

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 SUŞUNDAN MALTOJENİK  
AMİLAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Yakup KOLCUOĞLU**

**OCAK 2009  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 SUŞUNDAN MALTOJENİK  
AMİLAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**Kimyager Yakup KOLCUOĞLU**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**

**"Doktor (Kimya)"**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04. 12. 2008**

**Tezin Savunma Tarihi : 02. 01. 2009**

**Tez Danışmanı : Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK**

**Jüri Üyesi : Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ**

**Jüri Üyesi : Doç.Dr. Murat KÜÇÜK**

**Jüri Üyesi : Prof.Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU**

**Jüri Üyesi : Doç.Dr. Sevgi KOLAYLI**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2009**

## ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 Suşundan Matojenik Amilaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma TUBİTAK 106T696 nolu proje tarafından desteklenmiş olup, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır. Vermiş olduğu destek için TUBİTAK’a teşekkür ederim.

Akademik hayata birlikte merhaba dediğim, yüksek lisans ve doktora tez danışmanlığımı üstlenerek beni onurlandıran, bu projenin planlanıp hayata geçirilmesinde çok büyük katkıları olan ve ayrıca, çalışma hayatı dışında kendisine ihtiyaç duyduğum her noktada yanımda olan değerli hocam Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK’a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında kullandığımız bakterinin temin edilmesinde ve bunun yanında çalışmam boyunca bilimsel anlamda değerli katkılarıyla beni destekleyen ve bana yol gösteren Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, Y.Doç.Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarımıza birlikte başladığımız, o günden bugüne kadar da bana katlanmak zorunda kalan ve çalışmalarım esnasında çok büyük destek gördüğüm, değerli çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Melike YILDIRIM, Arş.Gör. Özlem FAİZ ve Arş.Gör. Melek ÇOL’a ve ayrıca Y.Doç.Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya teşekkür ederim.

Ve hayatımın her anında, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyerek bugünlere gelmemde büyük emek harcayan ve haklarımı asla ödeyemeyeceğim sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız...

Yakup KOLCUOĞLU  
Trabzon, 2009

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Rekombinant Enzim Üretiminin Avantajları.....	2
1.3. Protein Kaynağı Olarak Mikroorganizmalar.....	3
1.4. Termofilik Mikroorganizmalar .....	4
1.4.1. Termofillerin Yüksek Sıcaklıklara ve Denaturasyona Karşı Dayanıklılıkları.....	5
1.4.2. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı.....	5
1.5. Isıl Kararlı Enzimler .....	6
1.6. Amilolitik Enzimler.....	8
1.6.1. Neopullulanaz, Maltojenik amilaz ve Siklodekstrinaz'ın Farklılıkları ..	10
1.6.1.1. Siklomaltodekstrinaz .....	11
1.6.1.2. Neopullulanaz .....	13
1.6.1.3. Maltojenik amilaz .....	15
1.6.1.4. Maltojenik Amilaz İçeren Organizmalar ve Yapılan Çalışmalar .....	15
1.6.1.5. Substrat Özgünlüğü ve Katalitik Özellikleri .....	17
1.6.1.6. Kataliz Mekanizması .....	21
1.6.1.7. Birincil ve İkincil Yapılar .....	24
1.7. <i>Geobacillus caldoolyolyticus</i> TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri .....	25
1.8. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi .....	26
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	28
2.1. Kullanılan Materyaller .....	28

2.1.1.	Cihazlar .....	28
2.1.2.	Enzimler .....	29
2.1.3.	Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler .....	29
2.1.4.	Primerler .....	30
2.1.5	Kullanılan Bakteri Suşları .....	30
2.1.6.	Plazmitler .....	31
2.1.7.	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	37
2.1.7.1.	Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları .....	37
2.1.7.2	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları .....	37
2.1.7.3.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	38
2.1.7.4.	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler .....	38
2.1.7.5	Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler .....	39
2.1.7.6.	Sıvı ve Katı Besiyerleri .....	40
2.1.7.7.	Diğer Çözeltiler .....	40
2.2.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması .....	41
2.2.1.	<i>Geobacillus caldoxylolyticus</i> TK4 Suşunun Büyütülmesi .....	41
2.2.2.	Genomik DNA İzolasyonu .....	43
2.2.3.	Plazmit DNA İzolasyonu .....	44
2.2.4.	DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi .....	45
2.2.5.	Genomik DNA ve pUC18 Plazmit DNA'sının <i>EcoR</i> I ile Kesimi .....	45
2.2.6.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi .....	46
2.2.7.	DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi .....	46
2.2.8.	gDNA Parçalarının pUC18 Vektörüne Ligasyonu .....	47
2.2.9.	Kompetent Hücre Hazırlanması .....	47
2.2.10.	Transformasyon .....	48
2.2.11.	Rekombinant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi ...	48
2.2.12.	DNA Sıralarının İncelenmesi .....	49
2.3.	Maltojenik Amilaz ( <i>Gca</i> TK4 MA) Geninin Eksik Kalan Kısımlarının İncelenmesi ve İncelenmesi.....	49
2.3.1.	İncelenmesi İçin Primer Tasarlanması .....	49
2.3.2.	Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi .....	50
2.3.3.	DNA Parçalarının Ligasyonu .....	51

2.3.4.	İnvers PCR .....	52
2.3.5.	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	53
2.3.6.	PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu .....	53
2.3.7.	<i>E. coli</i> JM101'e Transformasyon, Rekombinant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi .....	54
2.4.	<i>Gca</i> TK4 MA Geninin pET-28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Protein Ekspresyonu ..	54
2.4.1.	<i>Gca</i> TK4 MA Geninin Tamamını Çoğaltmak Amacıyla Primer Tasarlanması .....	54
2.4.2.	<i>Gca</i> TK4 MA Geninin Tamamının PCR Yöntemiyle Çoğaltılması .....	55
2.4.3.	PCR Ürünü ve pET-28a(+) Vektörünün <i>Nhe</i> I ve <i>Hind</i> III İle Kesilmesi.....	56
2.4.4.	Kesik PCR Ürününün ve pET-28a(+) Vektörünün Ligasyonu .....	56
2.4.5.	Rekombinant pET28a(+) Vektörünün <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu.....	56
2.4.6.	<i>Gca</i> TK4 MA'nın <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS'de Ekspresyonu .....	57
2.5	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS'de Ekspres Edilen <i>Gca</i> TK4 MA'nın Saflaştırılması .....	57
2.6.	<i>Gca</i> TK4 MA'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	59
2.6.1.	Protein Tayini .....	59
2.6.2.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) .....	60
2.6.3.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (Doğal PAGE) .....	61
2.6.4.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	61
2.6.5.	İnce Tabaka Kromatografisi .....	62
2.6.6.	Bazı Parametrelerin <i>Gca</i> TK4 MA Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	62
2.6.6.1.	pH'nın Etkisi .....	62
2.6.6.2.	Sıcaklığın Etkisi .....	63
2.6.6.3.	Enzim Konsantrasyonunun Etkisi .....	63
2.6.6.4.	Substrat Konsantrasyonu .....	63
2.6.6.5.	Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	63
2.6.6.6.	pH Kararlılığının İncelenmesi .....	64
2.6.6.7.	Bazı Kimyasalların ve Metal İyonlarının Etkisi .....	64
3.	BULGULAR .....	65
3.1.	Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması .....	65

3.2.	Maltojenik Amilaz ( <i>Gca</i> TK4 MA) Geninin Eksik Kalan Kısımlarının İnvers PCR ile Elde Edilmesi.....	65
3.3.	<i>Gca</i> TK4 MA Geninin pET-28a(+) Vektörüne Aktarılması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması .....	70
3.4.	<i>Gca</i> TK4 MA'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	79
3.4.1.	Protein Tayini .....	79
3.4.2.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) .....	79
3.4.3.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE) .....	80
3.4.4.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	81
3.4.5.	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	82
3.4.6.	pH'nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	83
3.4.7.	Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	83
3.4.8.	Enzim Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi .....	84
3.4.9.	Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	85
3.4.10.	Rekombinant Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	86
3.4.11.	Rekombinant Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi .....	87
3.4.12.	Bazı Kimyasalların ve Metal İyonlarının Enzim aktivitesi Üzerine Etkisi .....	89
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	91
5.	ÖNERİLER.....	99
6.	KAYNAKLAR.....	101
ÖZGEÇMİŞ		

## ÖZET

TUBİTAK, 106T696 nolu proje kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada, yeni bir termofilik suş olan *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4'den bir genomik DNA kütüphanesi oluşturuldu. Bu kütüphaneden elde edilen veriler ve bu verilere dayanılarak yapılan invers PCR'lar sonucunda, 1740 bazdan oluşan bir maltojenik amilaz (*Gca* TK4 MA) geninin tam DNA sırası belirlendi. Bu DNA sırasının, amino asit sırasına çevrildikten sonra BLAST programı ile incelenmesi sonucunda, *Bacillus thermoalkalophilus* MA'ına %86 ve *Geobacillus stearothermophilus* MA'ına %77 oranında benzediği tespit edildi. pET-28a(+) vektörüne klonlanan *Gca* TK4 MA geni, *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS'de ekspres edildi. N-ucunda histidin kuyruğu (6xhis tag) içeren rekombinant protein, Nikel afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. SDS-PAGE sonucunda, saflaştırılan proteinin tek bir cins polipeptitten oluştuğu belirlendi. Yapılan teorik hesaplamada, histidin kuyruğu içeren rekombinant proteinin alt birim molekül ağırlığının 70,03 kDa olduğu bulundu. Enzim aktivitesi  $\beta$ -siklodekstrin substratı varlığında belirlendi. Enzimin optimum pH ve sıcaklığının, sırasıyla 7,0 ve 50 °C olduğu tespit edildi. Rekombinant enzimin, 4 ve 50 °C'lerde, pH 3,0-9,0 aralığındaki tamponlarda ayrı ayrı 7 gün inkübe edilmesiyle yapılan pH kararlılığı çalışmasında, enzimin 50 °C'de daha yüksek bir kararlılığa sahip olduğu görüldü. Enzimin, 90 °C'de 7 gün inkübe edildiğinde aktivitesini %20 oranında koruduğu gözlemlendi. Reaksiyon ortamına nihai konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  ilave edildiğinde aktivitede kısmen bir azalma olduğu,  $\text{Mn}^{2+}$  ilave edildiği durumda ise aktivitede önemli ölçüde artış olduğu tespit edildi. Ayrıca, reaksiyon karışımlarına %1 nihai konsantrasyonda SDS ve EDTA ilave edildiğinde enzim aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, elde edilen rekombinant *Gca* TK4 MA'nın, ısıl ve pH kararlılığı ve diğer özellikleri açısından endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4, Maltojenik Amilaz, Termofilik Bakteri, Rekombinant DNA, Protein Saflaştırma, Karakterizasyon



## SUMMARY

### **Cloning, Expression and Characterization of a Maltogenic Amylase of *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4**

In this study, supported by TUBITAK (Project number is 106T696), a genomic DNA library was made from thermophilic *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 strain. The whole DNA sequence of a maltogenic amylase (*Gca* TK4 MA) gene consisting of 1740 bp was determined by performing inverse PCRs. Amino acid sequence alignments were done by using BLAST programme. The results indicated that the amino acid sequence of the *Gca* TK4 MA was highly similar to *Bacillus thermoalkalophilus* MA and *Geobacillus stearothermophilus* MA in the ratios of 86% and 77%, respectively. The gene was cloned into pET28a(+) vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS with his-tagged (6xhis tag) at the N-terminus. The protein was purified by using one-step nickel affinity chromatography. SDS-PAGE showed that the purified protein was only one kind of polypeptide chain. The calculated subunit molecular weight of the his-tagged recombinant protein was 70.03 kDa. The enzyme activity was determined by using  $\beta$ -cyclodextrine as a substrate. pH and temperature optima of the enzyme were determined as 7.0 and 50 °C, respectively. When the enzyme was separately incubated at 4 °C and 50 °C in the buffer solutions (pHs ranging from 3.0-9.0) for 7 days, it showed higher stability at 50 °C than 4 °C. When the enzyme was incubated at 90 °C for 7 days, enzyme retained about 20% of its original activity. The activity of recombinant *Gca* TK4 MA was partially inhibited by  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  metal ions at 5 mM final concentration. When  $\text{Mn}^{2+}$  was used, the activity highly increased. Moreover, enzyme activity was significantly inhibited by SDS and EDTA at the final concentration of 1%. It is clear from the present results that the pH- and thermo- stabilities and other biochemical features of the recombinant enzyme make it potential for industrial applications.

**Key Words:** *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4, Maltogenic Amylase, Thermophilic Bacteria, Recombinant DNA, Protein Purification, Characterization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1	$\alpha$ -, $\beta$ - ve $\gamma$ - siklodekstrin yapıları ..... 11
Şekil 2	Akarboz yapısı ..... 12
Şekil 3	CDaz'ın 3 boyutlu yapısı. .... 13
Şekil 4	Neopullulanazın 3 boyutlu yapıları. .... 14
Şekil 5	CD-parçalayan enzimler için önerilen hidroliz ve transglikozilasyon modeli..... 18
Şekil 6	<i>Thermus</i> suşundan elde edilen maltojenik amilazın reaksiyon mekanizması ..... 22
Şekil 7	ThMA dimer kompleksinin kurdele diyagramı. .... 25
Şekil 8	pUC18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini ..... 32
Şekil 9	pGEM-T Easy vektörünün haritası ..... 33
Şekil 10	pGEM-T Easy vektörünün promotörü ve çoklu klonlama bölgesi..... 34
Şekil 11	pET-28a(+) vektörünün haritası ..... 35
Şekil 12	pET-28a(+) vektörünün Lac operatörünü, ribozom bağlanma bölgesini, His Tag ve T7 Tag bölgelerini gösteren sırası ..... 36
Şekil 13	<i>G. caldxylolyticus</i> TK4 genomik DNA'sının <i>EcoR</i> I ile kesilerek gDNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi ..... 42
Şekil 14	MA geninin tamamını çoğaltabilmek amacıyla kullanılan ileri ve geri primerlerin nükleotit sıraları. .... 54
Şekil 15	MA saflaştırılması amacıyla kullanılanMagneHis Protein Saflaştırma sisteminin şematik gösterimi ..... 58
Şekil 16	Birinci invers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. .... 66
Şekil 17	<i>G. caldxylolyticus</i> TK4 MA geninin 681 bç'lik bölgesini içeren kısmı.. 67
Şekil 18	İkinci invers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü..... 68
Şekil 19	MaF3, MaR3, MaF2, MaR2 ve MaF1 primerleriyle yapılan invers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü..... 69
Şekil 20	<i>G. caldxylolyticus</i> TK4'ün MA gen dizini..... 70
Şekil 21	<i>Gca</i> TK4 MA geninin pET28a(+) vektörüne aktarıldığı bölgenin şematik olarak gösterimi..... 71
Şekil 22	PCR ile tamamı çoğaltılan <i>Gca</i> TK4 MA geninin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. .... 71

Şekil 23	<i>G. caldxylyolyticus</i> TK4 MA DNA ve protein sırası .....	73
Şekil 24	<i>G. caldxylyolyticus</i> TK4 MA'nın amino asit sırasının <i>Bacillus thermoalkalophilus</i> maltojenik amilazı ve <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> neopululanazı ile karşılaştırılması .....	75
Şekil 25	SDS-PAGE elektroforezi.....	80
Şekil 26	Doğal PAGE elektroforezi .....	81
Şekil 27	$\beta$ -CD'nin <i>Gca</i> TK4 MA'la reaksiyonu sonucu oluşan parçalanma ürünleri .....	82
Şekil 28	<i>Gca</i> TK4 MA'ın pH bağımlılık eğrisi .....	83
Şekil 29	<i>Gca</i> TK4 MA'ın sıcaklık bağımlılık eğrisi .....	84
Şekil 30	<i>Gca</i> TK4 MA aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi.....	85
Şekil 31	<i>Gca</i> TK4 MA için Lineweaver-Burk eğrisi.....	86
Şekil 32	<i>Gca</i> TK4 MA'ın ısı kararlılık eğrisi.....	87
Şekil 33	<i>Gca</i> TK4 MA'ın 4 °C'deki pH kararlılık grafiği.....	88
Şekil 34	<i>Gca</i> TK4 MA'nın 4 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi....	88
Şekil 35	<i>Gca</i> TK4 MA'ın 50 °C'deki pH kararlılık grafiği.....	89
Şekil 36	<i>Gca</i> TK4 MA'ın 50 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.....	89

## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Genetik olarak değiştirilmemiş mikroorganizmalardan ticari olarak elde edilen bazı proteinler .....	3
Tablo 2. Isıl kararlı enzimlerin biyoçevrim reaksiyonları ve uygulamaları .....	7
Tablo 3. CDaz, maltojenik amilaz ve neopullulanazın karakteristik özellikleri ...	19
Tablo 4. <i>G. caldxylolyticus</i> TK4 Suşunun bazı biyokimyasal özellikleri .....	26
Tablo 5. Kullanılan cihazlar .....	28
Tablo 6. Kullanılan enzimler .....	29
Tablo 7. Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler .....	29
Tablo 8. Maltojenik amilaz geninin tamamını çoğaltmak amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerlerler .....	30
Tablo 9. Çalışmada kullanılan klonlama ve ekspresyon hücreleri .....	30
Tablo 10. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler .....	31
Tablo 11. İnvrs PCR'da kullanılan kimyasallar .....	52
Tablo 12. İnvrs PCR uygulama şartları.....	52
Tablo13. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler .....	55
Tablo 14. PCR reaksiyonun şartları .....	55
Tablo 15. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları .....	60
Tablo 16. Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları .....	61
Tablo 17. <i>G. caldxylolyticus</i> TK4'den elde edilen <i>Gca</i> TK4 MA'nın amino asit sırasının diğer türlerdeki proteinlere benzerliği.....	74
Tablo 18. <i>Gca</i> TK4 MA'nın kullanılan substratlar ile elde edilen aktivite değerleri	81
Tablo 19. <i>Gca</i> TK4 MA üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi .....	85
Tablo 20. <i>Gca</i> TK4 MA aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi .....	90
Tablo 21. <i>Gca</i> TK4 MA aktivitesi üzerine bazı kimyasalların iyonlarının etkisi ...	90

## SEMBOLLER DİZİNİ

amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum persülfat
bç	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumin
CD	: Siklodekstrin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNS	: 3,5-Dinitrosalisilikasit
dNTP	: Deoksinükleozit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
gDNA	: Genomik DNA
IPTG	: İzopropil- $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozid
kDa	: Kilodalton
LB	: Luria-Bertani
LBA	: Luria-Bertani Agar
MA	: Maltojenik amilaz
OD	: Optik yoğunluk
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tm	: Erime sıcaklığı
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
U	: Ünite
U/mg protein	: Ünite/miligram protein
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indol- $\beta$ -D-galaktopiranozid

## 1.GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Enzimlerin birçok uygulamadaki rolü oldukça uzun süreden beri bilinmektedir. Ortaya çıkışları, mikroorganizmalardaki enzimlerin ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde kullanılmasıyla yakından ilişkilidir. Isıl kararlı enzimler şimdiye kadar başlıca termofilik organizmalardan izole edilmiştir ve kendilerine has üstün kararlılıklarından dolayı birçok ticari uygulamada kullanılmışlardır (Haki ve Raksit, 2003). Bu alandaki gelişmeler oldukça fazla sayıdaki termofilik mikroorganizmanın dünyanın farklı yerlerindeki ekolojik bölgelerden elde edilmesi ve bu enzimlerin, söz konusu mikroorganizmalardan uygun özüt hazırlama metotlarıyla açığa çıkarılmasıyla mümkün olmaktadır (Bharat ve Hoondal, 1998; Antranikian vd., 1987; Bauer vd., 1999; Kohilu vd., 2001).

