGACGC
TGCCTGCGGATACGGATACAACCAACGCCAAAGTGATTTTTAATAATGGC
AGCGCCCAGGTGCCCGGCCAGAATCAGCCTGGCTTTGATTACGTGCAAA
ATGGTTTATATAATGACTCGGGCTTAAGCGGTTCTCTTCCCTAA

6.6. *amy*28 α-Amilazının Saflaştırılması

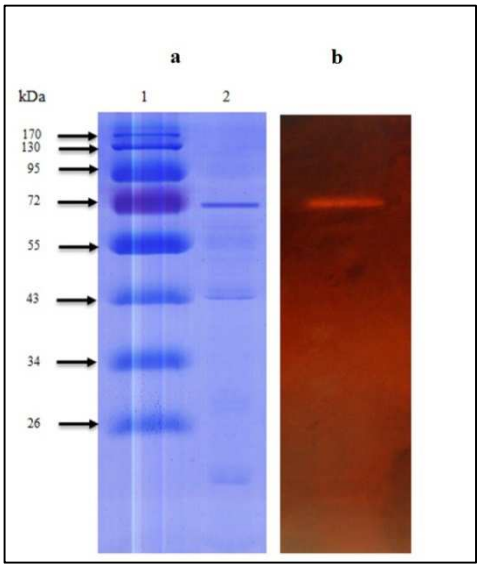
Rekombinant *amy*28 amilazı, kültür üst sıvısından 3 basamaklı saflaştırma kullanılarak saflaştırıldı. Buna göre, filtrelenmiş kültür üst sıvısı % 80 amonyum sülfat ile çöktürüldükten sonra rekombinant enzim, ilk olarak Q-Sepharose iyon

değişim kromatografisi, ardından da jel filtrasyon ile % 22.5 verimle 16.36 kat saflaştırıldı. Saflaştırma sonuçları Tablo 6.13'te yer almaktadır.

Tablo 6.13: *amy*28 α-amilazının saflaştırılması.

	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı	Verim (%)
Kültür üst sıvısı	15717	91	172	1.00	100
$(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi	6052	30	196	1.14	38.51
İyon değişim kromatografisi (Q-Sepharose)	4466	2.8	1624	9.44	28.42
Jel filtrasyon kromatografisi (Sephacryl S-100)	3534	1.26	2814	16.36	22.49

Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlendi. Buna göre beklenen büyüklük olan 73 kDa ile uyumlu bir bandın var olduğu görüldü. Paralel olarak yapılan zimogram analizinde bu bant ile uyumlu büyüklükte tek bir bandın nişasta hidrolizini gerçekleştirdiği görüldü ve bu sonuçlara dayanılarak ~73 kDa ağırlığındaki bandın α-amilaz olduğu sonucuna varıldı (Şekil 6.11).

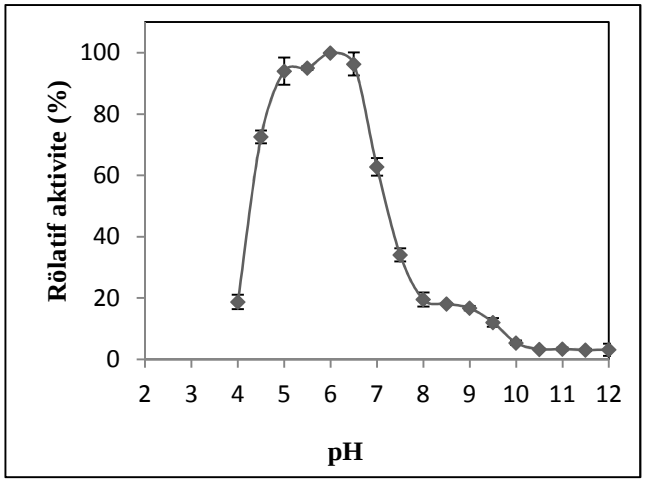


Şekil 6.11: a) SDS-PAGE görüntüsü. Kuyu1. Protein uzunluk belirteci, kuyu2. Jel filtrasyonu sonrası oluşturulan enzim havuzu, b) Enzim havuzunun zimogram görüntüsü.

6.7. *amy*28 α-Amilazının Nitelendirilmesi

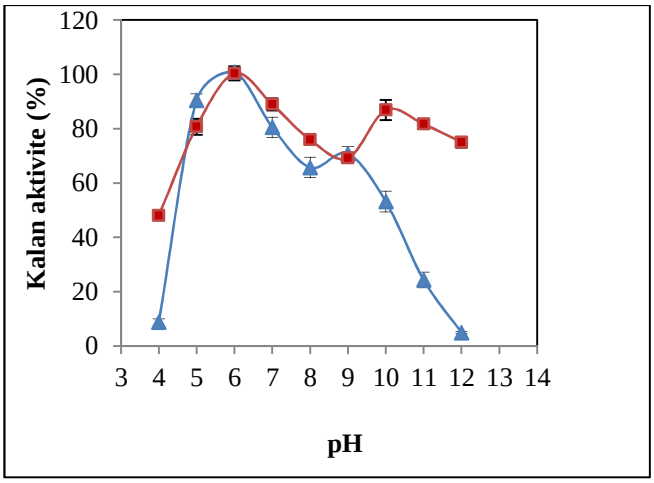
6.7.1. pH'nın Rekombinant Enzimin Aktivite ve Kararlılığına Etkisi

Rekombinant enzimin optimal pH'sı farklı pH'larda (pH 4.0-11.0) hazırlanan tamponlarda enzimatik aktivite testi yapılarak belirlendi. Rekombinant enzimin optimal pH'sının 6 olduğu ve asidik pH aralıklarında daha aktif olduğu görüldü (Şekil 6.12). pH 5.0 ve 5.5 'te rölatif aktivite sırasıyla % 94 ve % 95 olarak bulunurken, pH 4.5'ta % 72'ye düştüğü belirlendi. Bu aşamadan sonraki bütün nitelendirme çalışmaları, enzimin optimal pH'sı olan pH 6.0'da gerçekleştirildi.



Şekil 6.12: *amy*28 α-amilazının optimal pH grafiği. Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

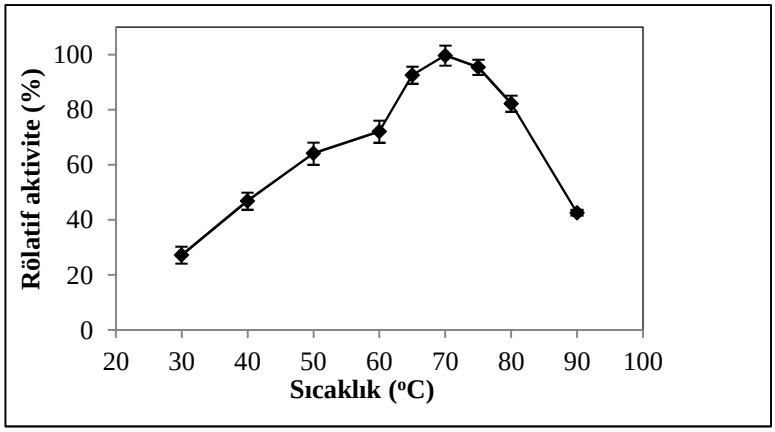
pH kararlılığının belirlenmesi amacıyla, α-amilaz enzim preparasyonu, farklı pH'lardaki (4.0-12.0) tamponlarda 50 ^{o}C'ta 1 saat, 4 ^{o}C'ta 24 saat olmak üzere iki farklı koşulda bekletildi. Süre sonunda uygulanan standart aktivite testi ile alınan sonuçlar *amy*28 α-amilazının özellikle ılımlı asidik pH'larda kararlı olduğunu gösterdi (Şekil 6.13). pH 6.0'da enzimatik aktivitede düşüş olmazken, pH 4.0 ve 9.0 aralığında aktivitenin % 80'ninin korunduğu görüldü. 50°C'ta yapılan denemede, pH10 ve daha yüksek pH değerlerinde enzimin kararlılığında çarpıcı bir düşüş gözlendi. pH4.0 ve 12'de ise başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamının kaybolduğu belirlendi.