Endüstride kullanılan enzimler için ısıl kararlılık en önemli özelliklerden biridir. Bu sebeple, termofilik canlılar, ısıl kararlı maltojenik amilazın elde edilmesi için oldukça önemli kaynaklardır. Ancak maltojenik amilazın bu organizmalarda düşük miktarda üretilmesinden dolayı bu canlıların direkt olarak kullanımları pek uygun değildir. Bundan dolayı, prokaryotik sistemlerde yabancı proteinlerin fazla miktarda üretimiyle gerçekleştirilen moleküler yaklaşımlar, maltojenik amilazın ekonomik açıdan ciddi miktarda üretimi için oldukça iyi bir alternatif olmaktadır. Diğer amilazların aksine çok az miktarda maltojenik amilaz geni *Bacillus* ve *Thermus* türlerinden klonlanmıştır (Cho vd., 1999; Kim vd., 2003).

Termofillerden elde edilen ısıl kararlı enzimler, kendi doğalarında var olan ısıl kararlılıkları ve bunun yanında denatüre edici kimyasallara, uç noktadaki asidik ve bazik şartlara, deterjanlara, organik çözücülere ve inhibitörlere karşı dayanıklı olmalarından dolayı oldukça fazla sayıda ticari uygulamada kullanılmaktadır. Bu ısıl kararlı enzimler içinde maltojenik amilazlar endüstride en yaygın kullanılan amilazlardır (Liu vd., 2006). Yiyeceklerle ilişkili endüstrilerde aminoasitlerin sentezinde (Satosi vd., 2001) yine ısıl kararlı enzimler kullanılmaktadır. Bunun yanında, petrol, kimyasal ve biber endüstrisinde sülfür bulaşması sonucu oluşan kirliliğin ve gliserolden oluşan 1,3-propandiol gibi kimyasalların

zehirli etkilerinin giderilmesinde (Peter, vd., 2001) ve dibenzotiyofen gibi bileşiklerin biyoparçalanmasında bu enzimlerden faydalanılmaktadır (Bahrami, vd., 2001).

## 1.2. Rekombinant Enzim Üretiminin Avantajları

Düşük doğal ekspresyon seviyeleri, birçok proteinin doğal kaynaklarından izole edilmesini ve çalışılmasını zorlaştırmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile birlikte, bu teknik zorluğun üstesinden gelinmektedir. Günümüzde, temel olarak, fonksiyonu bilinen veya bilinmeyen herhangi bir proteini kodlayan gen veya cDNA izole edilebilmekte ve uygun bir ekspresyon sistemine klonlanabilmektedir. Bugün, birçok protein gerek endüstriyel anlamda ve gerekse akademik anlamda olsun rekombinant olarak üretilebilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi protein üretiminde, rekombinant olmayan proteinlere göre 3 önemli avantaja sahiptir;

- Kaynak kullanımı probleminin çözülmesi: Bazı proteinlerin (sitokinler gibi) doğal ortamlarında düşük konsantrasyonlarda üretilmesi, bu proteinlerin büyük miktarlarda üretilme zorluğunu arttırmakta veya imkânsız hale getirmektedir. Uygun ekspresyon sistemlerinin kullanımı ile bu problem aşılmaktadır.
- Kaynak güvenliği probleminin çözülmesi: Birçok protein, doğada tehlikeli veya patojenik türler tarafından üretilirler (yılanlar ve çeşitli mikrobiyal patojenler gibi). Bu durum, ham maddelerin bu organizmalardan elde edilmesini zorlaştırmakta ve elde edilecek son üründe zehirli bileşenlerin var olma ihtimalini artırmaktadır. Patojen ve zehirli olmayan konakçı bir hücrede rekombinant üretim yardımıyla bu zorlukların üstesinden gelinebilmektedir.
- Protein mühendisliği ile, proteinlerin amino asit sırasında hedeflenen değişimler yapılabilir.

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile birlikte, bir proteinin aminoasit sırasında değişiklikler yapılabilir. Önceden belirlenmiş spesifik aminoasitleri kodlayan nükleotit sıralarının kontrollü olarak değiştirilmesini gerektiren bu işlem, bölge-spesifik mutasyon veya protein mühendisliği olarak tanımlanmaktadır. Bu değişimler, ekleme (insertion), çıkarma (deletion) veya yer değiştirme (substitution) şeklinde olabilmektedir. Son zamanlarda, enzim mühendisliği ile birlikte katalitik aktivite ve/veya ısı ve pH kararlılığı artırmak için oldukça fazla çaba harcanmaktadır (Walsh, 2002).

### 1.3. Protein Kaynağı Olarak Mikroorganizmalar

Endüstriyel kullanımı olan birçok protein rekombinant olmayan mikrobiyal kaynaktan üretilmektedir. Bu proteinlerin çoğu “genellikle güvenli (generally recognized as safe, GRAS)” olarak sınıflandırılan sınırlı sayıdaki mikroorganizma tarafından sentezlenirler (Tablo 1).

Tablo1. Genetik olarak değiştirilmemiş mikroorganizmalardan ticari olarak elde edilen bazı proteinler

Protein	Kaynak	Kullanım Alanı
Streptokinaz	Hemolitik <i>Streptococci</i> 'ler	Trombolik ajan (kan pıhtılarını parçalar)
Tetanoz toksoid	<i>Clostridium tetani</i> 'den elde edilen formaldehit uygulanmış toksin	Tetanoz aşısı
Asparaginaz	<i>Erwinia chrysanthemi</i> veya <i>Escherichia coli</i>	Kanser tedavisi
Glukoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>	Kan glukoz seviyesinin belirlenmesi
Alkol dehidrojenaz	<i>Saccharomyces cerevisae</i>	Kan alkol seviyesinin belirlenmesi
Amilazlar	<i>Bacilli</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> türleri	Nişastanın parçalanması
Proteazlar	<i>Bacilli</i> ve <i>Aspergilli</i> türleri	Gıda ve deterjan gibi alanlarda proteinlerin parçalanması
Selülazlar	<i>Trichoderma</i> türleri, <i>Aspergillus niger</i>	Selülozun parçalanması

Bu organizmalar, diğer *Bacilli*, *Lactobacilli* ve *Streptomyces* türlerine ilave olarak *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* gibi bakterileri içermektedir. GRAS olarak sınıflandırılan mantarlar ise *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* ve *Rhizopus* türlerinin üyelerini içermektedir. *Saccharomyces cerevisae* gibi mayalar da genelde güvenli olarak tanımlanırlar. GRAS olarak tanımlanan mikroplar, patojen ve toksik olmayan ve genellikle antibiyotik üretmeyen organizmalardır. Mikroorganizmalar, kısa sürede oldukça fazla miktarlarda üretiltikleri için protein kaynağı açısından oldukça ilgi çekicidirler. Bu sebeple, istenilen proteini bol miktarda ve sürekli olarak üretebilen kaynak olmaktadır. Mikrobiyal proteinler, genellikle bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen benzer



proteinlere oranla daha kararlıdır. Bunun ötesinde, mikroplar genetik olarak hayvan ve bitkilerden daha kolay değiştirilebilirler.

#### **1.4. Termofilik Mikroorganizmalar**

Dünya üzerinde yaşıyan canlılara bakıldığında bunların, bakteriler (öbakteriler), arkebakteriler ve ökaryotlar olmak üzere üç grup altında toplandığı görülmektedir (Woese vd., 1990). Bakteriler, büyüebildikleri sıcaklık aralıklarına göre sakrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sakrofiller, -10 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda büyüeyebilirler fakat optimum büyüme sıcaklıkları 15 °C civarındadır. Mezofiller, 20-45 °C arasında büyüeyebilme yeteneğine sahiptirler ve insan sağlığı açısından patojen olan bakterilerde bu sınıf dâhildir. Termofiller ise genel olarak 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hatta kaynar sularda bile yaşayabilen bakteri grubudur. (Brock, 1985; Li vd., 2005). Termofil organizmalar, termotolerant veya termofil, hipertermofil ve ekstrem termofil olmak üzere üç grup içerisinde sınıflandırılmaktadırlar (Burhan vd., 2003). Hipertermofiller 80-110 °C arasında yaşayabilen canlılardır. Kara ve denizdeki sıcak ortamlardan izole edilen bu organizmalardan elde edilen enzimler (hipertermofilik enzimler) yüksek ısı kararlılığına sahiptirler ve 70 °C'nin üzerinde optimal aktivite gösterirler. Bu enzimlerden bazıları 110 °C'nin üzerinde de aktivitelerini koruyabilmektedirler (Vieille vd., 1996). Termofilik organizmaların en iyi büyüdüğü sıcaklık aralığı ise 50 °C ile 80 °C arasındadır. Bu organizmalardan elde edilen enzimler (termofilik enzimler) hipertermofilik ve mezofilik enzimlerin arasında bir ısı kararlılık özelliği gösterirler ve genellikle 60 °C ve 80 °C arasında optimum aktiviteye sahiptirler. Termofilik ve hipertermofilik enzimler yüksek sıcaklıklarda aktif olduklarından dolayı genellikle 40 °C'nin altındaki sıcaklıklarda aktivite göstermezler (Vieille ve Zeikus, 2001).

##### **1.4.1. Termofillerin Yüksek Sıcaklıklara ve Denaturasyona Karşı Dayanıklılıkları**

Mikroorganizmalar, yaşayan tüm canlılar gibi canlılıklarını sürdürebilmek için yaşadıkları ortama adapte olmak zorundadırlar. Termofillerin içerdikleri proteinlerin yüksek sıcaklığa, denaturasyona ve proteolize karşı dayanıklı oldukları bilinmektedir (Kumar ve Nussinov, 2001). Şaperonlar olarak bilinen özelleşmiş proteinler, bu

organizmalar tarafından bolca üretilir ve bunlar denaturasyondan sonra proteinlerin tekrar doğal formlarında katlanmasına ve fonksiyonlarını tekrar kazanmalarına yardımcı olurlar (Everly ve Alberto, 2000). Termofillerin hücre membranları doymuş yağ asitlerinden oluşmuştur. Doymuş yağ asitleri hücreye hidrofobik bir ortam sağlar ve bu durum yüksek sıcaklıklarda hücrenin yaşama şansını artırır (Herbert ve Sharp, 1992). Termofillerde revers DNA giraz yardımıyla oluşturulan süper sarmal DNA yapısı mevcuttur (Lopez, 1999). Bu, DNA'nın çift sarmal yapısının bozulma noktasını en azından organizmanın çoğalma sıcaklığına kadar yükseltir. Ayrıca termofiller, ısı dayanıklılığı olmayan organizmalarla elektrostatik, disülfür köprüleri ve hidrofobik etkileşimlerini artırarak yüksek sıcaklığa dayanıklı hale gelebilirler (Kumar ve Nussinov, 2001).

#### **1.4.2. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı**

Termofilik organizmalar, biyoteknoloji açısından büyük faydalar sağlamaktadır (Brock, 1986). Termofillerin biyoteknolojiye sağladığı katkılar; termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretimi, fermentasyon yapabilen bu organizmalar kullanılarak genetik manipulasyonların yapılabilmesi ve termofil enzimlerin potansiyel olarak endüstride kullanılması olarak sıralanabilir. Biyoteknoloji açısından termofilik organizmaların en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardan çok daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretebilmeleridir. Buna ilave olarak, termofillerden elde edilen enzimler, normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklıdır ve bu sebeple bu organizmalardan elde edilen ürünler daha uzun ömürlü olmaktadır (Brock, 1986).

Termofilik organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerin meydana getirilmesinde etkin olarak kullanılan aşırı şartlarda fonksiyonel olabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir. Bu enzimlerden bazıları saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp, mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, ekstrasellüler-polimer-parçalayan enzimler (amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikozil transferazlar, selülozlar, ksilanazlar, kitinazlar, proteazlar) ve gıda, kimya ve farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler aynı zamanda çok sayıdaki farklı deterjan ve çözücülere karşı da dirençlidir (Aguilar, 1996).

Termofilik enzimlerin en çok kullanıldığı alanlardan birisi de karbohidratların türevlendirilmesidir. Bununla birlikte halen bu modifikasyon işlemini daha spesifik ve daha etkili bir şekilde katalizleyebilecek enzimler üzerindeki araştırmalar devam etmektedir. Son zamanlarda, karbohidratlara bağımlı olan endüstri kollarında ilave özelliklere sahip olan enzimlere, özellikle de termofilik enzimlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Karbohidratları modifiye edebilen enzimler, kâğıt endüstrisinde olduğu kadar besin endüstrisinde de hidroliz olaylarının meydana getirilmesinde kullanılmaktadır (Priest, 1984). Ayrıca bu enzimler karbohidratlara bağımlı olan bazı bileşiklerin türevlendirilmesinde ve sentezlerinde de aktif olarak yer almaktadır. Bu enzimlere amilazlar, pullulanazlar,  $\alpha$ -glukozidazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glukoz izomerazlar, ksilanazlar ve lipazlar örnek olarak verilebilir (Aguilar, 1996).

### 1.5. Isıl Kararlı Enzimler

Termozimler olarak da adlandırılan termofilik ve hipertermofilik enzimler, ekstremofillerden elde edilen ve ekstreozimler olarak adlandırılan diğer bir enzim sınıfının üyesidirler (Vieille vd., 1996). Termozimler, mezofilik enzimlerin veya kimyasalların yerini alarak, birçok endüstriyel uygulamada kullanılabilirler. Bu durum, proseslerin optimize edilmesinde yeni avantajlar sağlamaktadır (Bruins vd., 2000). Ekstreozimler yüksek tuz içeren ortamlarda (halozimler), yüksek alkali ortamlarda (alkalozimler) ve diğer uç şartlarda (basınç ve asitlik vb.) fonksiyon gösterebilirler (Adams vd., 1995; Lowe vd., 1993). Isıl kararlı enzimler (termofilik ve hipertermofilik enzimler) zorlu endüstriyel uygulamalara en iyi uyumu sağladıklarından ve sahip oldukları özelliklerden dolayı (yüksek sıcaklıklarda kararlı ve aktif olmaları), mezofilik veya sakrofilik enzimlere oranla çok daha büyük biyoteknolojik avantajlara sahiptirler (Li vd., 2005; Leushner ve Antranikan, 1995; Fredrich ve Antrakian, 1996; Vieille ve Zeikus, 2001). Bu avantajlar şu şekilde ifade edilebilir;

- Mezofilik konakçılarda ekspres edildiklerinde ısı muamelesi ile saflaştırılmaları çok kolaydır.
- Denatüre edici kimyasallara (bir çözücü veya guanidinyum hidroklorür gibi) karşı dirençli olmaları, ısıl kararlılıkları ile ilişkilendirilir.