Şekil 6.13: 4 ^{o}C (■) ve 50 ^{o}C (▲)'ta pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkisi. Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

6.7.2. Sıcaklığın Rekombinant α- Amilaza Etkisi

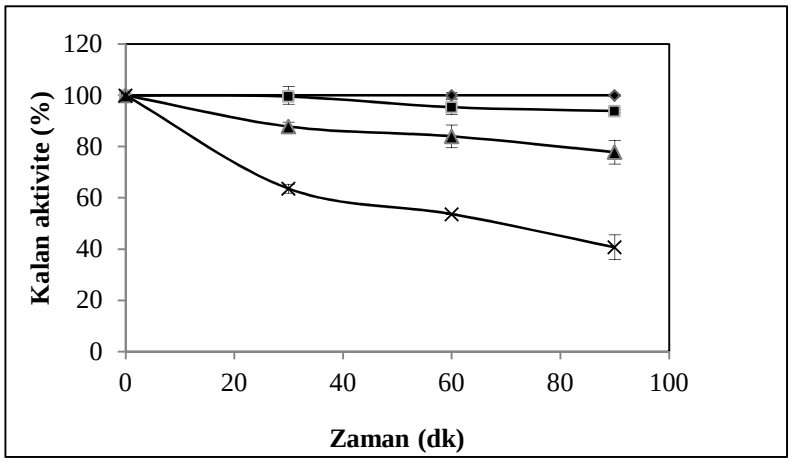
Standart enzimatik aktivite testinde yapılan 3 dk.lık inkübasyon süresi 30 ^{o}C-90 ^{o}C arası sıcaklıklarda yapılarak gerçekleştirilen optimal sıcaklık belirleme çalışmaları sonucunda, *amy*28 α-amilazının optimal sıcaklığının 70 ^{o}C olduğu belirlendi. Yanı sıra, enzimin 65-75 ^{o}C sıcaklık aralığında yüksek aktivite gösterdiği, 80 ^{o}C ve üstü sıcaklıklarda ise enzimatik aktivitede belirgin bir azalma olduğu görüldü (Şekil 6.14).



Şekil 6.14: *amy*28 α-amilazının optimal sıcaklık grafiği. Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

Rekombinant enzimin sıcaklık kararlılığı 50-80 ^{o}C sıcaklık aralığında bekletilen enzim preparasyonundan farklı zamanlarda alınan örneklerin aktivitesi

ölçülerek belirlendi. 4 ^{o}C'ta bekletilen enzimin aktivitesinin % 100 kabul edildiği değerlendirmeye göre, 50 ^{o}C'ta enzimin aktivitesinde 90 dakika sonunda azalma görülmedi (Şekil 6.15). 60 ^{o}C'ta 30 dakika sonunda % 100 olan aktivitenin, yine aynı sıcaklıkta 60 ve 90 dakika sonunda sırasıyla % 95 ve % 94'ünü koruduğu belirlendi.70 ^{o}C'ta da oldukça kararlı (90 dakika sonunda kalan aktivite değeri %78) olduğu görülen enzimin, 80°C'taki kararlılığının görece kısa süreli olduğu, bu sıcaklıkta, 30 dakika sonunda enzimatik aktivitenin ancak % 60'ını koruduğu gözlemlendi.



Şekil 6.15: 50°C (eşkenar dörtgen), 60°C (kare), 70°C (üçgen dolgu) ve 80°C'ta (çarpı) sıcaklığın *amy*28 α-amilazının kararlılığına etkisi. Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

6.7.3. Metal İyonlarının ve Amonyum Tuzlarının Rekombinant α-Amilaz Üzerindeki Etkisi

Metal iyonlarının α-amilazın üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla 17 çeşit metal ve amonyum tuzu 10 mM konsantrasyonda reaksiyon karışımına eklendi. Hiç tuz içermeyen tüpün % 100 olarak kabul edildiği çalışmada alınan sonuçlar bu değere göre hesaplandı (Tablo 6.14). Buna göre, aktivitenin $(NH_4)_2Ac$ ve KCl eklendiğinde arttığı gözlendi. Ba^{2+}, Ca^{2+}, $(NH_4)_2SO_4$, Li^{2+}, Mg^{2+} ve Na^{+} iyonlarının 10 mM konsantrasyonda enzimin aktivitesi üzerinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığı, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} ve Zn^{2+} iyonlarının amilaz aktivitesini tamamen inhibe ettiği gözlendi. Co^{2+}, Ni^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının enzimatik aktiveyi oldukça indirgediği (% 77-% 36) belirlendi.

Tablo 6.14: Metal iyonlarının *amy*28 α-amilazına etkisi.

Metal iyonları ve amonyum tuzları (10 mM)	Kalan Aktivite (%)
$BaCl_2$	95 ± 1.6 (NS)
$CaCl_2$	97 ± 0.3 (NS)
$CoCl_2$	36 ± 2.3 *
$CuCl_2$	0.14 ± 0.2 *
$FeCl_2$	0 ± 0 *
$FeCl_3$	0 ± 0 *
$FeSO_4$	0.5 ± 0.7 *
KCl	115 ± 0.6 *
$LiCl_2$	108 ± 2.4 *
$MgCl_2$	102 ± 1.7 (NS)
$MnCl_2$	77 ± 1.4*
NaCl	102 ± 3.2 (NS)
$NiCl_2$	45 ± 1.4 *
$ZnCl_2$	0 ± 0 *
$ZnSO_4$	0.2 ± 0.3 *
NH_4Ac	112 ± 2.0 *
$(NH_4)_2SO_4$	105 ± 0.3 *
Control	100 ± 0.3

*: İstatistiksel olarak anlamlı değer, NS: İstatistiksel olarak anlamlı olmayan değer.

6.7.4. Deterjanların α-Amilaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Deterjanların enzimatik aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla % 0.1 ve % 1'lik final konsantrasyonda çeşitli deterjanlar enzim preparasyonuna eklenerek aktivite ölçümü yapıldı. Deterjan eklenmeyen kontrol tüpüne görece hesaplanan % oranlarına bakılarak genel olarak, iyonik deterjanların enzimatik aktiviteyi inhibe ettiği, iyonik olmayanların inhibisyonunun ise daha az olduğu gözlemlendi (Tablo 6.15). SDS'nin % 0,1 ve % 1'lik oranlarının her ikisinin de enzimi neredeyse tamamen inhibe ettiği belirlendi.

Tablo 6.15: Deterjanların *amy*28 α-amilazına etkisi.

Deterjan	Kalan Aktivite (%)
% 0.1 CTAB	48 ± 2.8 *
% 1 CTAB	14 ± 2.7 *
% 0.1 Na-deox	74 ± 3.2 *
% 1Na-deox	43 ± 0.8 *
% 0.1 Tween80	95 ± 3.9 *
% 1 Tween80	87 ± 3.1 *
% 0.1 Triton X-100	90 ± 1.8 *
% 1 Triton X-100	88 ± 3.9 *
% 0.1 SDS	3 ± 2.7 *
% 1 SDS	12 ± 3.8 *
% 0.1 Tween20	84 ± 2.6 *
% 1 Tween20	82 ± 0.6 *
Control	100 ± 1.9

*: İstatistiksel olarak anlamlı değer.

6.7.5. Çeşitli Kimyasal Ajanların Enzimin Kararlılığı Üzerine Etkisi

Gliserol, etilen glikol ve DMSO'nun % 30'luk konsantrasyonda rekombinant amilaz üzerinde benzer etkisi olduğu belirlendi (Tablo 6.16). Yine aynı kimyasal ajanların % 10'luk konsantrasyonlarının aktiviteyi % 33-40 oranında azalttığı, PMSF ve EDTA'nın 10 mM konsantrasyonlarının ise aktiviteyi oldukça inhibe ettiği gözlendi. 2-Merkapto etanolün ise enzimin kararlılığını % 30-35 oranında arttırdığı belirlendi.

Tablo 6.16: Çeşitli kimyasal ajanların amy28 α-amilazının kararlılığına etkisi.

Kimyasal Ajanlar	Kalan Aktivite (%)
% 10 gliserol	80 ± 1.2 *
% 30 gliserol	67 ± 3.0 *
% 10 EG	87 ± 2.8 *
% 30 EG	65 ± 3.8 *
% 10 DMSO	96 ± 2.0 *
% 30 DMSO	60 ± 2.0 *
1 mM EDTA	95 ± 0.9 *
5 mM EDTA	85 ± 1.2 *
10 mM EDTA	74 ± 2.9 *
10 mM PMSF	65 ± 1.0 *
10 mM β-ME	131 ± 3.6 *
Control	100 ± 0.4 *

*: İstatistiksel olarak anlamlı değer.

6.7.6. *amy*28 α-amilazının % 1 konsantrasyondaki substratlar ile aktivitesinin belirlenmesi

*amy*28 α-amilazın % 1 konsantrasyonda çeşitli substratlara olan ilgisi belirlenerek göreceli aktivite değerleri tespit edildi. Ölçülen değerlerde en yüksek aktivite alınan patates nişastası % 100 kabul edilerek göreceli aktivite değerleri hesaplandı (Tablo 6.17). Buna göre patates nişastasından sonra enzim sırasıyla maltodekstrin, buğday nişastası, mısır nişastası, amilopektin ve amilozu substrat olarak tercih etmektedir. Halkasal glukoz ünitelerinden oluşan α- ve β-siklodekstrin ile maltoz ve α-1,6 bağlı glukoz ünitelerinden oluşan pullulan üzerinde enzimin aktivitesinin olmadığı belirlendi. Dekstranın ise bu enzim tarafından az da olsa (% 1-2) substrat olarak kullanılabildiği gözlendi.

Tablo 6.17: *amy*28 α-amilazının % 1 konsantrasyondaki substratlara göreceli aktivitesi.