- Enzimatik reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi ile yüksek konsantrasyonda substrat kullanımı, daha düşük viskozite, daha az mikrobiyal kontaminasyon riski ve genellikle daha yüksek reaksiyon hızları elde edilir (Vieille ve Zeikus, 2001).
- Reaksiyonun yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesiyle viskozitenin azalıp substrat difüzyonunun artmasıyla birlikte ürün oluşumu da artar. Bu gibi enzimler ayrıca protein mühendisliği için önemli olan ısıl kararlılığın ve aktivitenin anlaşılmasında model olarak kullanılabilirler (Mozahev, 1993; Krahe vd., 1996).

Biyokatalitik çevrimlerde ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan ısıl kararlı enzimlerin bazıları Tablo 2. de gösterilmiştir.

Tablo 2. Isıl kararlı enzimlerin biyoçevrim reaksiyonları ve uygulamaları

Enzim	Sıcaklık aralığı (°C)	Biyoçevrim	Uygulama
$\alpha$ -Amilaz (Bakteriyal)	90-100	Nişasta→Deksroz Şurup	Nişasta hidrolizi, fırıncılık, deterjan
$\alpha$ -Amilaz (Mantar)	50-60	Nişasta→Deksroz Şurup	Maltoz üretimi
Pullulanaz	50-60	Nişasta→Deksroz Şurup	Glukoz şurubu üretimi
Kitinaz	65-75	Kitin→Kitibioz	Gıda, kozmetik, eczacılık
Selulaz	45-55	Seluloz→Glukoz	Seluloz hidrolizi, deterjanlarda polimer parçalanması
Lipaz	30-70	Yağ uzaklaştırılması, hidrolizi, interesterifikasyon	Eczacılık, kozmetik, deri endüstrisi

Filogenetik çeşitliliklerin dışında, hipertermofilik ve mezofilik enzimleri ayıran tek şey kararlı ve aktif oldukları sıcaklık aralıklarıdır. Diğer bir deyişle, hipertermofilik ve mezofilik enzimler birbirlerine oldukça benzerlik gösterirler. Şöyle ki;

- Hipertermofilik ve mezofilik proteinlerin aminoasit sıraları tipik olarak %40-85 oranında benzerlik gösterirler.
- Bu proteinlerin üç boyutlu yapıları birbiri üzerine çakışabilmektedir

- Katalitik mekanizmaları birbirinin aynısıdır (Vieille ve Zeikus, 2001).

### 1.6. Amilolitik Enzimler

Nişasta endüstrisi, hidroliz ve modifikasyon amacıyla enzimlerin en çok kullanıldığı alanlardan biridir. Nişasta polimerinin, diğer benzer polimerler gibi tamamının hidroliz olması için enzim kombinasyonlarına ihtiyaç vardır. Bunlar  $\alpha$ -amilaz, glukoamilaz, veya  $\beta$ -amilaz ve izoamilaz veya pullulanazı içerirler (Poonam ve Dalel, 1995). Doğada temel olarak dört grup nişasta parçalayıcı enzim bulunmaktadır. Bunlar; endo-amilazlar, ekzo-amilazlar, dallanmayı parçalayan enzimler ve transferazlar olarak sıralanabilir (van der Maarel vd., 2002; Muralikrishna ve Nirmala, 2005).  $\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1) iyi bilinen bir endo-enzimdir. Amiloz ve amilopektin zincirindeki i (endo-)  $\alpha$ ,1-4 glikozidik bağlarını rastgele tarzda hidroliz ederek doğrusal ve dallanmış yapıda oligosakkaritler oluştururlar. Ekzo-enzimler, substratın indirgen olmayan ucuna saldırırlar ve oligo ve/veya monosakkaritler oluştururlar. Ekzo-amilazlardan  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2) yalnızca  $\alpha$ ,1-4 glikozidik bağlarını parçalarken, amiloglukozidaz veya glukoamilaz (EC 3.2.1.3) ile  $\alpha$ -glukozidaz (EC 3.2.1.20),  $\alpha$ ,1-4 ve  $\alpha$ ,1-6 glikozid bağlarının her ikisini de hidrolizleyebilir. Ekzo-amilazlar, amilozun ve amilopektinin dış glukoz birimlerine karşı aktivite gösterdiklerinden yalnızca glukoz, maltoz ve  $\beta$ -dekstrinlerin oluşumunu sağlarlar. Ayrıca,  $\beta$ -amilaz ve glukoamilaz enzimleri, serbest maltoz birimlerinin anomerik konfigürasyonlarını  $\alpha$ 'dan  $\beta$ 'ya çevirebilirler (Pandey vd., 2000). Endo-amilazlara ek olarak, transglikozilasyon aktivitesine sahip, siklodekstrin glikoztransferaz (CGTaz) (EC 2.4.1.19); maltojenik amilaz (EC 3.2.1.133) ve maltooligosakkarit oluşturan amilazlar (maltotetroz ve maltohegzoz oluşturan amilazlar) bulunmaktadır (van der Maarel vd., 2002).

Nişasta hidrolizleyen enzimler arasındaki üçüncü grup olan dallanmayı parçalayan enzimler, yalnızca  $\alpha$ ,1-6 glikozidik bağlarını parçalayan izoamilaz (EC 3.2.1.68) ve pullulanaz tip I (EC 3.2.1.41)'dir. Pullulanaz, amilopektin ve pullulandaki  $\alpha$ ,1-6 glikozidik bağlarını hidroliz edebiliyorken, izoamilaz yalnızca amilopektindeki  $\alpha$ ,1-6 bağlarını parçalayabilir.

Nişasta hidrolizleyen enzimlerin dördüncü grubunu transferazlar oluşturmaktadır. Bu enzimler verici (donör) bir moleküldeki  $\alpha$ ,1-4 glikozidik bağını parçalayarak bu molekülün

bir kısmını bir alıcıya (akseptör) transfer ederler ve yeni bir glikozidik bağ oluştururlar. Amilomaltaz (EC 2.4.1.25) ve siklodekstrin glikoziltransferaz (EC 2.4.1.19) bu enzim grubundandır. Nişasta hidrolizleyen enzimler, dünya enzim piyasasının yaklaşık %30'unu teşkil etmektedirler (Van der Maarel vd., 2002).

Bu güne kadar nişasta endüstrisinin ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla birçok kaynaktan amilolitik enzimler izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Isıl kararlı  $\alpha$ -amilaz çok uzun zaman önce *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis*'ten izole edilmiştir. Katalitik aktivitesi 60 °C'nin üzerinde olan ve ticari olarak kullanılan  $\beta$ -amilaz çeşitli *Bacillus* türlerinden izole edilmiştir (Brown, 1987).

İki iyi bilinen amilolitik enzim olan Termamyl ve Fungamyl ticari olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler farklı seviyelerde dekstroz içeren şurupların ve glukoz şurubunun üretilmesinde kullanılmaktadırlar (Chitradon vd., 2000).

Nişasta endüstrisinin ilgi alanlarından biri de  $\alpha$ -amilazların kalsiyum gereksinimidir. Birçok nişasta hidrolizleyen enzimin aktivitesi kalsiyum bağımlıdır. Kalsiyumdan bağımsız ve asit kararlı  $\alpha$ -amilazlar, protein mühendisliği yardımıyla bölge-spesifik mutasyonlarla birlikte üretilebilmektedir (Hashida ve Frantzen, 2000).

$\alpha$ -amilaz ailesi (glikozid hidrolaz Family 13), nişastanın hidrolizinde rol oynayan bir sınıfı teşkil eder. Bu ailenin üyeleri ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> katlanmalı çoklu alt birimlerine sahiptir ve substrat özgünlüğü için oldukça geniş bir yapısal esneklikleri vardır (Svensson, 1994; Henrissat, 1991). Çok sayıda klonlama çalışması sonucunda elde edilen sıra analizlerinin kıyaslanması, bu enzimlerin özelliklerinin geliştirilmesini ve özellikle substrat özgünlüklerinin anlaşılmasını sağlamıştır (Svensson vd., 1999; Vihinen ve Mantsala, 1989). Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, siklodekstrinaz (CDaz), maltojenik amilaz ve neopullulanazın Family 13'e dahil olduğu ayrıca, siklodekstrin, pullulan ve nişastayı hızlı bir şekilde hidroliz ettikleri açığa çıkmıştır. Buna karşılık  $\alpha$ -amilazlar, yalnızca nişastayı hidroliz ederler.  $\alpha$ -amilazların aksine siklodekstrin parçalayan enzimler için nişastanın zayıf bir substrat olduğu görülmüştür (Bender, 1993). Maltojenik amilazın ve CDaz'ın hidrolitik aktivitelerinin yanında önemli derecede transglikozilasyon kapasitesine de sahip oldukları tespit edilmiştir. Birçok Family 13 üyesinin primer yapıları kıyaslandığında, ilgili enzimlerin geniş bir sıra çeşitliliklerinin olduğu ve oldukça korunmuş 4 kısa ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> katlanmalı katalitik bölgesine sahip oldukları belirtilmiştir. CDaz, maltojenik amilaz ve neopullulanazın, %40-60 oranında sıra benzerliği olduğu ve substrat

özgünlükleriyle diğer Family 13 üyelerinden ayrıldıkları bildirilmiştir. Siklodekstrin (CD) parçalayan enzimlerin sıraları incelendiğinde, N-terminal uçlarında var olan yaklaşık 130 tane aminoasitin  $\alpha$ -amilazlarda bulunmadığı gözlenmiştir. Family 13'e dâhil çok az sayıdaki enzim; izoamilaz, pullulanaz ve dallanmayı parçalayan enzim, N-terminal uçlarında farklı ilave bölgeleri içerirken; siklodekstrin glukotransferaz (CGTaz) ve maltotetroz hidrolaz (G4-amilaz) sadece C-terminal uçlarında ilave aminoasitlere sahiptirler. Bunun yanında, pullulan-hidrolizleyen enzimlerin sınıflandırılmasında bir takım güçlükler yaşanmaktadır. Bu güçlükler, pullulanazın sadece  $\alpha$ -1,6 bağlarını, neopullulanazın hem  $\alpha$ -1,4 ve hem de  $\alpha$ -1,6 bağlarını, maltojenik amilazların özel bir türünün ise  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6 bağlarını parçalarken bu enzimlerin aynı zamanda CD'ler üzerinde de hidrolitik aktiviteye sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Henrissat, 1991). Hem CD'leri ve hem de pullulanı parçalayan enzimler, benzer katalitik özelliklere sahip olmasına ve oldukça yüksek oranda aminoasit sırası benzerliğine sahip olmalarına rağmen neopullulanaz, CDaz ve maltojenik amilaz gibi farklı isimlerle sınıflandırılmaktadırlar (Park vd., 2000).

### **1.6.1. Neopullulanaz, Maltojenik Amilaz ve Siklodekstrinaz'ın Farklılıkları**

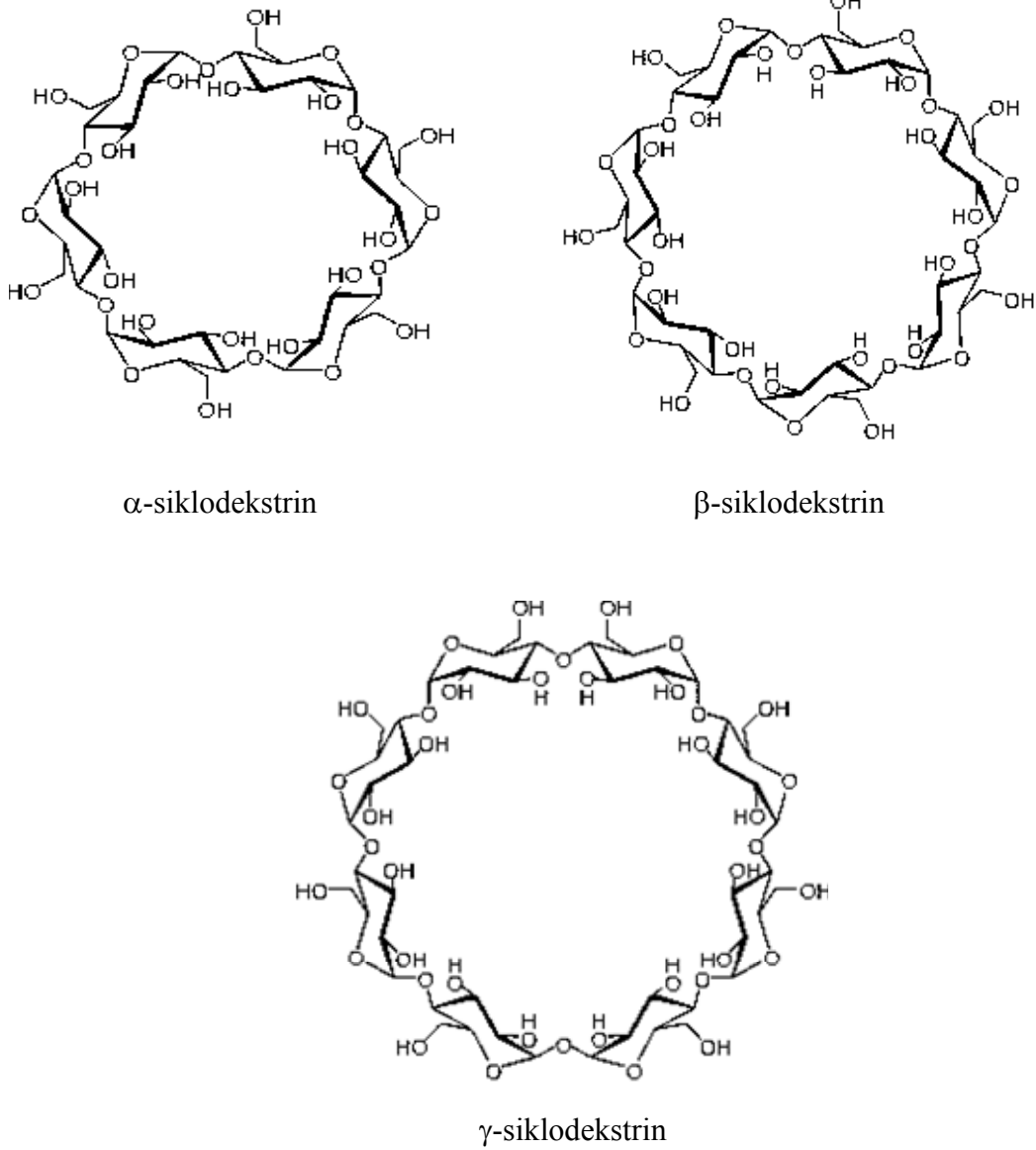
Genelde bu enzimler CD'leri ve pullulanı parçalayarak benzer primer yapı ve substrat özgünlüğü göstermelerine rağmen, substratları parçalama etkinliklerine göre birbirlerinden ayrılırlar.

- Siklomaltodekstrinaz (EC 3.2.1.54) ve maltojenik amilaz CD'leri, pullulan ve nişastaya göre oldukça hızlı parçalar.
- Neopullulanaz (EC 3.2.1.135) ise pullulanı hidroliz eder.

#### **1.6.1.1. Siklomaltodekstrinaz**

Siklodekstrinaz (EC 3.2.1.54; CDaz), CD'leri  $\alpha$ -1,4 bağlarına sahip doğrusal yapıdaki formda oligosakkaritlere parçalar ve bu substratları nişastadan çok daha hızlı parçalayarak diğer  $\alpha$ -amilazlardan kolayca ayrılırlar. Substratları, nişastadan siklodekstrin glukotransferaz (CGTaz; EC 2.4.1.19) yardımıyla üretilen glukozun halkasal

oligomerleridir. CD'lerin 6-8 glukopiranozil biriminden oluşan  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ - formları mevcuttur ve bu substratlar gıda, kozmetik ve eczacılık gibi pek çok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadırlar (Şekil 1) (Kaulpiboon ve Pongsawasdi, 2005).



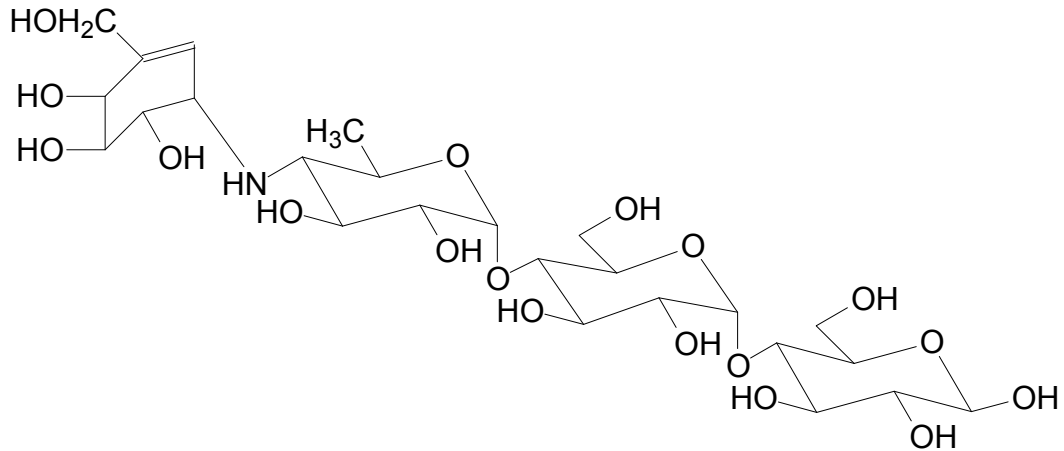
Şekil 1.  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ - siklodekstrin yapıları

CD'lerin, doğrusal maltooligosakkaritlerle kıyaslandıklarında, daha kararlı bir yapıya sahip oldukları görülür. Ancak, CD, maltojenik amilaz ve neopullulanaz gibi spesifik hidrolazlarla kolaylıkla glukoz ve maltoza parçalanırlar. Bunun ötesinde CDaz, CGTaz



gibi nişastadan CD'leri üretemez ancak, her iki enziminde bu substratları parçalayabilme özellikleri vardır (Park vd., 2000).

CDaz, ilk defa rapor edildiği *Bacillus macerans*'dan bu yana *Bacillus coagulans*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E, alkalophilic *Bacillus* sp., *Bacillus sphaericus* E-244, *Bacillus* sp. I-5, *Flavobacterium* sp. ve *Bacillus sphaericus* ATCC7055 gibi çok çeşitli kaynaklardan elde edilmiştir. Bu enzimlerin çoğunun 50 °C'nin altında optimum sıcaklığa sahip olduğu ve ürün olarak CD'lerden başlıca maltoz ürettikleri bildirilmektedir. Moleküler ağırlıkları 60–90 kDa arasında olup, bu değer  $\alpha$ -amilazlardan yüksektir. *Flavobacterium* sp. ve *Bacillus sphaericus*'dan elde edilen enzimler, CD'ler, çözümlü nişasta, pullulan ve amiloz üzerinde oldukça aktif olmalarına karşılık en yüksek aktiviteyi CD'ler üzerinde gösterirler. *Bacillus* sp. I-5 bakterisinden elde edilen CDaz'ın, CD, pullulan, nişasta, ve glikozidazların potansiyel inhibitörü olan akarboz (Şekil 2) ve pseudosakkaritler üzerinde aktivite gösterdiği, ayrıca oldukça önemli derecede de transglikozilasyon aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Kim vd., 1998; Kim vd., 1999).



Şekil.2 Akarboz yapısı

Bu substratlar üzerindeki bağıl aktiviteler türlere göre değişiklik göstermesine rağmen genelde CD $\rightleftharpoons$ malto-oligosakkarit $\gg$ nişasta $\gg$ pullulan şeklinde gerçekleşmektedir. Şekil 3'de CDaz'ın 3boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 3. CDaz'ın 3 boyutlu yapısı. Kırmızı: N-ucu; Mavi: katlanma yapısı; Sarı: C-ucu (Fritzsche vd.,2003).

### 1.6.1.2. Neopullulanaz

Pullulan, maltotirioz birimlerinin  $\alpha$ -1,6 bağlarıyla oluşturduğu doğrusal bir yapıdır. Kendine has yapısı, onu ilgili enzimler için oldukça spesifik yapar. Pullulanı 4 farklı sınıftan enzim hidrolizleyebilir.

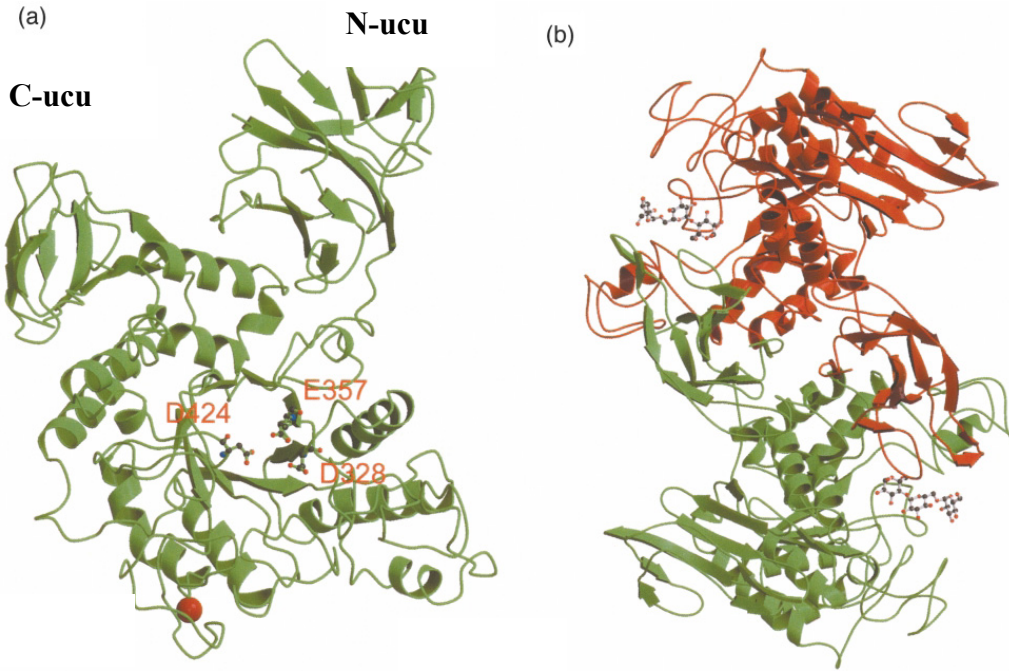
1. Glukoamilaz, indirgen olmayan uçtaki  $\beta$ -D-glukoz birimlerini açığa çıkarır.
2. Pullulanaz,  $\alpha$ -1,6-glikozidik bağlarını parçalayarak maltoz oluşumunu sağlar.
3. İzopullulanaz, özellikle pullulanın tekrarlayan birimlerinin  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını parçalayarak izopanoz oluşturur.

4. Neopullulanaz, tekrarlayan diğer birimlerin  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını parçalayarak pullulandan panoz üretilmesini sağlar (Kruki vd., 1988).

İzopullulanaz nişastayı hidrolizleyemez ve neopullulanazın da nişasta üzerindeki aktivitesi oldukça düşüktür. Bu dört sınıf enzime ilave olarak bakteriyel maltojenik amilaz, *Thermoactinomyces vulgaris* amilaz II (TVAII), ve *B. sphaericus*, *Bacillus sp.* I-5 ve

*Flavobacterium* sp. den izole edilen CDaz'ın da pullulandan neopullulanazda olduğu gibi panoz ürettiği bildirilmiştir (Park vd., 2000).

Yapılan çalışmalar sonucunda, pullulani ve nişastayı parçalayan tek enzimin neopullulanaz olduğu ifade edilmiştir. Kuriki ve arkadaşları (1988), yeni tip hücre dışı pullulan-hidrolizleyen ve neopullulanaz (EC 3.2.135) olarak adlandırılan bir enzim tanımlamışlardır. Neopullulanaz,  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını parçalamasının yanında,  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarına transglikozilasyon reaksiyonlarını katalizlemektedir (Takata vd., 1992). Pullulan, bu enzim tarafından nişastaya göre oldukça etkin bir şekilde hidrolizlenmektedir. CD'ler üzerindeki substrat özgünlüğü şimdiye kadar rapor edilmemiştir. Igarashi ve arkadaşları (1992), tarafından alkalofilik *Bacillus*'dan elde edilen ve klonlanan neopullulanazın 588 amino asit uzunluğunda olduğunu ve nişastaya göre pullulani 3 kat daha hızlı hidroliz ettiğini bildirmişlerdir. *Bacteroides thetaiotaomicron* 95-1'den elde edilen 70 kDa ağırlığındaki enzimin, pullulanın  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlarını parçalayarak panoz üretmesinin yanında  $\beta$ -CD'i de parçaladığı belirtilmiştir (Smith ve Salyers, 1991). Şekil 4'te neopullulanazın 3 boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 4. Neopullulanazın 3 boyutlu yapıları. A: Neopullulanazın monomer yapısı B: Neopullulanazın dimerik yapısı (Hondoh vd., 2003).

### 1.6.1.3. Maltojenik amilaz

Maltojenik amilaz (glukan 1,4- $\alpha$ -maltohidrolaz, EC 3.2.1.133) hücre dışına salgılanmayan, siklodekstrin, nişasta ve pullulani substrat olarak kullanan; çeşitli substratlar üzerinde hem hidroliz hem de transglükosilasyon aktivitesi gösterebilen hidrolaz sınıfı bir enzimdir. Bu enzim, hücre içi olması, nişasta ve pullulana nazaran CD'leri substrat olarak tercih etmesi ve hidroliz aktivitesinin yanında yüksek oranda transglükosilasyon aktivitesine sahip olmasıyla tipik amilazlardan farklılaşır (Kim vd., 1999; Park vd., 2000). Bu enzim grubu, potansiyel inhibitör olan akarbozu hidrolizleyebilir ve aynı zamanda bu molekülü bir alıcı olarak kullanabilir (Park vd., 1998). Bağlı hidrolitik aktivitesi CD'ler>>pullulan $\geq$  çözünür nişasta>akarboz (1200:100:80:50) şeklindedir.

Maltojenik amilaz, substratında bulunan  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını parçalarken aynı zamanda hidrolizlenmiş bu şeker parçalarını diğer bir şeker molekülüne transfer eder. Bu transglükosilasyon ürünleri,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlanma formunda ortaya çıkar. Bu durum dallanmış oligosakkarit karışımlarının ve yeni karbohidratların hazırlanmasında oldukça faydalıdır (Liu vd., 2006; Lee vd., 2003).

### 1.6.1.4. Maltojenik Amilaz İçeren Organizmalar ve Yapılan Çalışmalar

Bugüne kadar izolasyonu ve karakterizasyonu yapılan amilaz sınıfı enzimlerin birçoğunun en önemli özelliği nişasta endüstrisinde çeşitli uygulamalarda kullanılmasıdır. Nişastanın enzim katalizli-hidrolizi, birçok organizmada polisakkaritlerin saklanması ve kullanılmasında anahtar rol oynamaktadır. Birçok endüstriyel reaksiyondaki en önemli görevleri, mısır nişastasından glukoz üretimi esnasında enzimatik hidroliz temeline dayanan sıvılaştırma ve sakarifikasyon uygulamalarıdır. Nişasta aktif enzimler, sıklıkla tekstil ve deterjan endüstrisinde ve giderek artan oranda fırıncılık endüstrisinde bayatlamayı geciktirici olarak kullanılmaktadırlar (Zbigniew vd., 1999).

Diş çürümelerine sebep olmayan fakat sakkarozun istenilen özelliklerini taşıyan yeni tatlandırıcıların geliştirilmesi gıda endüstrisinde giderek artan bir ihtiyaçtır. Maltojenik amilazlar, CD'leri hidroliz etmelerinin yanında transglükosilasyon aktivitesine sahip olduklarından çeşitli alıcı moleküller varlığında  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarına

sahip yeni ürünlerin oluşumunu sağlarlar. Oluşan bu dallanmış oligosakkaritler, neohesperidin, naringin ve sorbitolün karakteristik özelliklerinin ve uygulama alanlarının geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Lee vd., 2003).

*Bacillus stearothermophilus* ET1'den elde edilen maltojenik amilaz, *E. coli*'de klonlanmış ve ekspres edilmiştir. Yapılan DNA sıra analizine göre, *B. stearothermophilus* 69627 Da'luk bir proteini kodladığı ve bu proteinin 590 aminoasitten oluştuğu tespit edilmiştir. Bu enzimin amino asit sırasının *Bacillus licheniformis* maltojenik amilazı, *B. stearothermophilus* neopullulanazı ve alkalofilik *Bacillus* I-5 suşuyla %47 ile %70 arasında bir benzerlik gösterdiği görülmüştür. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında, *B. stearothermophilus* maltojenik amilazının nişasta, pullulan ve CD'ni glukoz, maltoz ve izopanoza parçalayabildiği ancak panoz oluşturamadığı görülmüştür. Bu enzim üzerinde yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda hidrofobikliğinin ve transglikozilasyon aktivitesinin atırıldığı bildirilmektedir (Cha vd., 1998).

*Bacillus stearothermophilus* (BSMA)'dan izole edilen maltojenik amilazdan, transfer reaksiyonu yardımıyla yeni sakkaroz ürünleri geliştirilmiş ve sakkaroz, maltozil-sakkaroz şeklinde modifiye edilmiştir. Transfer reaksiyonu, maltotrioz verici ve sakkaroz alıcı olarak kullanılarak yürütülmüştür. Oluşan transfer ürünleri ince tabaka kromatografisi (TLC) ve yüksek performanslı iyon değişim kromatografisiyle (HPEAC) tespit edilmiştir. Oluşan maltozil-sakkaroz karışımlarının düşük tatlılık, yüksek su tutuculuğu, düşük Maillard reaktifliği ve yüksek asit ve sıcaklık kararlılığı gösterdiği de ayrıca tespit edilmiştir (Lee vd., 2003).

*Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 (LGMA)'dan elde edilen maltojenik amilaz klonlanarak *E. coli*'de ekspres edilmiştir. Rekombinant LGMA, tek adımlı Ni-NTA afinite kromatografisiyle etkili bir şekilde 24,3 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış rekombinant LGMA'nın spesifik aktivitesi, 58,7 U/mg olarak bulunmuştur. Saflaştırılan bu enzim, optimum hidroliz aktivitesini  $\beta$ -CD üzerinde 55 °C'de ve pH 5,0'da göstermiştir. LGMA'nın bağıl hidrolitik aktivitesi  $\beta$ -CD, çözünen nişasta ve pullulan üzerinde 8:1:1,9 şeklindedir. Bu enzimin aktivitesinin,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve EDTA tarafından inhibe edildiği görülmüştür. Ayrıca enzimin tetramerik formda olduğu  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağımlı hidrolizlediği ve akarboz tarafından inhibe edildiği ifade edilmiştir (Oh vd., 2005).

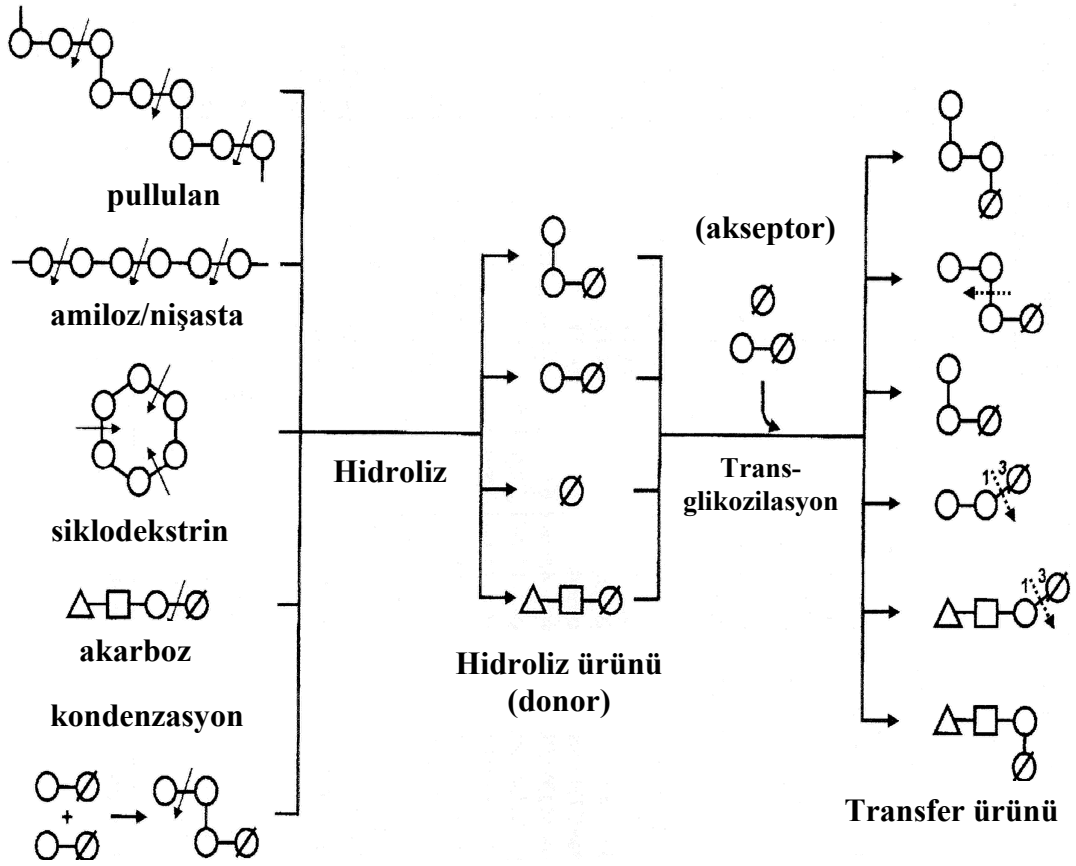
Deniz suyunda derinlerde bulunan hidrotermal alanlardan izole edilen termofilik *Bacillus* sp. WPD616 suşundan üretilen maltojenik amilaz, *E. coli*'de füzyon proteini olan glutatyon S-transferaz (GST) yardımıyla klonlanmış ve ekspres edilmiştir. Elde edilen

proteinin 588 aminoasit biriminden oluştuğu, optimum reaksiyon sıcaklığının 50 °C ve reaksiyon pH'sının da 6,0 olduğu görülmüştür. pH 6,0'da 70 °C'de aktivitesini, pH 6,0-8,0 aralığında da kararlılığını koruduğu, EDTA, PMSF, TritonX-100 ve 2-merkaptoetanol tarafından kısmi olarak inhibe edildiği gözlenmiştir. K<sup>+</sup> ve Li<sup>+</sup> metal iyonları varlığında aktivitesini koruduğu; Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>; Mg<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> metal iyonlarının varlığında ise aktivitesini kısmi olarak kaybettiği tespit edilmiştir (Liu vd., 2006).