Substrat	Bağ/monomer	Göreceli Aktivite (%)
Amiloz	α-1,4 / glukoz	54 ± 2.9
Amilopektin	α-1,4+ α-1,6 / glukoz	61 ± 2.6
Mısır nişastası	α-1,4+ α-1,6 / glukoz	68 ± 1.0
Patates nişastası	α-1,4+ α-1,6 / glukoz	100 ± 0.8
Buğday nişastası	α-1,4+ α-1,6 / glukoz	65 ± 3.5
Maltoz	α-1,4 / iki glukoz	0 ± 0.0
Maltodekstrin	α-1,4 / glukoz	83 ± 2.1
Dextran	α-1,6 / glukoz	1 ± 1.1
α-CD	α-1,4 /halkasal glukoz	0 ± 0.0
β-CD	α-1,4/ halkasal glukoz	0 ± 0.2
Pullulan	α-1,6 / glukoz	0 ± 0.2

7. TARTIŞMA

Dünya endüstriyel enzim pazarının 2,7 milyar dolar olduğu ve 2012'de yıllık % 4 artış gösterdiği bilinmektedir. Deterjan (% 37), tekstil (% 12), nişasta (% 11), fırıncılık (% 8) ve havyan yemi üretimi (% 6) enzimlerin kullanıldığı temel endüstriyel alanlardır [Harwood, 1992], [Ferrari et al,. 1993], [Schallmey et al,. 2004], [Das et al., 2011]. α-Amilazlar en önemli endüstriyel enzimler arasında yer almakta ve pazarın yaklaşık % 25-30'unu oluşturmaktadır [Deb et al., 2013], [Azad et al,. 2009], [Rajagopalan and Krishnan, 2008].

Kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan araştırmalar önem taşımaktadır. Endüstriyel biyoteknolojiyi etkin şekilde kullanan birkaç ülke dışında kalan ülkelerde tümüyle dışa bağımlılık söz konusu olduğundan bu konu daha da önemli duruma gelmektedir.

Endüstriyel enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalarla çalışma koşullarının daha uygun olması, kolay manipüle edilebilmeleri, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı olanlara görece fazla miktarda ve daha ekonomik elde edilebilmeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları endüstride tercih edilmelerinin başlıca nedenlerindendir. Endüstriyel uygulamalardaki zorlu koşullarda çalışabilen ve bu koşullara daha uzun süre dayanabilen enzimlerin bulunabilmesi için araştırıcılar uzun yıllardır farklı mikroorganizmalara ulaşmak üzere çalışmaktadır. Bu mikroorganizmaların yaban tipteki genlerinin, uygun ekspresyon vektörleri aracılığıyla manipülasyonları kolay konakçı sistemlere aktarılması ve enzim üretiminin optimizasyonu uzun yıllardır çalışılan bir daldır.

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda doğada bulunan mikroorganizma çeşitlerinin ancak % 1-5'i saptanabilmiştir. Bu oran *Bacillus*lar için de geçerli olabilir. *Bacillus*lar uç koşullarda yaşayabilme ve hücre dışı enzim salgılayabilme özelliklerinden dolayı biyoteknolojik uygulamaların başlıca odak noktaları arasında yer alırlar [Sneath, 1986].

Bacillus cinsi, içlerinde endüstriyel önemi büyük olan enzimleri de bulunduran birçok hücre dışı enzim üretir. Endüstriyel süreçlerde kullanılmak üzere büyük çapta amilaz üreten soylar geliştirilmiştir. Çünkü yaban tipte bir soyun her zaman istenen

nitelikte enzim üretmesi olası değildir. Böylece istenen özellikte amilazı sentezleyen genin iyi karakterize edilmiş *E. coli* gibi bir konakçıya klonlanması yeni amilazların karakterizasyonu ve büyük miktarlarda üretimine büyük katkıda bulunacaktır [Özcan ve Altınalan, 2001].

Doktora tez projesi kapsamında, Grubumuz tarafından yerel kaynaklardan izole edilerek morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tiplendirme yöntemleri ile tanımlanmış, hücre dışı α-amilaz üreticisi oldukları belirlenmiş 11 *Bacillus* soyunun ilgili genlerinin klonlanması, gen dizilimlerinin belirlenmesi, klonların α-amilaz ekspresyonu ve seçilen bir soyun α-amilazının saflaştırılarak nitelendirilmesi hedeflenmiş ve bu doğrultuda çalışmalar yapılmıştır.

Tez projesi kapsamında tutulan 8 α-amilaz üreticisi soyun PCR ile çoğaltılan fragmanları jelden izole edilerek, pUC19 vektörü üzerine klonlanması için çok sayıda yapışkan uçlu klonlama denemesi yapılmıştır. Farklı insert/fragman molar oranları, tekrarlanan PCR ve jelden izolasyon basamaklarının, yenilenen vektör-fragman restriksiyon kesimlerinin uygulandığı süreçler sonucunda 8 α-amilaz PCR fragmanının hiçbirinde yapışkan uçlu klonlama başarılamamıştır.

PCR temelli bir yöntemle tek bir basamakta çoğaltılmış genlerin istenilen bir plazmit vektöre ligaz enzimi olmaksızın klonlanması henüz çok yeni bir klonlama yaklaşımıdır. Tez çalışmasında da ilk denemelerde tercih ettiğimiz yapışkan uçlu klonlama, PCR ürünlerinin klonlanmasında birçok laboratuvarda olduğu üzere laboratuvarımızda da rutin olarak kullanılmaktadır. Ancak bu çalışmaların ve TA klonlamanın Bacillus α-amilaz genlerinde istenilen şekilde sonuçlanmaması bizi, 1990lı yılların başından itibaren kullanılmakta olan ligasyon bağımlı olmayan yöntemlerin denenmesi sürecine yöneltmiştir.

An ve arkadaşları (2010) ligasyon basamağı olmaksızın tek bir PCR ile klonlama yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, kullandıkları plazmit olan pUC19 ve *sam*1 ve *sam*2 genlerine birlikte tutunabilen ileri ve geri primer tasarlamışlar ve düşük primer konsantrasyonunda tek bir PCR basamağı ile klonlama yapmışlardır [An et al., 2010]. Bu doğrultuda yerel *Bacillus* soylarının α-amilaz genleri, An ve arkadaşlarından uyarlanan yöntem kullanılarak ve bu vektöre özgü modifiye primerler tasarlanıp sentez ettirilerek denenmiş, *E.coli JM109* kompetan hücreleri, elde edilen PCR ürününü taşıyan pUC19 ile transforme edilmiştir.

Her bir soy için transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden rastgele 10 tanesi seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmitlerin çift enzim kesimine uğratılması sonucu seçilen soyların α-amilazları için uygun büyüklükte bantlar elde edilmiştir. Aynı klonlarla yapılan ilk ekspresyon çalışmalarında hücre dışı amilaz aktivitesinin varlığı DNS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Ligaz-bağımlı olmayan klonlama (LIC), ilk olarak 1990 yılında yayınlanmış iki çalışma ile gerçekleştirilmiş ve son yıllarda artan sayıda uygulama yapılmıştır. Yüksek etkinlikte olması, vektörün kendi üzerine kapanma olasılığının az olması, restriksiyon kesimine ihtiyaç duymaması bu tür klonlamanın en önemli avantajlarındandır. Ayrıca, bu uygulama bilinmeyen dizilerin klon kütüphanelerinin oluşumuna da olanak sağlar [Thieme et al., 2011], [Li and Evans, 1997].

LIC ile yapılan çalışmalardan ilkinde, Shuldiner ve arkadaşları (1990), 3 farklı PCR fragmanını pGem4Z vektörüne ligaz kullanılmayan bir yöntemle başarılı bir şekilde klonlamışlardır. Yöntem, 5’- ucunda 24 nükleotit uzunluğunda kuyruk içeren PCR amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu kuyrukların vektörün 3’-ucuna tamamlayıcı özellikte olmasından yararlanarak klonlama başarılabilmiştir. Bu yöntem ilave denaturasyon ve renaturasyon basamaklarını içerir. İkinci yöntemde ise, Aslanidis ve Jong (1990), “insert” DNA’yı 12 nükleotit uzunluğundaki 5’- kuyrukla çoğaltmışlardır. Bu kuyruklar dCP yoksunu olduğundan amplikon 3’-ucunda dGMP yoksunudur. Sonrasında bu 3’-uçlar T4 DNA polimerazın 3’-5’ ekzonükleaz aktivitesi ile ortadan kaldırılır.

Sonraki bir çalışmada enzimsiz klonlama (EFC), PCR ürünlerinin alt klonlaması için kullanılmıştır. [Jong et al., 2006]. Bu yöntemin klonlama etkinliği önceki çalışmalardan yüksek olsa da, maliyetin oldukça yüksek olması dezavantajıdır.

An ve arkadaşlarının yönlendirilmiş evrim yaklaşımına yönelik yaptıkları çalışmada, önceden de belirtildiği gibi, pUC19 üzerinde bulunan iki gen bu vektöre tutunabilen primer çifti ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri jelden izole edilmiş, DNA karıştırma için DNazI kesimine uğratılmış, “reassembling PCR”, ardından bu primerlerin de bulunduğu ikinci PCR sonrası elde edilen ürünle doğrudan transformasyon yapılmış ve varyantlar elde edilmiştir.