#### 1.6.1.5. Substrat Özgünlüğü ve Katalitik Özellikleri

CD/pullulan hidrolizleyen enzimler, CD'ler, pullulan ve nişasta üzerinde geniş bir substrat özgünlüğü gösterirler. Bu özelliklerinden dolayı tipik  $\alpha$ -amilazlardan farklılaşırlar. Bu enzimler  $\alpha$ -1,4- ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarını parçalarken, şeker birimlerini çeşitli alıcı moleküllere transfer ederler ve bunun sonucunda da çeşitli dallanmış oligosakkaritlerin oluşumunu sağlarlar. Neopullulanaz, CDaz ve maltojenik amilazın katalitik özellikleri Tablo 3'te özetlenmiştir. Farklı enzimler, benzer bağlara ve substratlara ilgi duymaktadır. Park ve arkadaşları (1998), *Thermus* suşundan elde edilen maltojenik amilazın akarbozu parçaladığını ve oluşan ürünlerin  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4, ve  $\alpha$ -1,6 bağlarını kullanarak alıcı moleküllere bu ürünleri transfer edebildiğini göstermiştir (Şekil 5). Neopullulanaz  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağları üzerinden hem hidroliz hemde transglikozilasyon reaksiyonlarını katalizleyebilmektedir (Kuriki vd., 1991). *Flavobacterium*'dan elde edilen CDaz, pullulanı parçalayarak oldukça fazla miktarda dallanmış tetrasakkarit üretmektedir (Bender, 1994).

*B. stearothermophilus*'tan elde edilen maltojenik amilazın hem transglikozilasyon hem de hidroliz aktivitesinden, çözümlü nişastadan dallanmış oligosakkaritlerin etkili bir biçimde üretilmesinde endüstride faydalanılmaktadır (Kang vd., 1997; Lee vd., 1995; Yoo vd., 1995; Kim vd., 1994).



Şekil 5. CD-parçalayan enzimler için önerilen hidroliz ve transglikozilasyon modeli. O: İndirgen olmayan glikopranozil ucu; Ø: indirgenmiş glukoz; Δ-□-: akarbozun o-4,6-dideoksi-4- {[4,5,6-trihidroksi-3(hidroksimetil)-2-sikloheksen-1-yl] amino}-α-D-glukopiranozil kısmı; dikey ve yatay çizgiler: α-1,4 ve α-1,6 bağlarıdır. α-1,3 bağları şekil üzerinde işaretlenmiştir. Oklar molekülün parçalanma noktalarını temsil etmektedir.

Tablo 3. CDaz, maltojenik amilaz ve neopullulanazın karakteristik özellikleri (Park vd., 2000).

Enzim	Kaynak	Molekül ağırlığı (Da, monomer)	Optimum		Substrat özgünlüğü	Parçaladığı bağ	Transfer aktivitesi
			Sıcaklık (°C)	pH			
CDaz	<i>B. sphaericus</i> ATCC7055	91 200-95 000	40	6.0-6.5	CD>>MD>SS>PL	$\alpha$ -1,4	V.Y.
	<i>B. sphaericus</i> E-244	72 000	45	8,0	CD>MD>>PL $\cong$ SS	$\alpha$ -1,4	V.Y.
	<i>B. stearothermophilus</i> K-12481	67 000	60	6,5	MD $\cong$ CD>>SS>PL	$\alpha$ -1,4	V.Y.
	<i>T. ethanolicus</i> 39E	66 000	65	5,9	CD>MD>>PL= SS	$\alpha$ 1,4	V.Y.
	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp.	67 000	50	6,0	MD $\geq$ CD	$\alpha$ -1,4	V.Y.
	<i>B. coagulans</i>	62 000	50	6,2	CD>MD>>SS	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	V.Y.
	<i>Flavobacterium</i> sp.	62 000	V.Y.	6,0-7,5	MD $\geq$ CD>>SS>PL	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6
	<i>B. ovatusa</i>	V.Y.	42	7,0	CD	V.Y.	V.Y.
	<i>K. oxytoca</i>	69 000	V.Y.	V.Y.	CD	V.Y.	V.Y.
	<i>Alkalophilic Bacillus</i> I-5	65 000	45	6,5	CD>>SS>PL	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,3, $\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6
	<i>X. campestris</i> K-11151	55 000	55	4,5	CD $\cong$ SS $\cong$ PL	$\alpha$ -1,4	V.Y.
	<i>E. coli</i>	66 000	V.Y.	V.Y.	MD=CD	V.Y.	V.Y.
	<i>T. maritima</i>	55 000	85	6,5	MD>>CD>>SS	$\alpha$ -1,4	V.Y.
Maltojenik amilaz	<i>B. licheniformis</i>	67 000	50	6,8	CD=MD>>PL $\geq$ SS	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6
	<i>B. stearothermophilus</i> ET1	69 000	55	6,0	CD=MD>>PL $\geq$ SS	$\alpha$ -1,4>> $\alpha$ -1,3>> $\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,3, $\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6



Tablo 3'ün devamı

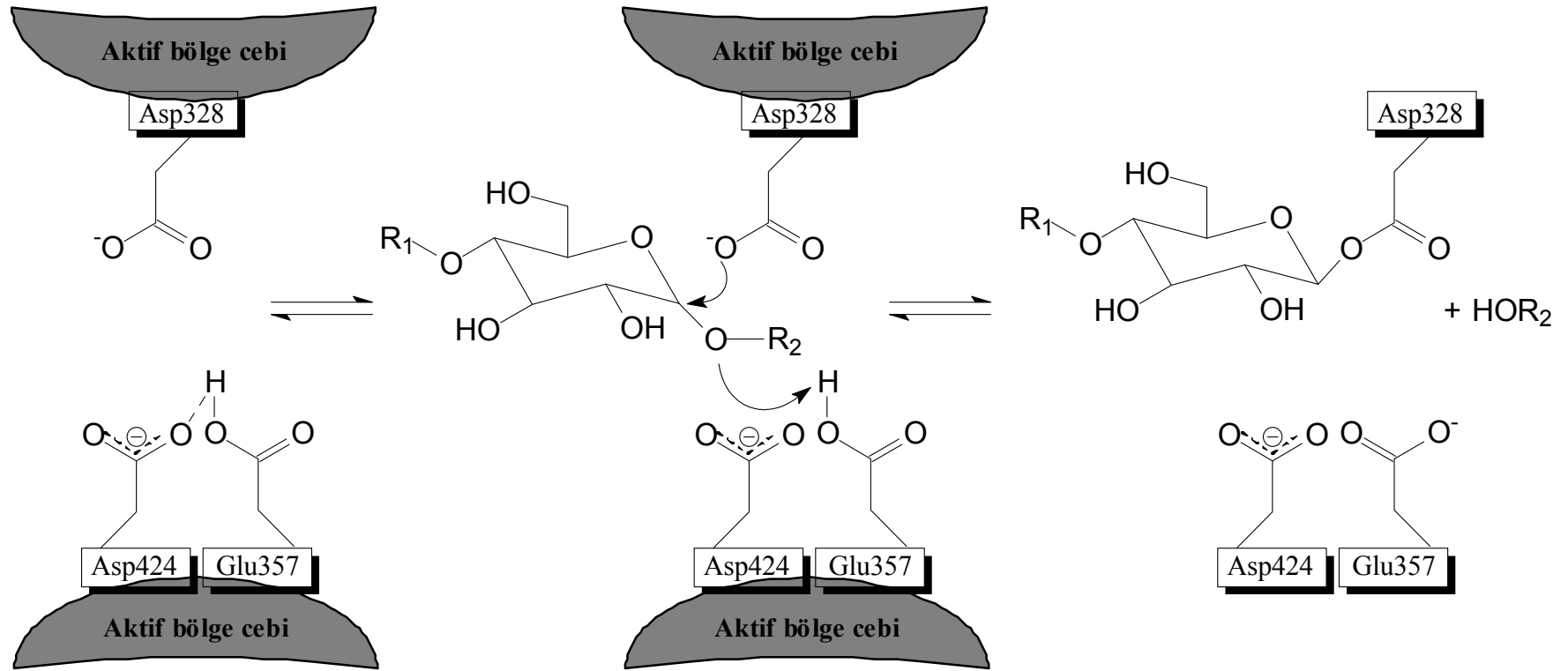
Enzim	Kaynak	Molekül ağırlığı (Da, monomer)	Optimum		Substrat özgünlüğü	Parçaladığı bağ	Transfer aktivitesi
			Sıcaklık (°C)	pH			
Maltojenik amilaz	<i>Thermus</i> sp. IM6501	68 000	60	6,0	CD=MD>>PL≥SS	α -1,4>> α -1,3>> α -1,6	α -1,3, α -1,4, α -1,6
	<i>B. subtilis</i> SUH 4-2	69 000	40	6,0	CD=MD>>SS≥PL	α -1,4>> α -1,6	α -1,3, α -1,4, α -1,6
TVAII	<i>T. vulgaris</i> R-47	69 000	40	5,5-6,0	PL>SS>>CD	α -1,4>> α -1,6	α -1,4, α -1,6
Neopullulanaz	<i>B. stearothermophilus</i>	62 000	60	6,0	PL>>SS	α -1,4>> α -1,6	α -1,4, α -1,6
	<i>B. thetaiotaomicron</i> 95-1	70 000	V.Y.	V.Y.	PL>>CD	α -1,4	V.Y.
	<i>K. pneumoniae</i>	66 000	V.Y.	V.Y.	SS, PL, CD	V.Y.	V.Y.
	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. KSM-1876	68 600	40	7,5	PL>SS	V.Y.	V.Y.
	<i>B. polymyxa</i>	58 000	V.Y.	V.Y.	SS>PL	α-1,4	V.Y.
Amilaz	<i>B. megaterium</i>	55 000	75	5,5	SS = PL=CD	α-1,4	α-1,4
Amilopullulanaz	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	150 000	65	5,0-5,5	SS≅PL	V.Y.	V.Y.

CD: α- β- γ- siklodekstrin, MD: maltodekstrin, SS: çözümlü nişasta, PL: pullulan, V.Y.: veri yok.

Bugüne kadar transglikozilasyon reaksiyonlarıyla, oligosakkritlerin oldukça geniş çeşitlilikte enzimatik reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Park ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışmalar sonucunda, maltojenik amilazın, akarboz ve çeşitli alıcılarla gerçekleştirdiği transglikozilasyon reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin spesifik karbohidraz inhibitörleri olarak davrandıkları görülmüştür.

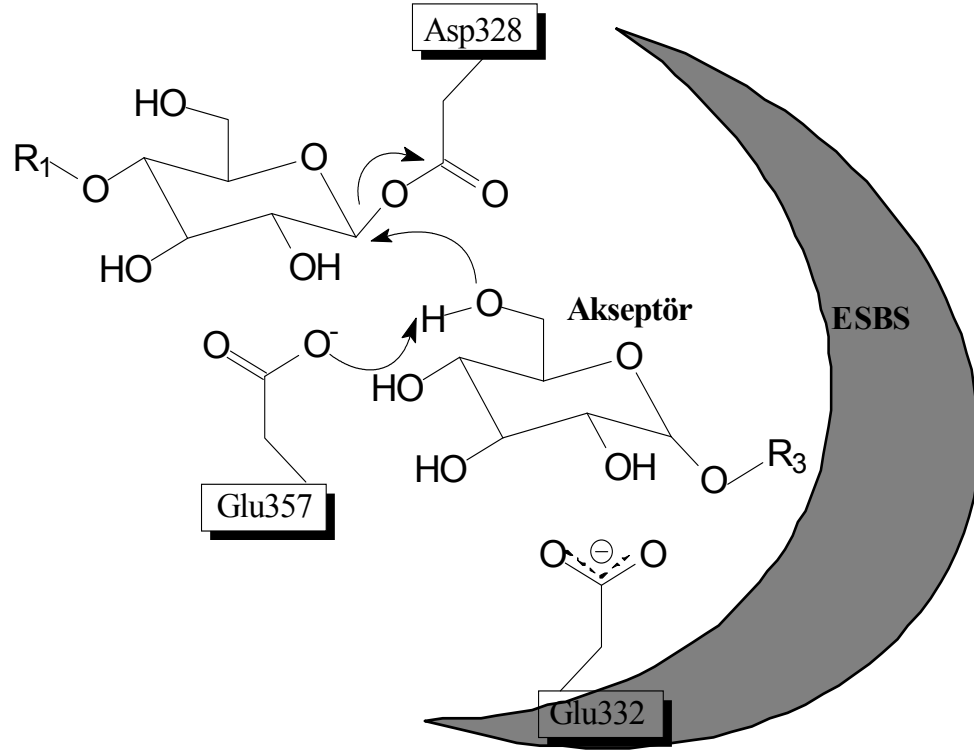
#### 1.6.1.6. Kataliz Mekanizması

CD-/pullulan parçalayan enzimlerin hidroliz ve transglikozilasyon mekanizması,  $\alpha$ -amilaz, CGTaz ve dallanmayı parçalayan enzim reaksiyon mekanizmasıyla benzer olduğu ve çift yer değiştirme reaksiyonunu takip ettiği düşünülmektedir (Tao vd., 1989; Kim vd., 1999; Uitdehaag vd., 1999). Üç karboksilli asit biriminin kataliz mekanizmasındaki rolü daha önceden bilinmektedir (McCarter ve Withers, 1996; Matsuura vd., 1984). Taka-amilaz A'nın (TAA) benzerliği kullanılarak, TAA'nın Asp-328'nin, Glu-230'nun ve Asp-297'sinin *B. stearothermophilus* neopullulanazında Asp-206'ya, Glu-357'ye ve Asp-424 karşılık geldiği ve katalitik birimler olduğu ifade edilmiştir (Kuriki vd., 1991). TVA II'nin üç boyutlu yapısı temel alındığında, Asp-325, Glu-354 ve Asp-421'in  $\beta$ -CD bağlandığında oluşan kompleks dikkate alındığında bu üç aminoasitin katalitik bölgeyi oluşturdukları belirlenmiştir (Kamitori, vd., 1999; Kim vd., 1999). Bu sebeple, Asp-328 (Asp-206, TAA) nükleofilik kataliz ve Glu-357'nin (Glu-230, TAA) ise asit/baz katalizi fonksiyonunu yerine getirmektedir. Asp-424'ün (Asp-297 TAA) asit/baz katalizi için uygun protonlayıcı olabileceği ve glukoz halkasının bükülmesine sebep olabileceği veya sudan faydalanarak C-1 karbonuna nükleofilik saldırıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (Şekil 6). Yakın zamanlarda bu teori, parçalanmamış substrat veya ara reaksiyonlardaki kovalent bağlanmış türevleri içeren CGTaz komplekslerinin X-ray yapıları incelenerek güçlü bir şekilde desteklenmiştir (Uitdehaag vd., 1999). *Thermus* suşundan elde edilen maltojenik amilazın (ThMA) aktif bölgesinin alt kısmında yani alt birimin N-terminal bölgesiyle sınırlı ve diğer alt birimin ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-katlanmasının olduğu bölgede ekstra bir boşluk olduğu gözlenmiştir (Kim vd., 1999). Bu boşluk (ekstra şeker-bağlanma bölgesi olarak tanımlanır), mono- veya disakkritlerin yerleşmesi için uygun bir bölgedir ve alıcı birim olarak suyla yarışarak substrata saldırır.



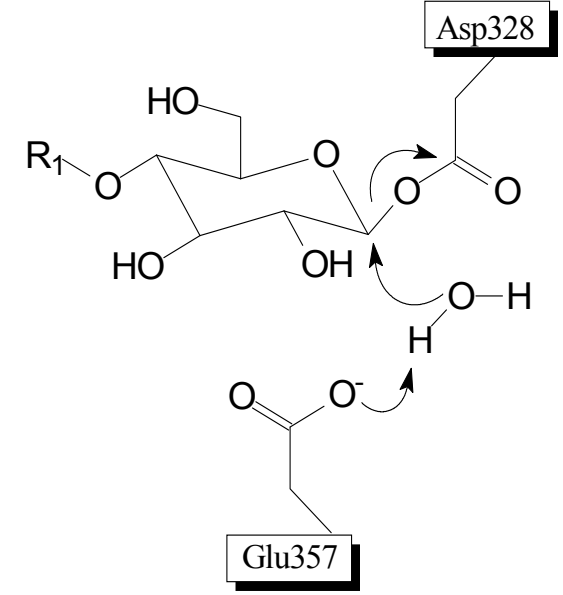
Şekil 6. *Thermus* suşundan elde edilen maltojenik amilazın reaksiyon mekanizması (Park vd., 2000). R<sub>1</sub>: substrat molekülündeki donör kısım; R<sub>2</sub>: şekerden ayrılan kısım; R<sub>3</sub>: alıcı moleküldeki (akseptör) şeker kısmı veya -H; ESBS: ekstra şeker bağlanma boşluğu.

Şekil 6'nın devamı.