An ve arkadaşlarının çalışmasının modifiye edilmiş bir şekli ile klonlanamayan amilaz genleri genomdan hareketle iki PCR basamağı ile pUC19 vektörüne klonlanabilmiştir. Söz konusu çalışmada, plazmit üzerindeki bir gen, pUC19’a

tutunabilen primerler ile çoğaltılabiliyorken, bizim çalışmamız genomda bulunan amilaz genlerini başında ve sonunda pUC19 vektörüne tutunabilecek kuyruk taşıyan fragmanlar halinde çoğaltabilmemizi sağlamış ve PCR ile doğrudan klonlamayı mümkün kılmıştır. Ayrıca klonlama PCR'si olan ikinci reaksiyonda, An ve arkadaşlarından farklı olarak primer kullanılmamış, birinci PCR ürününde yer alan kuyruk kısımlarının ikinci PCR için primer görevi görmesi sağlanmıştır.

Elde edilen PCR ürünü ile *E. coli* hücreleri ilave bir işlem uygulanmadan transforme edilmiştir. PCR ile oluşturulan rekombinant plazmitlerde oluşan çentikler bakterilerce *in vivo*'da onarılmaktadır. Transformasyon sonucunda petri başına elde edilen koloni sayısına bakıldığında, çok da küçük olmayan genler (~1,7 ve ~2 kb) için bu tür bir ligasyonun oldukça verimli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, seçilen kolonilerden yapılan plazmit izolasyonu ve kesimleri sonrası 5 soy için plazmitlerin % 100 oranında istenilen büyüklükte parça taşıdığı görülmüş, bu da yöntemin etkinliğinin diğer bir ispatı olmuştur. Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerde plazmit izolasyonu sonrası beklenen büyüklükte bantlar içerenleri ile yapılan ekspresyon çalışmasında *B. subtilis* amilaz genini içeren klonların yüksek hücre dışı aktivite verdiği, *B. cereus* amilaz genini taşıyanların ise hücre dışında ve içinde yok denecek kadar az enzimatik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *B. cereus* α-amilaz geni *B. subtilis* α-amilaz genine yakın bir büyüklükte olmasına rağmen transformasyon etkinliği ve veriminin A4 ve P17 soylarından türevlenen genlerde *B. subtilis* olanlardan daha düşük olduğu görülmüştür.

pUC19 klonlama vektöründe beta galaktosidaza ait kodonları içeren "polylinker" olarak da adlandırılan çoklu klonlama bölgesi bulunmaktadır. Beta galaktosidaz ekspresyonu, *lac* promotorunun kontrolündedir ve IPTG ile indüklenir. İndükleyicinin olmadığı ortamda bu promotordan bazal seviyede bir ekspresyon olmaktadır [De Bellis and Schwartz, 1990].Yaptığımız ekspresyon çalışmalarında IPTG ile uyarımın yanında uyarımsız örnekler de çalışmaya dahil edilmiştir. Uyarımsız örneğin çalışılan her saatte uyarımlı örnekten daha düşük aktivite verdiği gözlenmiştir.

α-amilaz üretimi indüklenebilir ve genellikle nişasta veya onun hidroliz ürünü olan maltoz varlığında enzimin üretimi indüklenebilir. Farklı *Aspergillus oryzae* türleri ile yapılan çalışmalardan, bu cins için α-amilazın genel indükleyici molekülünün maltoz olduğu söylenebilir. Maltoz ve nişastanın indükleyici olarak

kullanıldığı bir çalışmada *A. oryzae* NRC 401013 soyunda aktivitede 20 kat artış olduğu bildirilmiştir. Maltoz ve nişastadan başka laktoz, trehaloz, α-metil-D-glikozidin de α-amilazlar için indükleyici olduğu bilinmektedir. Her ne kadar glukoz ve maltoz α-amilaz üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılsa da, en fazla tercih edilen ve en sık rastlanan nişastadır [Gupta et al., 2003].

Srivasta ve Baruah (1986), yaptıkları çalışmada amilaz sentezinin bakteriler glukoz, maltoz ya da sukroz içeren bir besi yerinde büyütüldüğünde baskılandığını, fakat nişasta ya da diğer polisakkaritleri içeren ortamda büyütüldüğünde oldukça yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Nişasta, amilaz üretimini uyarmakla birlikte, literatürde amilaz üretimi için nişastanın gerekli olmadığını gösteren yayınlar da bulunmaktadır [Srivasta and Baruah, 1986)].

Amilaz üretiminin arttırılması için nişasta içeren besi yeri kullanımı literatürde oldukça yaygındır. Ekspresyon çalışmasında Ali ve arkadaşlarının α-amilaz üretiminde kullandıkları % 1 nişasta içeren M-9 besi yerine benzer şekilde hazırlanan, ancak farklı olarak iz element solüsyonunu içermeyen besi yeri α-amilaz ekspresyonu için kullanılmıştır (Ali et al., 1999). Bunun yanında, A28/1 soyu için zengin bir besi yeri olan LB besi yerinde enzimatik aktivite çalışılmış, ancak bu besi yerinde çok düşük aktivite değerlerine ulaşılmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen klonların α-amilaz aktivitesinin belirlenmesinde literatürde en sık tercih edilen DNS yöntemi kullanılmıştır. İlk çalışmalar, daha küçük ölçekte 3 ml'lik kültür ile yapılmış, önceki çalışmalardan elde edilen deneyimler ile aktivitenin yüksek olacağı tahmin edilen kültür başlangıcından sonraki 24. saatte ölçümler yapılmıştır. Bu aşamada seçilen klonlar ile yapılan daha büyük ölçekli ekspresyonda 4 saatte bir örnek alınarak hücre büyümesi ve α-amilaz aktivitesi kontrol edilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar en yüksek aktivitenin yine aynı saatte alındığına işaret etmiştir. Yerel *Bacillus* soyları ile yapılan önceki çalışmalarımızda, çalışılan soylar arasında farklılıklar olmakla birlikte en yüksek aktivite değerine sıklıkla kültür başlangıcından sonraki 20-24. saatlerde ulaşılmıştır [Tuzlakoğlu M., yüksek lisans tezi, 2004]. Hücre dışı α-amilaz üretim miktarının ise önceki verilere dayanılarak yapılan karşılaştırmada rekombinant soylarda 2 ila 3 kat arasında değişen oranlarda daha fazla olduğu görülmüştür.

Klonlanan soylardan yüksek aktivite verenlerinin α-amilaz genleri için DNA dizi analizi yapılmış ve BLAST veri tabanında yapılan karşılaştırma sonucu

benzerlik gösterdiği tür isimleri belirlenmiştir. *Bacillus subtilis* türevli klonların α-amilaz gen dizilimlerinin beklenildiği şekilde birbiri ile oldukça benzer olduğu (en fazla farklılık A3 soyu α-amilazında) görülmüştür.

Bacillus soyları doğal olarak çok çeşitli proteinleri büyük miktarlarda üreterek kendi hücre dışı ortamlarına salgılayabilme özelliğine sahiptir. Bunlardan birçoğu endüstriyel açıdan önem taşımakla birlikte *Bacillus* cinsinin bu tür süreçlerde konakçı olarak kullanımının en önemli dezavantajlarından biri heterolog proteinleri parçalama potansiyeli bulunan endojen proteazları yüksek miktarda sentezleme eğilimleridir. Heterolog protein üretiminde en fazla tercih edilen mikroorganizma olan *E. coli* üzerinde yapılan çalışmaların çokluğu nedeniyle bir model sistem olarak kullanılmakta ve genetik özellikleri diğer mikroorganizmalardan daha fazla bilinmektedir. Bugün, *E. coli*'ye gen aktarımında kullanılabilecek güçlü ve uyarılabilir çok çeşitli plazmit bulunmaktadır. *E. coli*'nin doğal olarak sentezlediği proteinlerin büyük bir çoğunluğu hücre içidir. Bunun yanı sıra doğal proteinlerinin bir kısmını periplazmik alana, daha azını da hücre dışı ortama taşır. Rekombinant protein üretme sistemlerinde periplazmik veya hücre dışı alanlara salınmasının başarılması, *E. coli* ekspresyon sistemlerinde aşılması gereken bir sınırlamadır [Walsh, 2005].

Tez projesi kapsamında PCR temelli ve ligaz kullanılmadan yapılan klonlamalar sonucu; beşi *B. subtilis*, ikisi *B. cereus* soylarına ait α-amilaz kodlayan genler, "ATG" translasyonel başlangıç bölgesinden başlayarak klonlanmıştır. Muhtemel sinyal dizisini de içinde bulunduran bu yaklaşımla, pUC19 vektörü üzerinde bulunan *B. subtilis* α-amilaz genlerinin hücre dışı ekspresyonu *E. coli* JM109 hücrelerinde başarılmıştır. Yine aynı yaklaşımla hazırlanan primerler kullanılmasına rağmen, iki *B. cereus* soyunda genin klonlanması başarılı olmasına karşın α-amilaz aktivitesinin bulunmaması, bu tür özelinde sinyal dizisinin *E. coli* Sec yolağında görevli proteinler tarafından tanınmamasını düşündürmektedir.