**Transglükolizasyon**

veya



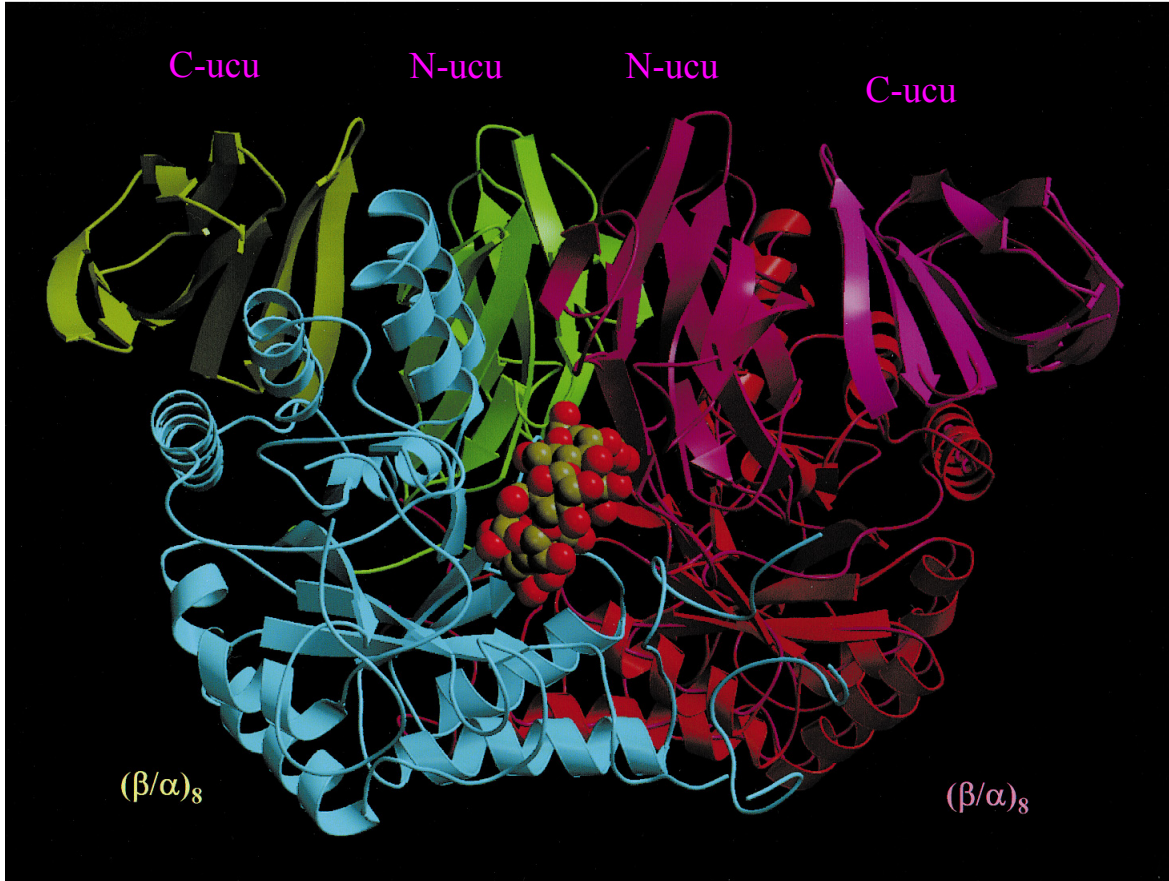
**Hidroliz**

Dikkat edildiğinde, CDaz, maltojenik amilaz ve neopullulanazda Glu-322'nin hidrojen uzunluğu modellenmiş alıcı molekül için korunmuş olmasına rağmen glikozid hidrolaz Family 13 ailesinin diğer üyelerinde böyle bir durum söz konusu değildir. Bu sebeple, Glu-322 oligosakkarit alıcılıkların bağlanması oldukça önemli bir rol oynar. Bu durum Glu-322'nin His mutasyonu sonucu transglikozilasyon aktivitesinin %50 oranında azalmasıyla birlikte destek görmüştür (Cha vd., 1998). Neopullulanazın aktif bölgesinde bulunan Glu ve Asp, His veya Glu ile yer değiştirildiğinde, enzimin  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarına karşı olan aktivitesinin kaybolduğu görülmüştür (Kuriki vd., 1991). Maltojenik amilazın üçüncü ve dördüncü korunmuş bölgeleri arasında aminoasitler değiştirildiğinde hidrofobikliğin arttığı (Cha vd., 1998), ve bunun sonucunda da  $\beta$ -CD'ne karşı aktivitenin mutasyon yapılmayan enzime göre 1,5-4 kat daha arttığı gözlenmiştir.

#### 1.6.1.7. Birincil ve İkincil Yapılar

Family 13 nişasta hidrolazlarının ve farklı kaynaklardan elde edilen ilgili enzimlerin çoklu protein sıralarının karşılaştırılmasıyla oldukça korunmuş dört bölgenin varlığı ortaya çıkmıştır. CDaz, maltojenik amilaz, neopullulanaz ve TAA protein sıralarının karşılaştırılması Asp-328, Glu-357 ve Asp-424 den başka bir aktif bölge çeşitliliğinin olmayacağını ortaya koymuştur. N-terminal bölgedeki yaklaşık 130 aminoasit gibi, C-terminal bölgedeki yaklaşık 30 aminoasit her üç enzim tipinde de TAA ile eşit değildir. Bilinen bu dört korunmuş bölgeye ilave olarak, sadece CD-/pullulan parçalayan enzimlerde bulunan oldukça benzer iki bölge,  $(\beta/\alpha)_8$ - katlanmasının başlama noktasıyla ve bu korunmuş olan dört bölge arasına yerleşmiştir. Ayrıca, korunmuş bölgeler olarak bilinen üçüncü ve dördüncü bölgeler arası, bu tip enzimlerde CD bağlanma bölgesi olarak bilinmektedir (Kim vd., 1998; Podkovyrov ve Zeikus, 1992). Asp'nin Lys ile değiştirilmesi sonucu, CD-/pullulan parçalayan enzimlerde enzimin aktif bölgesinde kalsiyum bağlanma özelliği de değişmektedir. CD parçalayan enzimlerin ikincil yapıları sıra analizinden yola çıkılarak yapılan tahminlerle uyumludur. Kristal yapıları beş ile yedi arasında  $\alpha$ -sarmal yapısı içerir ve bu yapılar diğer Family 13 üyelerinde bulunmaz. Bu da, CD parçalayan enzimlerde katalitik bölgenin ve substrat özgünlüğünün oluşmasına neden olmaktadır. Bu enzim grubu diğer Family 13 üyelerinden farklı olarak %40-60 oranında aminoasit sırası benzerliği göstermektedir. Bu benzerlik, CDaz, maltojenik amilaz ve neopullulanazda sırasıyla

%41,4, %56,8 ve %33,6 şeklindedir. Farklı gruplar birbiriyle kıyaslandığında, dikkate değer bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Örneğin, maltojenik amilaz/CDaz %45,7, maltojenik amilaz/neopullulanaz %42,3ve CDaz/neopullulanaz %37,8 oranında benzerlik göstermektedir (Park vd.,2000). ThMA'nın dimerik yapısı Şekil 7 'de gösterilmektedir.



Şekil 7. ThMA dimer kompleksinin kurdele diyagramı. N-ucu yeşil,  $(\beta/\alpha)_8$ -katlanması mavi, C-ucu eflatun ve  $\beta$ -CD kırmızı-yeşil renklerle gösterilmiştir (Kim vd., 1999).

### 1.7. *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 Suşunun Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

*Geobacillus caldxylolyticus* TK4 Suşu Çanakkale Kestanbol Kaplıcası'ndan elde edilen su örneklerinden izole edilmiştir ve 14283 kodlu numarayla National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria'da stoklanmıştır. Bakteri izolasyonu, zenginleştirme kültürleri yapılarak ve membran filtresinden geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Çanakkale Kestanbol Kaplıcası, Çanakkele ilinin Ezine ilçesinin sınırları içerisinde bulunup bu ilçeye

uzaklığı 10 km, Çanakkale'ye olan uzaklığı ise 50 km'dir. Kestanbol Kaplıcası'nın yerden çıkış sıcaklığı 71 °C'dir. İzolatın tür tayininin yapılabilmesi için çeşitli morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal, genetiksel ve kemotaksonomik testler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4'de verilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda termofilik izolatın basil morfolojisine sahip olduğu, spor oluşturabildiği ve katalaz enzimi üretebildiği gözlenmiştir (Dülger, 2003).

Tablo4. *G. caldxylyolyticus* TK4 Suşunun bazı biyokimyasal özellikleri

Özellik	Sonuç	Özellik	Sonuç
Gram Boyama	+/-	Anaerobik Büyüme	-
Spor Boyama	+	Glukoz fermantasyonu	+
Katalaz Üretimi	+	Mannitol fermantasyonu	+
Jelatin Hidrolizi	+	Arabinoz fermantasyonu	+
Nişasta Hidrolizi	+	Ksiloz fermantasyonu	+
VP Testi	-	%2-5 NaCl'de büyüme	+
Sitrat Kullanımı	-	%7 NaCl'de büyüme	-
Propiyonat Kullanımı	+	30, 37 °C'de Büyüme	-
İndol testi	-	40, 70, 75 °C'de Büyüme	+

### 1.8. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Isıl kararlı enzimler oldukça yüksek özgünlüğe sahiptirler ve bu sebeple birçok endüstriyel uygulama için potansiyel oldukları düşünülmektedir. Bu tip enzimler yiyecek, kâğıt, deterjan, ilaç, zehirli atıkların uzaklaştırılması ve yağ sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür enzimler termofilik mikroorganizmalardan elde edilebildiği gibi çabuk büyüeyebilen mezofil canlılara, rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla klonlanarak da elde edilmesi mümkündür. Bu tür özgün ısıl kararlı enzimlere endüstride duyulan ihtiyaç, gelecekte bu enzimlerin geliştirilmesi ve uygulama alanlarının genişletilmesini oldukça önemli hale getirmektedir (Haki ve Raksit, 2003).

Termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu organizmalardan elde edilen enzimlerin mezofilik analoglarına göre daha kararlı olduğu keşfedilmiştir. Bu nedenle termofilik bakterilerden enzim izolasyonuna, karakterizasyonuna ve

klonlanmasına duyulan ilgi gün geçtikçe giderek artmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile enzimlerin üzerinde mutasyonlar yardımıyla stereoseçiciliği, substrat özgünlüğü ve genel performansı değiştirilebilmekte ve amaca uygun enzimler üretilmektedir. Bu yöntemlerin kullanımı ayrıca saf enzimlerin ekonomik ve bol miktarlarda üretimini de olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmada, çalışma materyali olarak kullanılan *G. caldxylolyticus* TK4 Suşu, Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü araştırmacıları (Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Yrd.Doç.Dr. Sabriye ÇANAKÇI) tarafından Çanakkale Kestanbol Kaplıcası'ndan izole edilmiş ve birtakım özellikleri ortaya konulmuştur. Çalışma amacı olarak, "Termofilik Bir Bakteri Olan *Geobacillus caldxylolyticus* TK4 Suşundan Klinik ve/veya Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimleri Kodlayan Genlerin Klonlanması, Enzimlerin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" adlı 106T696 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda; tekstil, deterjan ve özellikle nişasta sanayi için büyük önem taşıyan sıcaklığa dirençli maltojenik amilazın bol ve ucuz bir şekilde üretilmesine olanak sağlamak amacıyla, *G. caldxylolyticus* TK4 suşundan maltojenik amilaz genin tam sırasının belirlenmesi ve sıcaklığa dirençli olan bu enzimi üreten rekombinant bakteriler geliştirilmesinin yanında bu genin klonlanması, *E. coli*'de bol miktarda ekspres edilip saflaştırılması ve aktivite gösterebileceği substratların belirlenip biyokimyasal olarak karakterize edilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen yeni maltojenik amilazın özellikleri göz önüne alındığında ise endüstride kolaylıkla kullanım alanı bulabileceği düşünülmektedir.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Materyaller

#### 2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
PCR	Bio-Rad	MJ Mini Personal
DNA Elektroforezi	Owl Separation Systems	Easy Cast B1A
Protein Elektroforezi	Owl Separation Systems	P8DS
Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	Nüve	EN400
Mikrotüpler İçin Termal sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert	WNB 7-45
Ligasyon Fırını	Nüve	ES110
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/ Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Otoklav	Tomy	SS-325
Sonikatör	Bandelin	Sonopuls HD3100
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Terazi	Ohaus	Pioneer
Mikrodalga Fırın	Regal	RMD-17
Güç Kaynağı	Heathkit	IP-17
Steril Kabin	Tezsan	—

### 2.1.2. Enzimler

Çalışmada kullanılan enzimler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Konsantrasyon
<i>EcoR</i> I	Takara	15 U/μl
<i>Hind</i> III	Promega	10 U/μl
<i>Nde</i> I	Fermentas	10 U/μl
<i>Ava</i> II	Promega	10 U/μl
<i>Pst</i> I	Fermentas	10 U/μl
<i>Bfa</i> I	Biolabs	5 U/μl
<i>Nhe</i> I	Fermentas	10 U/μl
<i>PspG</i> I	Biolabs	10 U/μl
T4 DNA Ligaz	Promega	3 U/μL
GoTaq Flexi DNA Polimeraz	Promega	5 U/μL
T4 DNA Ligaz HC	Fermentas	20 U/μl

### 2.1.3. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Kimyasal, biyokimyasal maddeler	Fluka, Sigma, Aldrich, Merck
Plazmit DNA İzolasyon Kiti (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems)	Promega
Genomik DNA İzolasyon Kiti (Wizard Genomic DNA Purification Kit)	Promega

Tablo 7'nin devamı

pGEM-T Vektör Sistemi (pGEM-T Easy Vector System I)	Promega
PCR Ürünlerini Temizleme Kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System )	Promega
Protein Saflaştırma Kiti (MagneHis Protein Purification System)	Promega
DNA Standardı (1 kb DNA Ladder)	Promega
SDS-PAGE Standardı (Broad Range Protein Molecular Weight Markers )	Promega

#### 2.1.4. Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Maltojenik amilaz geninin tamamını çoğaltmak amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PCR) kullanılan primerler

Primer	Baz Sırası	Tm	Sentezleyen Firma
Ma R1	5'-TGTTGTCTGGAGCGGGAATTC-3'	58,5 °C	IONTEK
Ma F1	5'-GGATTCAGGAATTTGACATCGACG-3'	57,1 °C	IONTEK
Ma R2	5'- GCCGCAATGATTAACACCGCG-3'	59,2 °C	IDT
Ma F2	5'-TGGATGCAAGCGATGAATCAAACC-3'	59,1 °C	IDT
Ma R3	5'-CGATTTAGCTGCCAGACGCCAT-3'	60,8 °C	IDT
Ma F3	5'-AGAAGCCGAAACATTGCGTGC-3'	60,0 °C	IDT
YMaFS	5'- GGCTAGCATGTTTAAAGAAGCGATTTATC-3'	57,3 °C	IDT
YMaRS	5'- TCCTCCATATAGCTAACTGACAAGCTTG-3'	58,4 °C	IDT

### 2.1.5. Kullanılan Bakteri Suşları

Klonlama ve ekspresyon işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanılan hücreler Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Çalışmada kullanılan klonlama ve ekspresyon hücreleri