Amilazlar tipik olarak iki veya daha fazla kromatografik basamak kullanılarak saflaştırılır [Lim et al., 2003]. Tez çalışmasında en yüksek hücre dışı α-amilaz aktivitesine sahip klon olan *amy*28 α-amilazı kültür üst sıvısından amonyum sülfat, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon yöntemleri ile 16 kat saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Bacillus türlerinden elde edilen α-amilazların moleküler ağırlıkları değişken olmakla birlikte, mikrobiyal α-amilazların 50-60 kDa olan ağırlığı ile uyumlu olarak *B. subtilis*'te 54 kDa ve 57 kDa, *B. licheniformis*'te 58 kDa ve 64 kDa büyüklüğünde α-amilazlar belirlenmiştir [Pandey et al., 2000]. *amy*28 α-amilazının SDS-PAGE profiline bakılarak ~72 kDa büyüklüğünde olduğu, zimogram sonucunda da tek bir aktif α-amilaz bandının bulunduğu görülmüştür.

Endüstriyel süreçlerdeki birçok uygulama farklı hatta özellikle uç pH değerlerinde çalışabilen enzimleri gerektirdiğinden α-amilazların pH-aktivite profillerinin değiştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir [van der Maarel et al., 2002]. Nişasta işlenmesinde ilk basamak, pH değeri 4.5 olan nişasta çamuru/hamurunun sıvılaştırılmasıdır. α-amilaz eklenmeden önce bu pH değeri NaOH ile enzimin optimal çalışma koşulu olan pH 5.8-6.0'ya ayarlanmalıdır. Bu bağlamda, düşük pH değerlerinde aktif ve stabil olan α-amilazlara olan ihtiyaç açıktır. *amy*28 α-amilazının asidik-nötral pH aralığında (pH 4.5-7.0) aktif olduğu nitelendirme çalışmaları sonucu görülmüştür. Bunun yanı sıra, rekombinant enzimin, 4 ^{o}C'ta 24 saat sonunda pH 5.0-12.0 arasında kararlı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar *amy*28 α-amilazını nişasta biyodönüşümünde kullanılabilecek bir enzim olarak düşündürmektedir. Böylelikle sürecin şekerleştirme basamağında kullanılan glukoamilaz için optimal pH olan 4.5'e düşürmek için süreçte asit kullanımı basamağı da ortadan kaldırılabilir. pH 4.5'in altındaki pH değerlerinde *amy*28 α-amilazının inaktif olması, aktif bölgede yer alan bazik fonksiyonel grupların yapısından ve peptit bağlarının asit hidrolizinden kaynaklanmış olabilir [Dheeran et al., 2010]. Düşük pH'da peptit bağlarının asit hidrolizi Vieille ve Zeikus (2001) tarafından rapor edilmiş ve sıklıkla aspartik asit rezidülerinin C-terminal bölgesinde, Asp-Pro bağının en duyarlı olduğu bölgede meydana geldiği açıklanmıştır. Bu durum prolinin nitrojeninin diğer rezidülerinkilerden daha bazik olmasından ve aspartik asit rezidüsünün bir prolinin N ucuna bağlandığında α-β izomerizasyon için eğiliminin artmasından kaynaklanmaktadır [Vieille and Zeikus, 2001].

Nişastanın yüksek sıcaklık ve düşük pH'da biyodönüşümünün gerçekleşmesi yüksek substrat çözünürlüğü, düşük viskozite, bakteriyel kontaminasyondan korunma ve artan reaksiyon oranları bakımından oldukça avantajlıdır [Li et al., 2010].

*amy*28 α-amilazının optimal sıcaklığı 70°C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklıkta optimal aktivite gösteren başka *Bacillus* α-amilazları da bulunmaktadır [Arıkan, 2008], [Lin et al., 1998]. α-Amilazın endüstriyel uygulamalarının genellikle yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesi bu enzimi üreten termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalara olan ilgiyi arttırmıştır. Endüstride özellikle *B. licheniformis* ve *B. stearothermophilus* soylarından elde edilen ve 130-140 ºC'ta aktif olan α-amilazlar ile en yüksek aktivitesini 80-100 ºC'ta gösteren *Pyrococcus furious* α-amilazı kullanılmaktadır [Egas et al., 1998], [Hough and Danson, 1999]. Bunun yanında *B. subtilis* soyları da endüstriyel süreçlerde sıkça kullanılır. *amy*28 α-amilazının optimal sıcaklığının literatürde yer alan *B. subtilis* α-amilazlarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Najafi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *B. subtilis* AX20 soyunun optimal sıcaklığının 60 ^{o}C olduğunu bildirmişlerdir [Najafi et al., 2005]. Ayrıca *B. subtilis* amyE soyu için ve *B. subtilis* US116 soyu için optimal sıcaklık 65 ^{o}C olarak bildirilmiştir [Liu et al., 2010], [Ben Messaoud et al., 2004].

Düşük pH ve yüksek sıcaklık değerlerinde aktif olmanın yanı sıra sıcaklık kararlılığı nişasta işlenmesinde kullanılan α-amilazlar için önemli bir diğer noktadır [Dheeran et al., 2010]. *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens*'in yüksek sıcaklık kararlılığı olan α-amilazlar ürettiği uzun yıllardan beri bilinmektedir [Haki and Rakshit, 2003]. Bununla birlikte 50 ^{o}C'ın üzerindeki sıcaklıklarda kararlı olmayan *B. mojavensis* A21 ve *Bacillus* sp. XY-1 soylarının α-amilazları gibi örnekler de mevcuttur [Hmidet et al., 2010], [Liu and Xu, 2008]. Yaptığımız çalışmalar *amy*28 α-amilazının 50 ^{o}C'ta 90 dakika sonunda aktivitesinin tamamını koruduğunu, dahası 60 ^{o}C'ta 60 dakika sonunda da aktivitede azalma olmadığını göstermiştir. Literatürde yer alan α-amilazlarla karşılaştırıldığında *amy*28 α-amilazını orta-sıcaklık kararlı enzimler kategorisinde sayabiliriz. Bu durum fermentasyon basamağından sonra enzimleri inaktive etmek için pastörizasyonun kullanıldığı fırıncılık ve gıda endüstrileri için avantajlı bir özellik olarak görülebilir.

Tez çalışmasında ayrıca metal iyonları, deterjanlar, kelatlayıcı ve stabilize edici ajanların *amy*28 α-amilazı üzerindeki etkileri belirlenmiştir. α-amilazların metal-iyonu bağımlılığına (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} gibi) dair birçok çalışma mevcuttur [Sivaramakrishnan et al., 2006]. Zn^{2+}'nın amilazlar üzerinde değişken etkileri olduğunu gösteren çalışmalar olmakla birlikte, bu iyonun sıcaklık kararlılığı olan amilazların inhibitörlerinden biri olduğu bilinmektedir. Örneğin *Bacillus* A3-15

ve Geobacillus sp. IIPTN enzimlerinin Zn^{2+} ile inhibe olduğu bildirilmiştir [Arıkan, 2008], [Dheeran et al., 2010]. *amy*28 α-amilazının Zn^{2+} ile inhibe olması, sıcaklık kararlılığı özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. Rekombinant α-amilazın ayrıca Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} ve Ni^{2+} iyonları varlığında da inhibe olduğu gözlenmiştir. Bu tür inhibisyonlar için iki farklı mekanizma önerilmektedir: Birincisi, dış kaynaklı katyonlar ile protein ile ilişkili katyonlar arasındaki yarışmanın metalloenzim aktivitesini düşürmesi; ikincisi ise bazı metal iyonlarının doğrudan inhibitör etkisidir. Bununla birlikte ikinci seçenekte, inhibitör etki metal iyonları ile amino asit rezidüleri arasındaki (enzim aktivitesini ve substrat bağlanmasında konformasyonel değişikliğe neden olabilecek) etkileşime bağlı olabilir [Lin et al., 1998], [Chai et al., 2012].

Ca^{2+}'un birçok amilazın sıcaklık kararlılığı üzerinde etkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [Chai et al., 2012], [Egas et al., 1998], [Gupta et al., 2003]. α-Amilazların sıcaklık kararlılığının özellikle ortamda Ca^{2+} iyonu bulunduğunda genellikle çok daha fazla olduğu bilinse de, Jin ve arkadaşları [2001], yaptıkları çalışmada kullandıkları *Bacillus* sp. JF_2 soyu α-amilazının aktivitesinin, endüstride yaygın olarak kullanılan ve *B.licheniformis*' ten elde edilen termostabil α-amilazdan farklı olarak Ca^{2+} iyonu ile bağlantılı olmadığını rapor etmişlerdir. Nişastanın biyodönüşüm sürecindeki sıvılaştırma basamağında yüksek sıcaklıkta α-amilazın kararlılığının sağlanması amacıyla ortama $CaCl_2$ eklenir. Ca^{2+} iyonları, sürecin son basamağı olan glukozun izomerizasyonundaki inhibitör etkisinden dolayı iyon değişmi ile bu basamaktan önce ortamdan uzaklaştırılır. pH'nın NaOH ile ayarlanmasında olduğu gibi $CaCl_2$ eklenmesi ve ortadan kaldırılması yüksek maliyetli ve zaman alan bir işlemdir. Bu bağlamda, kalsiyuma bağlı olmadığını gördüğümüz *amy*28 α-amilazı bu tür uygulamalar için elverişli olabilecek bir enzim olarak göze çarpmaktadır.

Divalent katyonları kelatlayıcı özelliği olan EDTA'nın kuvvetli bir α-amilaz inhibitörü olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir [Gupta et al., 2003, Nirmala and Muralikrishna, 2003], [Mamo and Gessesse, 1999], [Aguilar et al., 2000]. *amy*28 α-amilazının 1, 5 ve 10 mM EDTA ile yapılan nitelendirme çalışmalarında, artan konsantrasyonlarda EDTA'nın enzimatik aktiviteyi inhibe edici özellikte olduğu görülmüştür. Bu sonuç, aktif bölge yakınlarında iki değerlikli bir iyonun bulunabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan deneyler sonucu, PMSF'nin *amy*28 α-amilazını inhibe ettiği görülmüştür. Benzer bir durum *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 α-amilazı için de rapor edilmiştir [Kolcuoğlu ve ark., 2010]. PMSF'in serin rezidüsü inhibitörü olduğu bilinmektedir. *amy*28 amilazının aktif bölgesinde serin rezidüsünün bulunma ihtimali olduğu düşünülmektedir.

Deterjanlarla yapılan çalışmalarla, *amy*28 α-amilazının iyonik olmayan deterjanlar olan Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100 varlığında kararlı olduğu görülmüştür SDS'in *Anoxybacillus* ve *Thermus filiformis* Ork A2 α-amilazlarında olduğu gibi *amy*28 amilazında da denature edici bir ajan olduğu belirlenmiştir [Chai et al., 2012], [Egas et al., 1998]. β-merkapto etanolün a*my*28 α-amilazını inhibe etmemesi, enzimatik aktivite için disülfit bağlarının esansiyel olmadığını düşündürmektedir. Dahası, β-merkapto etanolün aktiviteyi stimüle edici etkisi doğal enzim konformasyonunu koruyucu etkisinden kaynaklanabilir.

α-amilazlar substrat özgüllüğü olarak sırasıyla nişasta, amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioza ilgi gösterirler [Gupta et al., 2003]. Transglikozilasyon reaksiyonu olarak adlandırılan α-1,6 glikozidik bağlarının hidrolizi amilazlar için birkaç örnekle sınırlı olağandışı bir özelliktir [Moreno et al., 2010]. *amy*28 α-amilazının substrat özgüllüğüne bakıldığında en yüksek aktiviteyi patates, mısır, buğday gibi farklı nişasta türlerine gösterdiği görülmüştür. Rekombinant enzimin amiloz, amilopektin ve maltodekstrini parçalayabiliyorken α- ve β-siklodekstrinler üzerinde aktivitesinin olmaması bu enzimin α-1,4 glikozidik bağlarının hidrolizini yapabilen, α-1,6 bağları üzerinde etkili olmayan tipik bir α-amilaz olduğunu göstermiştir.

Endüstriyel süreçler sıklıkla saf olmayan α-amilazların kullanıldığı uygulamalar olsa da saflaştırılmış enzimler yapı-fonksiyon ve biyokimyasal özelliklerin belirlenmesinde tercih edilmektedir [Gupta et al., 2003]. *amy*28 α-amilazı % 22 verimle 16 kez saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat, iyon değişimi ve jel filtrasyonu yöntemlerinin art arda kullanıldığı bir seri saflaştırma basamağı sonucunda SDS-PAGE'de birden fazla bant görülmüştür. Tek bir bandın eldesi, saflaştırma süreçlerinde sıklıkla afinite kolonları kullanılarak mümkün olmaktadır.

Yaban tipteki enzim genlerinin farklı konakçılara klonlanarak ekspresyonu uzun yıllardır çalışılan bir daldır. Bu tez çalışmasında uygulanan PCR eliyle klonlamaya yeni bir yaklaşımın getirilmesi, Grubumuz ve diğer araştırma gruplarının

ligasyon bağımlı olmaksızın tek basamakta klonlama çalışmaları yapabilmesine katkıda bulunacaktır.

8. SONUÇ

Doktora tez çalışmasında, yerel *Bacillus* izolatlarının α-amilaz genleri ligaz-bağımlı olmayan bir yöntem kullanılarak klonlanmış ve rekombinant soylarda enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda önceki çalışmalarımızda beşi *B. subtilis*, ikisi ise *B. cereus* olarak tanımlanan soyların α-amilaz genleri genomdan PCR ile çoğaltılmış, sırasıyla ~2 kb ve ~1.7 kb'lik fragmanlar elde edilmiştir. Bu fragmanlar, genomdan çoğaltılırken klonlama vektörü olan pUC19'un çoklu klonlama bölgesinin yakınında yer alan bölgelere tamamlayıcı nükleotit dizilerini içerecek şekilde tasarlanmış kuyruklar taşır halde elde edilmişlerdir. Bu ürünlerin ve vektörün bulunduğu, primer bulunmayan ikinci bir PCR reaksiyonu klonlama PCR'si olarak kullanılmıştır. Bu PCR sonucu elde edilen ürünler ile kompetan hücreler transforme edilmiş ve rekombinant *E. coli* soyları elde edilmiştir. Tez kapsamında uygulanan ligaz-bağımlı olmayan klonlama yöntemi, basit, hızlı ve etkin bir klonlama şeklidir.

Bu yönüyle çalışma, *Bacillus* enzim genlerine yönelik ilk ligaz-bağımsız klonlama olarak literatürde yer almıştır.

Elde edilen klonların α-amilaz gen dizilimleri yapılmış, A28 soyu α-amilaz gen dizilimi JX163316 erişim numarası ile GenBank'a depo edilmiştir.

Klonların hücre dışı α-amilaz üretkenlikleri test edilmiş ve *B. subtilis* α-amilazlarını taşıyan vektörler ile oluşturulan rekombinant soyların α-amilazı hücre dışına salgıladığı görülmüştür.

En yüksek α-amilaz aktivitesini veren rekombinant soy olan klon A28/1 (*amy*28) enzim saflaştırma çalışmalarına alınmış, yapılan amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon sonucunda, klonun α-amilazı hücre üst sıvısından % 22 verimle 16 kez saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ve zimogram analizleri ile enzimin ~72 kDa ağırlığında olduğu gösterilmiştir.

Enzimin biyokimyasal nitelendirme çalışmaları ile asidik pH aralığında aktif, kalsiyumdan bağımsız çalışan, ılımlı termofilik ve sıcaklık kararlılığı olan bir α-amilaz olduğu, bu yönleriyle nişasta işlenme süreçlerinde ve fırıncılık gibi alanlarda kullanılabilecek nitelikte bir enzim olduğu düşünülmektedir.

Doktora tez çalışmasından elde edilen veriler, " Ligase-Independent Cloning of Amylase Gene from a Local *Bacillus subtilis* Isolate and Biochemical Characterization of the Purified Enzyme" başlığı (doi:10.1007/s12010-013-0331-y)

ile “Applied Biochemistry and Biotechnology” dergisinde yayımlanmıştır. İlgili yayın tezin “Ekler” bölümünde verilmiştir.

9. ÖNERİLER

Doktora tez projesinde uygulanan ligaz-bağımlı olmayan klonlama nişasta işlenmesinde kullanılan enzimlerin yanı sıra, diğer endüstriyel enzimlere ait genlerden rekombinant enzimlerin oluşturulmasında kullanılabilecek etkin bir yöntem olabilir. Ayrıca, klonlaması güç olan özellikle uzun fragmanların klonlanmasında alternatif bir yaklaşım olarak düşünülebilir. Bu tür bir klonlama şeklinin, farklı vektör ve kompetan hücre kullanılarak uygulanabileceği ve verimli sonuçlar alınabileceği öngörülmektedir. Uygun primer tasarımı ile, yine alt klonlama çalışmalarının etkin şekilde yapılabileceğini söylemek mümkündür.

KAYNAKLAR

Abou Dobara M. I., El-Sayed A. K., El-Fallal, A. A, Omar, N. F., (2011), "Production and partial characterization of high molecular weight extracellular α-amylase from Thermoactinomyces vulgaris isolated from Egyptian soil", Polish Journal of Microbiology, 60 (1), 65-71.

Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., Guyot, J. P., (2000), "Purification and characterization of an extracellular α-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010(T), an amylolytic lactic acid bacterium", Enzyme and Microbial Technology, 27 (6), 406-413.

Ali, B. M., Mezghani, M., and Bejar, S., (1999), "A thermostable α-amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene", Enzyme and Microbial Technology, 24, 584-589.

An Y., Wu W., Lv A., (2010), "A convenient and robust method for construction of combinatorial and random mutant libraries", Biochimie, 92, 1081-1084.

Arikan B., (2008), "Highly thermostable thermophilic alkaline SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15", Bioresource Technology, 99, 3071–3076.