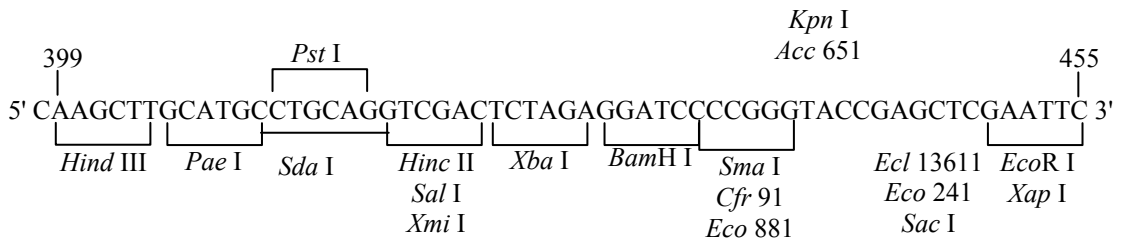
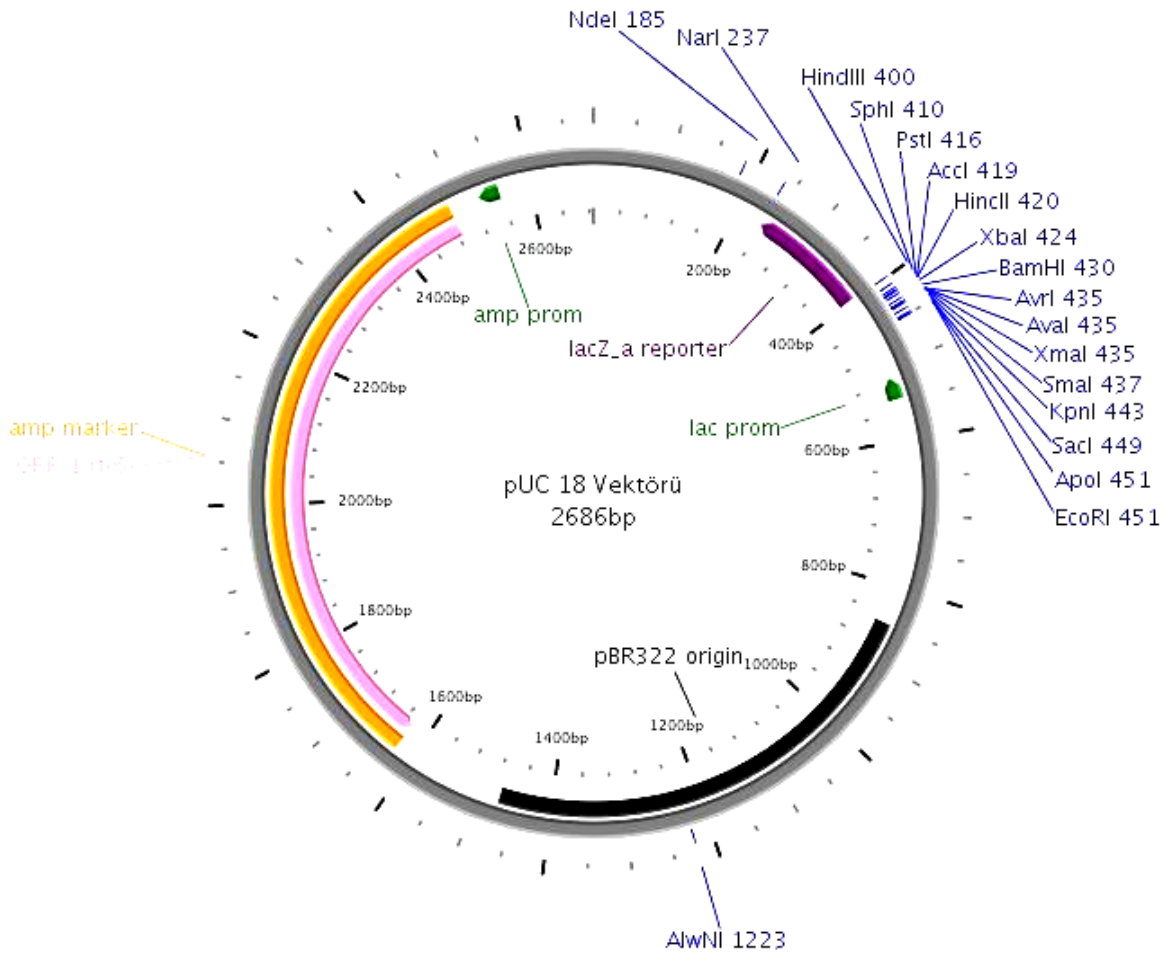
Tür	Suş	Genotip	Kullanım Amacı
<i>Escherichia coli</i>	JM101	<i>supE, thi, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Klonlama hücresi
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> , <i>ompT, hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, r<sub>B</sub><sup>-</sup>), dmc, gal, λ(DE3), pLysS, Cm<sup>r</sup></i>	Ekspresyon hücresi

### 2.1.6. Plazmitler

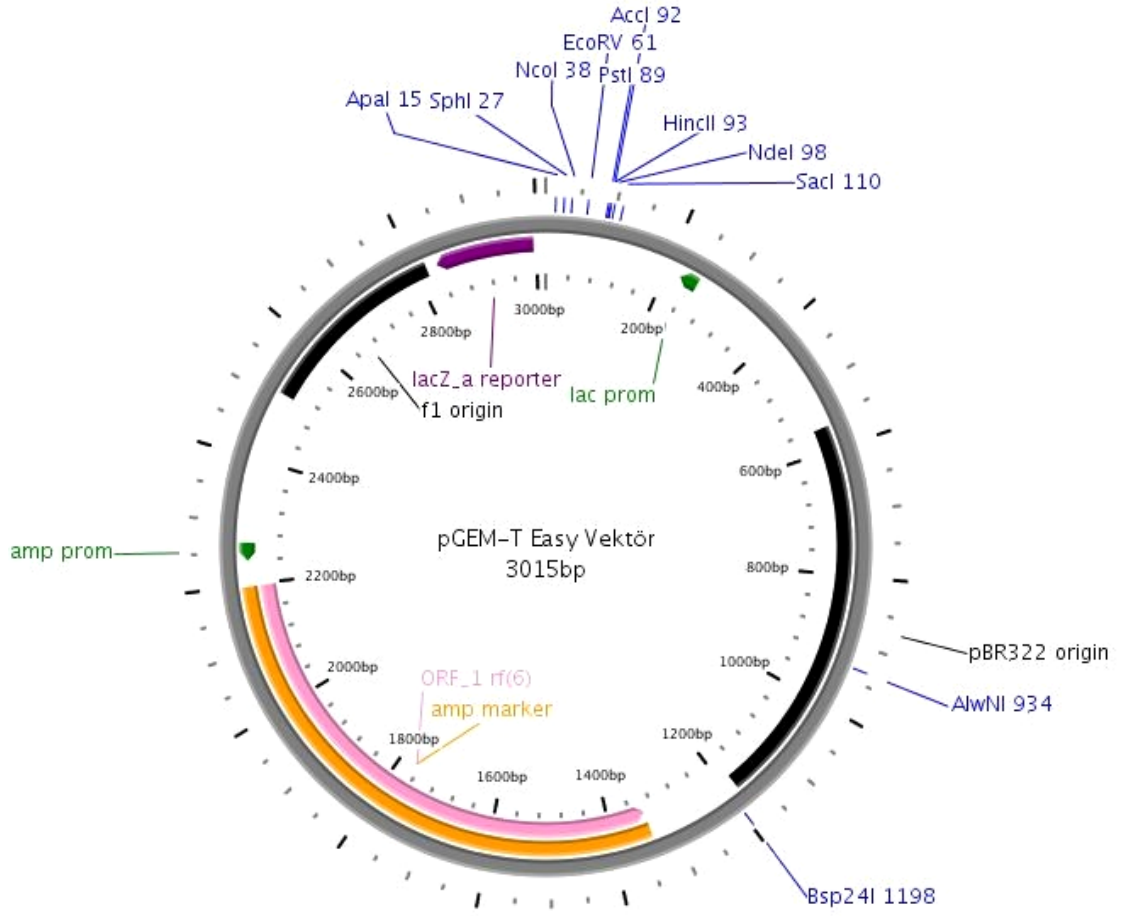
Klonlama ve ekspresyon amacıyla kullanılan plazmitler Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Klonlama ve ekspresyonda kullanılan plazmitler

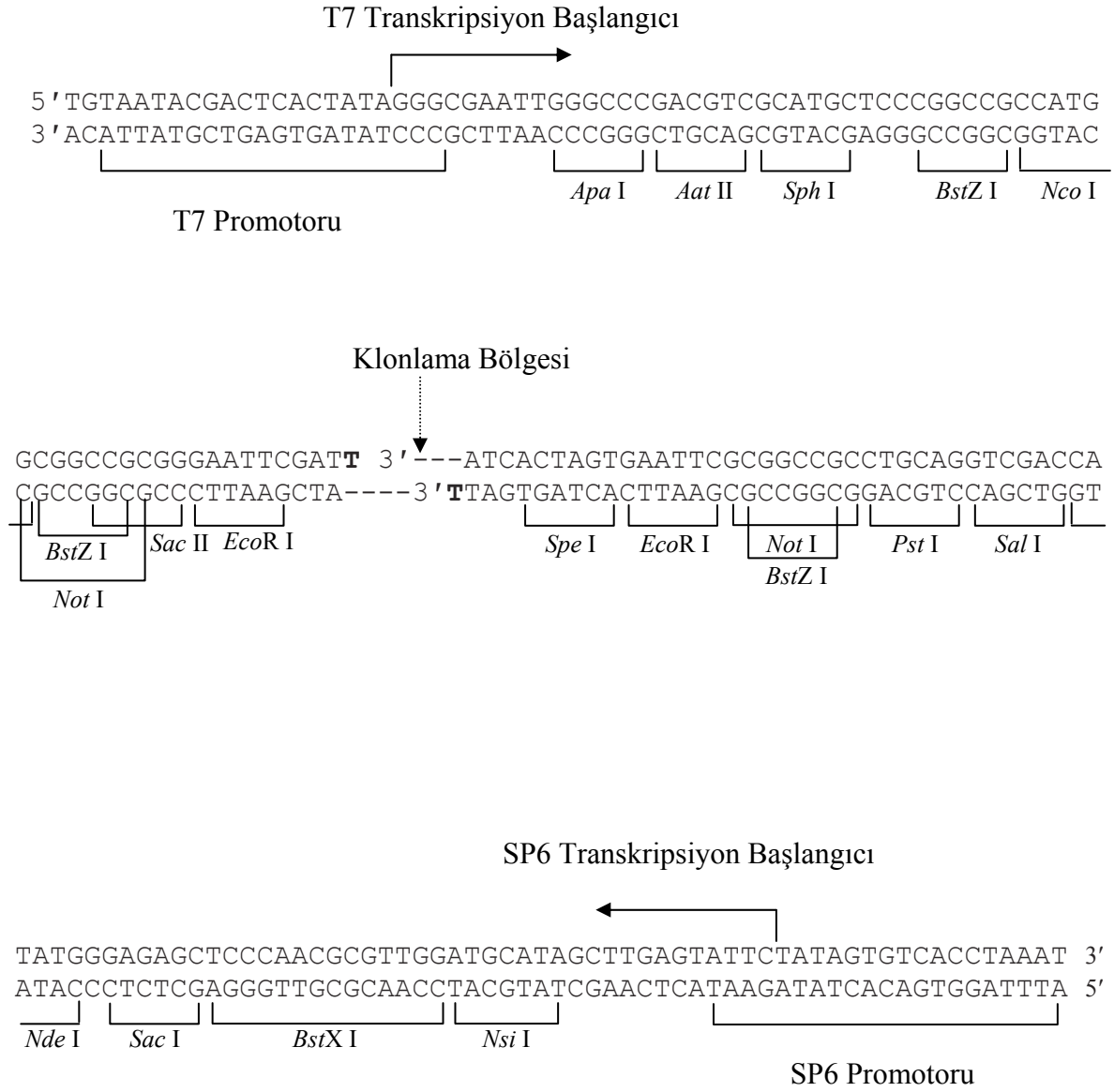
Plazmit	Firma	Kullanım Amacı
pUC18	Promega	Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için
pGEM-T Easy	Promega	İnvers PCR ürünlerini klonlamak için
pET-28a(+)	Novagen	Ekspresyon vektörü



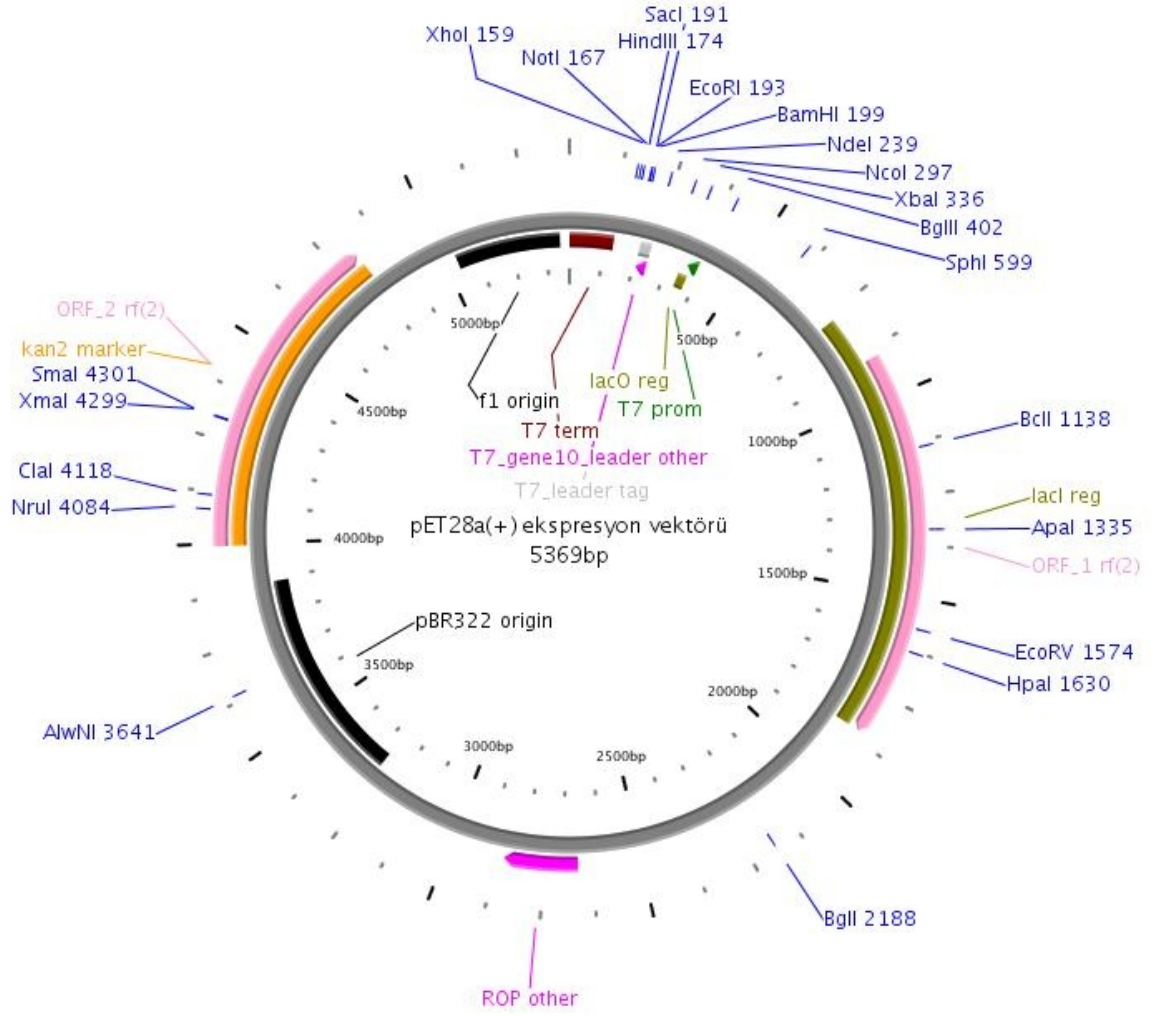
Şekil 8. pUC18 vektörünün çoklu klonlama bölgesini (MCS), replikasyon orijini, *lacZ* genini ve amfisisilin direnç genini içeren harita (URL-1, URL-2 ve URL-3, 2008; Dong vd., 2004).



Şekil 9. pGEM-T Easy vektörünün haritası (URL-4 ve URL-5, 2008; Dong vd., 2004).



Şekil 10. pGEM-T Easy vektörünün promotoru ve çoklu klonlama bölgesi. Üst zincir T7 RNA polimeraz tarafından sentezlenen RNA'yı, alt zincir ise SP6 RNA polimeraz tarafından sentezlenen RNA sırasını ifade etmektedir (URL-6, 2008).



Şekil 11. pET-28a(+) vektörünün haritası (URL-2 ve URL-7, 2008; Dong vd., 2004).



Bgl II T7 Promotoru → lac Operatörü  
 AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC

Xba I rbs  
 CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA

Nco I His Tag  
 CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC  
 MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySer

Nde I Nhe I T7 Tag BamHI EcoRI Sac I Sal I  
 CATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGA  
 HisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArg

Hind III Eag I Not I Xho I His Tag  
 CAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGC  
 GlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProProLeuArgSerGlyCysEnd

Bpu1102 I T7 Terminatörü  
 GAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCT  
 CTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

Şekil 12. pET-28a(+) vektörünün *lac* operatörünü, ribozom bağlanma bölgesini, His Tag ve T7 Tag bölgelerini gösteren sırası (URL-8, 2008).

## 2.1.7. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

### 2.1.7.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

A çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 0,5253 g sitrik asit monohidrat saf suda çözülerek hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

B çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat): 1,78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  saf suda çözülerek hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

Mcilvaine tamponu (50 mM, pH 3,0): 80,3 mL A çözeltisi ile 19,7 mL B çözeltisi karışımından 20,8 mL alınıp saf suyla hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Mcilvaine tamponu (50 mM, pH 4,0): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karışımından 18,1 mL alınıp saf suyla hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Mcilvaine tamponu (50 mM, pH 5,0): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karışımından 16,6 mL alınıp saf suyla hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Mcilvaine tamponu (50 mM, pH 6,0): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karışımından 15,3 mL alınıp saf suyla hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Mcilvaine tamponu (50 mM, pH 7,0): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karışımından 13,8 mL alınıp saf suyla hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 7,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 7,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

### 2.1.7.2 Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Jel Yükleme Boyası (6X): 25,0 mg bromofenol mavisi ve 3 mL gliserol saf su ile iyice karıştırılarak hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

EDTA Çözeltisi (0,5 M, pH 8,0): 18,61 g  $\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0'e ayarlanarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Tris-Asetik Asit-EDTA çözeltisi (50X TAE): 24,2 g Tris, 5,7 mL glasiyal asetik asit ve 10 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) çözeltisinin saf su ile iyice karıştırılıp hacminin 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

Jel Hazırlama ve Yürütme Tamponu (1X TAE): 20 mL 50X TAE çözeltisinin hacmi saf suyla 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Etidiyum Bromür (5 mg/mL) Çözeltisi: 50 mg etidiyum bromür saf suda çözülerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

### 2.1.7.3. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ): 0,4 g NaOH ve 2,0 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

Lowry B Çözeltisi (%1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi): 1,0 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.

Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.

Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf suda çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

0,1 N NaOH içinde %0,1 (w/v) SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

### 2.1.7.4. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 5,4225 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH'sı 8,8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 0,2850 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH'sı 6,8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.

SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti -20 °C'de saklandı.