Arnesen S., Eriksen S. H, Olsen J., Jensen B., (1998), "Increased production of alpha amylase from Thermomyces lanuginosus by the addition of Tween-80", Enzyme and Microbial Technology, 23 (3-4), 249-252.

Aslanidis C., Jong P. J., (1990), "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)", Nucleic Acids Research, 18 (20), 6069-6074.

Asoodeh A., Chamanic J., Lagzian M., (2010), "A novel thermostable, acidophilic α-amylase from a new thermophilic "Bacillus sp. Ferdowsicous" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization", International Journal of Biological Macromolecules, 46 (3), 289-297.

Aunstrup K., (1979), "Production, isolation and economics of extracellular enzymes", In: Wingard J., Katchalski Katzir L.and Golstein L., Editors, "Applied Biochemistry and Bioengineering", Academic Press..

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D, Seidman J. G, Smith J. A., Struhl K., (2001), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons.

Azad M. A., Bae J. H., Kim J. S., Lim J. K., Song K. S., Shin B. S., Kim H. R., (2009), "Isolation and characterization of a novel thermostable alpha-amylase from Korean pine seeds", Biotechnology, 26, 143–149.

Bajpai P., Bajpai P. K., (1989), "High-temperature alkaline α-amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13", Biotechnology and Bioengineering, 33 (1), 72-78.

Ben Messaoud E., Ben Ali M., Elleuch N., Fourati Masmoudi N., Bejar S., (2004), "Purification and properties of a maltoheptaose- and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116", Enzyme and Microbial Technology, 34, 662–666.

Bergmann F. W., Abe J., Hizukuri S., (1998), "Selection of microorganisms which produce raw-starch degrading enzymes", Applied Microbiology and Biotechnology, 27, 443-446.

Bernfeld P., (1955), "Amylases, α- and β", Methods in Enzymology, 1, 149–158.

Bertoldo C., Antranikian G., (2002), "Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria", Current Opinion in Chemical Biology, 6, 151-160.

Bozic N., Ruizb J., López-santínb J., Vujci Z., (2011), "Production, and properties of the highly efficient raw starch digesting α-amylase from a Bacillus licheniformis ATCC 9945a", Biochemical Engineering Journal, 53 (2), 203-209.

Bradford M. M., (1976), "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Analytical Biochemistry, 72 (1-2), 248–254.

Busch J. E, Stutzenberger F. J, (1997), "Amylolytic activity of Thermomonospora fusca", World Journal of Microbiology and Biotechnology, 13, 637-642.

Chai Y. Y, Rahman R. N. Z. R. A., Illias R. M., Goh K. M., (2012), "Cloning and characterization of two new thermostable and alkalitolerant a-amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 39, 731-741.

Chaplin M. and Bucke C., (1990), "Enzyme Technology", Cambridge University Press.

Clark J. M., (1988), "Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases", Nucleic Acids Research, 16 (20), 9677–9686.

Crabb W. D., Shettyt J. K., (1999)," Commodity scale production of sugars from starches", Current Opinion in Microbiology, 2, 252-256.

D'Amico S., Gerday C., Feller G., (2000), "Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent α-amylases", Gene, 253, 95–105.

Das S., Singh S., Sharma V., Soni M. L, (2011), "Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme", International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2, 486-496.

De Bellis D., Schwartz I., (1990), “Regulated expression of foreign genes fused to lac: control by glucose levels in growth medium”, Nucleic Acids Research, 18 (5), 1311.

De Mot R., Van Oudendijck E., Hougaerts S., Verachtert H., (1984), “ Effect of medium composition on amylase production by some starch-degrading yeasts”, FEMS Microbiology Letters, 25 (2-3), 169-173.

Deb P., Talukdar S., Ahmad., Mohsina K., Sarker P. K. , Abu Sayem S. M ., (2013), “Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001”, SpringerPlus 2 (154), 1-12.

Demirkan E. S., Mikami B., Adachi M., Higasa T., Utsumi S., (2005), “α-Amylase from *B. amyloliquefaciens*: Purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli”*, Process Biochemistry, 40 (8) , 2629-2636.

Dheeran P., Kumar S., Jaiswal Y. K., Adhikari D. K., (2010), “Characterization of hyperthermostable *α*-amylase from *Geobacillus sp.* IIPTN”, Applied Microbiology and Biotechnology, 86, 1857–1866.

Doyle E. M., Noone A. M, Kelly C. T., Quigley T. A., Fogarty W.M, (1998), “Mechanisms of action of the maltogenic α-amylase of Byssochlamys fulva”, Enzyme and Microbial Technology, 22 (7), 612-616.

Duedahl-Olesen L., Kragh K. M., Zimmermann W., (2000), “Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21”, Carbohydrate Research, 329, 97-107.

Egas M. C. V, da Costa M. S, Cowan D. A, Pires E. M. V., (1998), “Extracellular α-amylase from *Thermus filiformis Ork A2*: purification and biochemical characterization”, Extremophiles, 2, 23-32.

El-Fallal A., Abou Dobara M., El-Sayed A., Omar N., (2012) “Starch and Microbial α-Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications”, In: Chang C., “Biochemistry, Genetics and Molecular Biology”, Humana Press.

Ferrari E., Jarnagin A. S., Schmidt B. F., (1993), “Commercial Production of Extracellular Enzymes”. In: Sonenheim AL, Hoch JA, Losick R, editors. “Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics”, American Society for Microbiology Press.

Guo B., Bi, Y. (2002), “Cloning PCR Products”, in: Chen, B.Y. and Janes, H.W, Editors, “PCR Cloning Protocols”, Humana.

Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B., (2003), “Microbial amylases: a biotechnological perspective”, Process Biochemistry, 38, 1599-1616.

Haki G. D., Rakshit S.K., (2003), “Developments in industrially important thermostable enzymes: a review”, Bioresource Technology, 89,17-34.

Harwood R. C., (1992), "*Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses", Trends in Biotechnology, 10, 247-256.

Hmidet N., Maalej H., Haddar A., Nasri M., (2010), "A Novel α-Amylase from *Bacillus mojavensis* A21: Purification and biochemical characterization", Applied Biochemistry and Biotechnology, 162, 1018–1030.

Hofemeister B., Konig S., Hoang V., Engel J., Mayer G., Hansen G., Hofemeister J., (1994), "The gene amyE (TV1) codes for a nonglucogenic α-amylase from Thermoactinomyces vulgaris 94-2A in *Bacillus subtilis*", Applied and Environmental Microbiology, 60 (9), 3381-3389.

Hough, D. W., Danson, M. J., (1999), "Extremozymes", Current Opinion in Chemical Biology, 3, 39-46.

İşsever Ö. S., Tuzlakoğlu Öztürk M., Akbulut N., Kayman S. S., Gümüşel F., (2008) "Endüstriyel Enzim Üreticisi Yerel *Bacillus* izolatlarının Moleküler Tiplendirme Yöntemleriyle Tanımlanması", 5. Ulusal Moleküler ve Diagnostik Mikrobiyoloji Kongresi, Çankaya, 24-28 Haziran, Ankara, Türkiye.

Janecek S., (1997), "α-Amylase family: Molecular biology and evolutıon", Progress in Biophysics and Molecular Biology, 67, 67-97.

Jang S., Cheong T., Shim W., Wan Kim, J., Park, K., (1994), "Purification of *Bacillus licheniformis* thermostable α-amylase by immunoaffinity chromatography", Korean Biochemical Journal, 27 (1), 38-41.

Jin, F., Li, Y., Zhang, C., Yu, H., (2001), "Thermostable α-amylase and α-galactosidase production from the thermophilic and aeorobic *Bacillus sp*. J.F strain", Process Biochemistry, 36, 559-564,.

Jong R. N, Daniëls M. A, Kaptein R., Folkers G. E, (2006), "Enzyme Free Cloning for high throughput gene cloning and expression", Journal of Structural and Functional Genomics, 7, 109–118.

Kahn M., House B., (2004), "Method for cloning PCR products without restriction or ligation enzymes", United States Patent Application, 20040166512.

Kalishwaralal K., Gopalram S., Vaidyanathan R., Deepak V., Pandian S., Gurunathan S., (2010), "Optimization of α-amylase production for the green synthesis of gold nanoparticles", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 77 (2), 174-180.

Kaur J., Sharma R., (2006), "Directed evolution: An approach to engineer enzymes", Critical Reviews in Biotechnology, 26, 165–199.

Kimura K., Tsukamoto A., Ishii Y., Takano T., Yamane K., (1988), "Cloning of a gene for maltohexaose producing amylase of an alkalophilic *Bacillus* and hyper-production of the enzyme in *Bacillus subtilis* cells", Applied Microbiology and Biotechnology, 27 (4), 372-377.

Kolcuoğlu Y., Colak A., Faiz O., Belduz A.O., (2010), “Cloning expression and characterization of highly thermo- and pH-stable maltogenic amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4”, Process Biochemisty, 45, 821–828.

Laemmli U.K.., (1970), “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, Nature, 227, 680–685.

Leuschner C., Antranikian G., (1995), “Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms”, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, 95-114.

Li C., Evans R. M., (1997), “Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility”, Nucleic Acids Research, 25 (20), 4165–4166.

Li D., Park J. T., Li X., Kim S., Lee S., Shim J. H., Park S. H., Cha J., Lee B. H., Kim J. W., Park K. H., (2010), “Overexpression and characterization of an extremely thermostable maltogenic amylase, with an optimal temperature of 100 8C, from the hyperthermophilic archaeon *Staphylothermus marinus*” , New Biotechnology, 27 (4), 300-307.

Lim W. J., Park S. R., An C. L., Lee J. Y., Hong S. Y., Shin E. C., Kim E. J., Kim J. O., Kim H., Yun H. D., (2003), “Cloning and characterization of a thermostable intracellular α-amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8”, Research in Microbiology, 154, 681-687.

Lin L. L, Chyau C. C, Hsu W. H., (1998), “Production and properties of a raw starch degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23”, Biotechnology and Applied Biochemistry, 28, 61–68.

Linden A., Mayans O., Meyer-claucke W., Antranikian G., Wilmanns M., (2003), “Differential regulation of a hyperthermophilic α-amylase with a novel (Ca, Zn) two-metal center by zinc”, Journal of Biological Chemistry, 278, 9875-9884.

Liu X. D, Xu Y., (2008), “A novel raw starch digesting a-amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization”, Bioresource Technology, 99, 4315–4320.

Liu Y., Lu F., Chen G., Snyder C. L., Sun J., Li Y., Wang J., Xiao J., (2010), “High-level expression purification and characterization of a recombinant medium-temperature *α*-amylase from *Bacillus subtilis*”, Biotechnology Letters, 32, 119–124.

Mamo, G., Gessesse, A., (1999), “Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α-amylases from a thermophilic *Bacillus*, Enzyme and Microbial Technology, 25, 433-438.

Mccann A. K, Barnett J. A, (1984), “Starch utilization by yeasts: mutants resistant of carbon catabolite repression”, Current Genetics, 8, 525-530.

Mishra R. S, Maheshwari R., (1996), “Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: their purification, properties, action on starch and response to heat”, Journal of Biosciences., 21 (5), 653-672.

Moreno A., Damian-Almazo J. Y., Miranda A., Saab-Rincon G., Gonzalez F., Lopez-Munguia A., (2010), “Transglycosylation reactions of Thermotoga maritima α-amylase”, Enzyme and Microbial Technology, 46 (5), 331–337.

Murthy P., Naidu M., Srinivas P., (2009), “Production of α-amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste”, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84 (8), 1246-1249.

Najafi M. F, Deobagkar D., Deobagkar D., (2005), “Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* AX20”, Protein Expression and Purification, 41, 349-354.

Nielsen, J. E., Borchert T. V., (2000), “Protein engineering of bacterial α-amylases”, Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1543 (2), 253-274.

Nirmala, M., Muralikrishna, G., (2003), “Three α-amylases from malted finger millet (ragi, Eleusine coracana, Indaf-15) - Purification and partial characterization”, Phytochemistry, 62 (1) , 21-30.

Özcan N., Altınalan A., (2001), “Molecular cloning of an α-amylase gene from Bacillus subtilis RSKK246 and its expression in *Esherichia coli* and in *Bacillus subtilis*”, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 25, 197-201.

Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R., (2000), “Advances in microbial amylases”, Biotechnology and Applied Biochemistry, 31, 135–152.

Petruccioli M., Federici R. G., (1992), “A note on the production of extracellular hydrolytic enzymes by yeast-like fungi and related microorgnisms”, Ann. Microbiol. Enzimol., 42, 81-86.

Prakash O., Jaiswal N., (2010), “Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes”, Appl Biochem Biotechnol., 16, 2401-2414.

Rajagopalan G., Krishnan C., (2008), “Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate”, Bioresource Technology,.99 (8), 3044–3050.

Riisgaard S., (1990), “The enzyme industry and modern biotechnology”, In: Proceedings of the Fifth European Congress on Biotechnology, 1C. Christiansen, L. Munck, J. Villadsen (Ed.), 31408-71610-617-2, Copenhagen.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T. (1989), “Molecular cloning a laboratory manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Satoh E., Uchimura T., Kudo T., Komagata K., (1997), “Purification, characterization, and nucleotide sequence of an intracellular maltotrioseproducing α-amylase from Streptococcus bovis 148”, Applied and Environmental Microbiology, 63 (12), 4941-4944.

Schallmey M., Singh A., Ward O. P., (2004), “Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production”, Canadian Journal of Microbiology, 50 (1), 1-17.

Shuldiner A. R., Scott L. A., Roth J., (1990), “PCR-induced (ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products”, Nucleic Acids Research, 18, 1920.

Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri M. K., Soccol C. R., Pandey A., (2006), “α-Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments”, Food Technology and Biotechnology, 44, 173–184.

Slepecky, R. A., H. E.Hemphill, (1992), The Prokaryotes, 2nd Edition, A. Balows , Chapter 76, Springer-Verlag.,

Sneath, P. H. A., (1986), “Section 13: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci”/ Section 16: Identification of Unknown Bacteria”, In: Krieg N.R, editor, “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, 2nd edition, Williams and Wilkins.

Srivastava R. A. K., Baruah J. N., (1986), “Culture Conditions for Production of Thermostable Amylase by *Bacillus stearothermophilus*”, Applied and Environmental Microbiology, 52 (1), 179-184.

Sun H., Zhao P., Ge X., Xia Y., Hao Z., Liu J., Peng M., (2010), “Recent Advances in Microbial Raw Starch Degrading Enzymes”, Applied Biochemistry and Biotechnology, 160, 988-1003.

Sunna A., Moracci M., Rossi M., Antranikian G., (1997), “Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles”, Extremophiles, 1, 2-13.

Synowiecki J., (2007), “The Use of Starch Processing Enzymes in the Food Industry”, Polaina P., Andrew P., “The Use of Starch Processing Enzymes in the Food Industry Industrial Enzymes Structure, Function and Applications”, Springer Verlag.

Thieme F., Engler C., Kandzia R., Marillonnet S., (2011), “Quick and clean cloning: a ligation-independent cloning strategy for selective cloning of specific PCR products from non-specific mixes”, 6 (6), 1-12.

Tillett D., Neilan, B. A., (1999), “ Enzyme-free cloning: a rapid method to clone PCR products independent of vector restriction enzyme sites”, Nucleic Acids Research., 27, e26.

Tuzlakoğlu M, (2004), “Alfa-amilaz Üreticisi Yerel Bacilus Soylarının İzolasyonu, Nitelendirilmesi ve Enzim Üretiminin Optimizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Van der Maarel M. J. E. C., Van der Veen B., Uitdehaag J. C. M., Leemhuis H., Dijkhuizen L., (2002), "Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family", Journal of Biotechnology, 94 (2), 137-155.

Vieille, C., Zeikus, G. J., (2001), "Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability", Microbiology and Molecular Biology Reviews 65 (1) , 1-43,

Walsh G., (2005), "Proteins Biochemistry and Biotechnology", John Wiley&Sons.

Wang Y. W, Nema S, Teagarden D, (2010), "Protein aggregation Pathways and influencing factors", International Journal of Pharmaceutics, 390 (2), 89-99.

Whitehead T. R, Cotta M. A, (1995), "Identification of intracellular amylase activity in *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*", Current Microbiology, 30 (3), 143-148.

Yang H., Liu L., Shin H., Chen R. R., Li J., Du G., Chen J., (2013) "Structure-based engineering of histidine residues in the catalytic domain of α -amylase from *Bacillus subtilis* for improved protein stability and catalytic efficiency under acidic conditions", Journal of Biotechnology, 164, 59– 66.

Yang S. J, Lee H. S, Park C. S, Kim Y. R, Moon T. W, Park K. H., (2004), "Enzymatic Analysis of an Amylolytic Enzyme from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Reveals Its Novel Catalytic Properties as both an α-Amylase and a Cyclodextrin-Hydrolyzing Enzyme", Applied and Environmental Microbiology, 70, 5988–5995.

Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J., (1985), "Improved M13 phage cloning vectors, and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18, and pUC19 vectors", Gene, 33,103–119.

Zare-maivan H., Shearer C. A, (1988), "Extracellular enzyme production and cell wall degradation by freshwater lignicolous fungi", Mycology, 80 (3), 365-375.

Zhou M. Y, Gomez-Sanchez C. E., (2000), "Universal TA cloning", Current Issues in Molecular Biology, 2 (1), 1-7.

ÖZGEÇMİŞ

Merve Tuzlakoğlu Öztürk 1979 yılında Sakarya'da doğdu. 1997 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2001 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında aldığı yüksek lisans derecesi ardından 2005 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitimine başladı. 2003 yılından bu yana Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Tuzlakoglu Ozturk M., Akbulut N., I Ozturk S., Gümüşel F., (2013), "Ligase-independent cloning of amylase gene from a local *Bacillus subtilis* isolate and biochemical characterization of the purified enzyme", Applied Biochemistry and Biotechnology, 171 (2), 263-278.