N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.

Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,20 g akrilamid ve 0,80 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.

Gliserol çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL %10 SDS, 100 µL %0,1 bromofenol mavisini, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL β-merkaptolanol'ün karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C'de saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,20 g Tris ve 1,50 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisini, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C'de saklandı.

Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,20 g Tris ve 1,50 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesiyle hazırlandı.

Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

Substrat boyama çözeltisi: 0,30 g iyot, 0,60 g KI ve 1 g NaHCO<sub>3</sub> 100 mL saf suda çözüldü 1:100 oranında seyreltilerek kullanıldı.

### 2.1.7.5 Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Diğer Çözeltiler

$\beta$ -siklodekstrin: %2'lik stok çözelti hazırlanıp taze olarak kullanıldı.

3,5-Dinitrosalisilikasit (DNS) Çözeltisi: Çözelti A, 22 mL %10'luk NaOH çözeltisi üzerine az miktar suda çözülmüş 10 g fenol ilave edilip 100 mL'ye seyreltildi.

Çözelti B: 6,9 g sodyumbisülfid 69 mL Çözelti A da çözüldü.

Çözelti C: 300 mL % 4,5 NaOH, 225g Na-K tartarat ve 880 mL %1'lik 3,5-dinitrosalisilik asit karıştırıldı. Çözelti B ve Çözelti C karıştırılarak DNS çözeltisi hazır hale getirildi.

### 2.1.7.6. Sıvı ve Katı Besiyerleri

Luria-Bertani Besiyerinin (LB) Hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı ve 5,0 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd.,1989).

Luria-Bertani Agar Besiyerinin (LB Agar) Hazırlanması: 10,0 g bacto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı, 5,0 g NaCl ve 15,0 g agar yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanıp 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd.,1989).

### 2.1.7.7. Diğer Çözeltiler

Amfisilin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg amfisilinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtreyle steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

Kanamisin Çözeltisi (25 mg/mL): 250 mg kanamisin sülfatın (Kanamisin A) saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtreyle steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

IPTG Çözeltisi (200 mg/mL): 2 g IPTG saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Hazırlanan çözelti filtreyle steril edilip küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

X-Gal Çözeltisi (20 mg/mL): 200 mg X-Gal'ın dimetilformamid (DMF) ile çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Hazırlanan çözelti küçük kısımlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

Sodyum asetat çözeltisi (3 M, pH 5,2): 20,412 g sodyum asetat trihidrat yaklaşık 40 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N asetik asit çözeltisi ile 5,2'ye ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Etanol Çözeltisi (%96): 96 mL etanolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

Etanol Çözeltisi (%70): 70 mL etanolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,1 M): 1,47 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  saf suda çözülüp hacminin 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Hazırlanan çözelti 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi ve +4 °C'de saklandı.

EDTA Çözeltisi (50 mM): 1,86 g  $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  yaklaşık 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0' e ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Lisozim Çözeltisi (10 mg/mL): 10 mg lisozimin saf suda çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

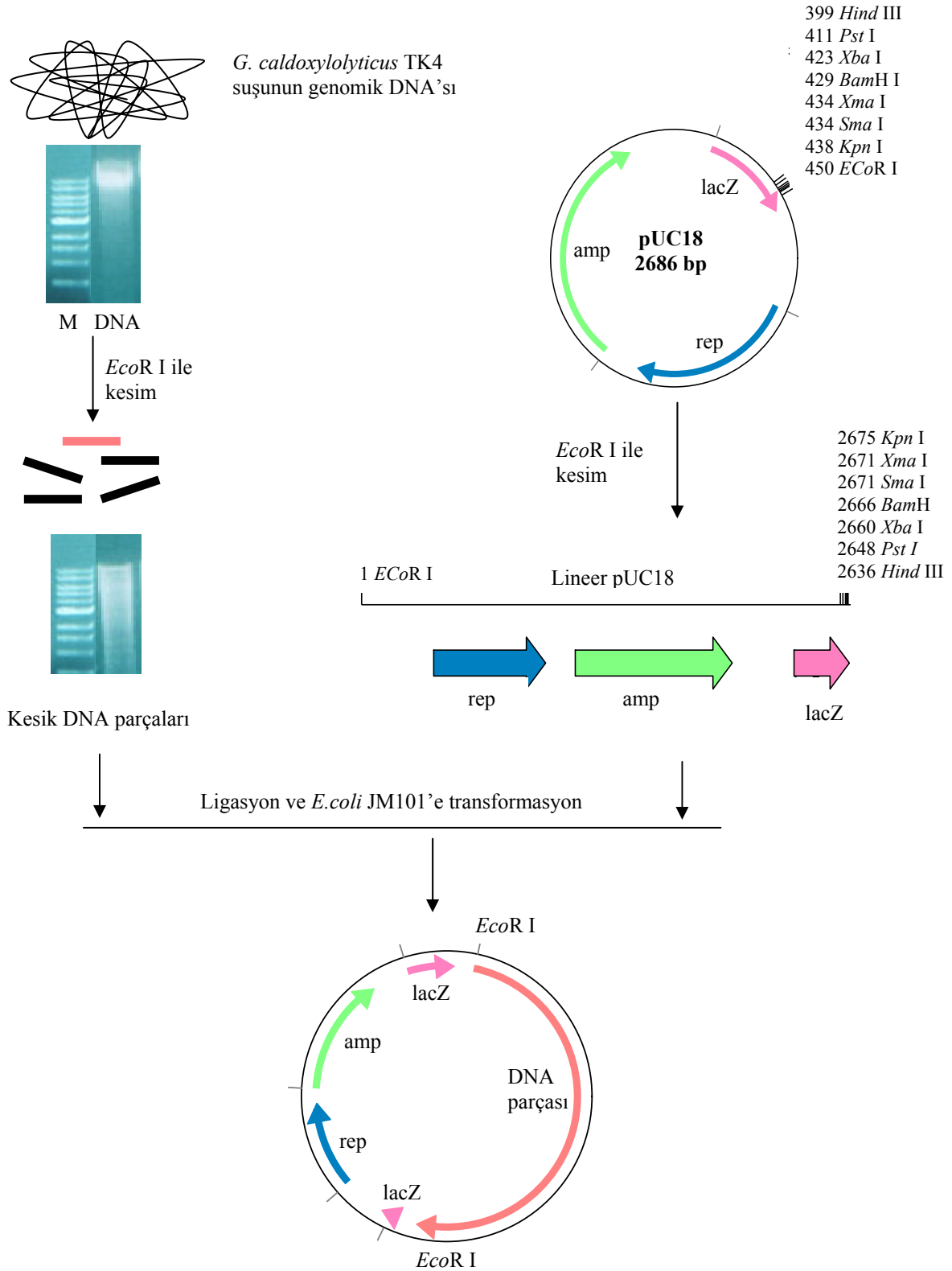
## 2.2. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genomik DNA (gDNA) kütüphanesi; DNA'nın bir ya da birden fazla restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA parçalarının, yine aynı enzimle kesilen bir vektöre yapıştırılmasıyla elde edilir (Şekil 13). Bu sayede gDNA'nın tamamı vektöre aktarılmış olur. Bu yöntemle organizmanın gDNA sırası tespit edilebilir ve genomik haritası çıkarılabilir.

### 2.2.1. *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 Suşunun Büyütülmesi

*G. caldoxylolyticus* TK4 bakterisi stok kültürden LB Agar besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekildi ve bir gece 60 °C'de bekletilerek büyütüldü. Daha sonra, LB Agar yüzeyinde büyüyen kolonilerden öze yardımıyla alınarak LB besiyerine ekildi. Gece boyu

çalkalayıcı hava banyosunda 60 °C’de inkübasyon yapılarak gece kültürü hazırlandı (Dülger, 2003).



Şekil 13. *G. caldxylolyticus* TK4 genomik DNA'sının *EcoR* I ile kesilerek gDNA kütüphanesinin oluşturulmasının şematik gösterimi

### 2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

*G. caldoxylolyticus* TK4 bakterisinden gDNA izolasyonu “Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)” kullanılarak yapıldı.

- Gece kültürünün 1 mL’si 1,5 mL’lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
- 13.000 x g’de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelte 480 µL 50 mM EDTA çözeltisinde çözülüp, 120 µL lizozim çözeltisi (10 mg/mL stok) ilave edilerek hafifçe karıştırıldı.
- 37 °C’de 1 saat inkübe edildi ve 13.000 x g’de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüpe 600 µL Nüklei Lizis Çözeltisi (Nüklei Lysis Solution) ilave edilip pelte süspansiyone olana kadar dikkatlice altüst edildi.
- Hücrelerin parçalanması için 80 °C’de 5 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığına soğutuldu.
- Hücre lizatına 3 µL RNaz Çözeltisi (RNase Solution) ilave edilerek tüp yavaşça 2-5 kez altüst edildi.
- 37 °C’de 60 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu.
- RNaz muamelesi yapılmış hücre lizatına 200 µL Protein Çöktürme Çözeltisi (Protein Precipitation Solution) ilave edildi. Çözeltinin hücrelerle iyice karışması için tüp 20 saniye yüksek hızda vortekslendi.
- Numune buz üzerinde 5 dakika bekletilerek 13.000xg’de 3 dakika santrifüj edildi.
- DNA’yı içeren süpernatant 600 µL oda sıcaklığında izopropanol içeren 1,5 mL’lik temiz bir eppendorf içine aktarıldı.
- DNA iplikçikleri görünene kadar eppendorf yavaşça altüst edilerek karıştırıldı.
- 13.000xg’de 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve eppendorf temiz ve emici bir kâğıt üzerinde hava akımı yardımıyla kurutuldu. 600 µL oda sıcaklığında %70’lik etanol ilave edildi ve yavaşça altüst edilerek DNA’nın yıkanması sağlandı.
- 13.000 x g’de 2 dakika santrifüj edilerek etanol dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Eppendorf temiz ve emici bir kâğıt üzerinde hava akımında kurutuldu ve oda sıcaklığında 10-15 dakika daha bekletilerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı.



- Elde edilen DNA üzerine 50 µL DNA Rehidrasyon Çözeltisi (DNA Rehydration Solution) ilave edilerek 65 °C’de 1 saat inkübe edildi. Bu bir saatlik inkübasyon süresi boyunca aralıklı olarak eppendorflara hafifçe vurularak çözelti karıştırıldı.

- Elde edilen gDNA +4 °C’de saklandı.

### 2.2.3. Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)” kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

- pUC18 plazmitini içeren *E.coli* JM101 hücresinden 50 µg/mL amfisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C’de bir gece çalkalayıcı hava banyosunda inkübasyon yapılarak gece kültürü hazırlandı.

- 1-5 mL gece kültürü 10.000xg’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Eppendorf tüp ters çevrilip, kâğıt bir havlu üzerine bastırılarak ortamda kalan fazla besiyerinin tamamen uzaklaşması sağlandı.

- Bakteri peltesinin üzerine 250 µL Hücre Süspansiyon Çözeltisi (Cell Resuspension Solution) ilave edilip vortekslenerek hücrelerin süspansiyon olması sağlandı.

- 250 µL Hücre Lizis Çözeltisi (Cell Lysis Solution) ilave edildikten sonra eppendorf tüp 4 kere altüst edildi. Hücre süspansiyonu berraklaşana kadar (yaklaşık 5 dakika) oda sıcaklığında bekletildi.

- 10 µL Alkali Proteaz Çözeltisi (Alkaline Protease Solution) ilave edilip eppendorf tüp 4 defa altüst edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

- 350 µL Nötralizasyon Çözeltisi (Neutralization Solution) ilave edildikten sonra eppendorf tüp hemen 4 kere altüst edildi.

- Elde edilen bakteriyal lizat 14.000xg’de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant, toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan minikolon içine aktararak 14.000xg’de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolona 750 µL Kolon Yıkama Çözeltisi (Column Wash Solution) ilave edildi ve 14.000xg’de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolona 250 µL Kolon Yıkama Çözeltisi ilave edilerek 14.000xg'de oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj edildi.

- Minikolon temiz bir eppendorf tüpüne yerleştirildi ve minikolon içine 100 µL Nükleaz İçermeyen Su (Nuclease-Free Water) ilave edildi. 14.000xg'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilerek elde edilen plazmit DNA çözeltisi -20 °C'de saklandı.

#### 2.2.4. DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Genomik ve plazmit DNA çözeltilerinin konsantrasyonu, nükleotitlerin heterosiklik halkalarının 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum absorbe etme özelliğinden yararlanılarak ölçüldü (Temizkan ve Arda, 2004). DNA çözeltisi saf su ile 100 kat seyreltilerek 260 nm'de absorbans okundu. 1 absorbans değeri, çift iplikli DNA için 50 µg/mL'ye karşılık gelmektedir. DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında eşitlik (1) kullanıldı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL veya ng}/\mu\text{L}) = 260 \text{ nm'deki absorbans} \times \text{Seyrelme Faktörü} \times 50 \quad (1)$$

#### 2.2.5. Genomik DNA ve pUC18 Plazmit DNA'sının *EcoR* I ile Kesimi

İzole edilen gDNA ve pUC18 plazmit DNA'sı son hacmi 50 µL olacak şekilde hazırlanan karışımda *EcoR* I ile ayrı ayrı kesildi.

gDNA/pUC18	10 µg
10X <i>EcoR</i> I tamponu	5 µL
<i>EcoR</i> I (10 U/µL)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımları 37 °C'de 8 saat inkübe edildikten sonra enzimin deaktivasyonu için 65 °C'de 20 dakika bekletildi. Sonuçlar agaroz jel elektroforezinde incelendi.

### 2.2.6. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA elektroforezi moleküler biyolojide oldukça gerekli bir tekniktir ve temeli negatif yüklü DNA'nın bir matriks üzerinde büyüklüğüne göre ayrılmasına dayanır. DNA elektroforezi genellikle bir deniz yosunu özütü olan agaroz ve Tris tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilir. Agaroz jel elektroforezi yapmak amacıyla aşağıdaki yöntem takip edildi (URL-9, 2008).

- %1'lik agaroz jel hazırlamak için 0,30 g agaroz tartılıp, 30 mL 1X TAE tamponu içinde mikrodalga fırında 1 dakika tutularak çözüldü.
- Sıcak agaroz çözeltisi 50-55 °C'ye gelinceye kadar oda sıcaklığında bekletildi ve 3 µL etidiyum bromür çözeltisi ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra jel tablasına dökülerek kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi.
- Jel donduktan sonra, elektroforez kabı 1X TAE ile doldurulup her bir kuyucuğa 1 µL jel yükleme boyası ile ayrı ayrı karıştırılmış olan 5 µL DNA yüklendi.
- Yaklaşık 1 saat boyunca 100 mA elektrik akımı uygulandı.
- Jel görüntüleri, jel görüntüleme cihazında Kodak Molecular Imaging System programı yardımıyla incelenip kaydedildi.

### 2.2.7. DNA'nın Etanol ile Çöktürülmesi

Nükleaz enzimleriyle yapılan kesim işlemini takiben çözelti içinde kalan proteinlerin uzaklaştırılması ve DNA'nın saflaştırılması amacıyla etanol çöktürmesi yapıldı. Bu amaçla aşağıdaki yöntem takip edildi (URL-10, 2008).

- Tuz konsantrasyonunu 0,3 M'a ayarlamak için DNA çözeltisi üzerine 1/10 kadar 3 M sodyum asetat (pH 5,2) ilave edilip iyice karıştırıldı.
- Son hacmin 2,5 katı kadar %96'luk soğuk etanol ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra -20 °C'de 1 saat bekletildi.
- Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- DNA peltesi üzerine 500 µL %96'luk soğuk etanol ilave edilerek hafifçe karıştırıldı ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

- Yıkama işlemi 500 µL %70'lik soğuk etanol ile tekrarlandı. 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

- Eppendorf tüp içindeki DNA, etanolün tamamen uzaklaşması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

Pelte halindeki DNA, 25 µL nükleaz içermeyen suda çözülerek -20 °C'de saklandı.

### 2.2.8. gDNA Parçalarının pUC18 Vektörüne Ligasyonu

*EcoR* I ile kesilen gDNA'dan elde edilen parçalar yine aynı enzimle kesilen pUC18 vektörüne T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla yapıştırıldı.

gDNA kesigi	3 µL
pUC18 kesigi	1 µL
10X ligaz tamponu	1 µL
T4 DNA Ligaz (3 U/µL)	3 µL
Nükleaz içermeyen su	2 µL

Reaksiyon karışımı 16 °C'deki ligasyon fırınında 1 gece bekletildi.

### 2.2.9. Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücreler kalsiyum klorür metoduna göre hazırlandı (Maniatis vd.,1989). Genomik DNA kütüphanesi oluşturmak amacıyla ve diğer klonlama işlemleri için *E. coli* JM101 suşundan, ekspresyon yapmak amacıyla ise *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşundan kompetent hücre hazırlandı.

- 3 mL LB besiyerine daha önceden LB agar besiyerinde büyütülmüş olan kolonilerden (*E. coli* suşundan) ekim yapıldı ve çalkalayıcılı hava banyosunda 37 °C'de 1 gece inkübasyon yapılarak gece kültürü hazırlandı.

- Hazırlanan bu gece kültüründen 300 µL alınarak 30 mL LB besiyeri içeren erlen içine aktarıldı ve karışımın 600 nm'deki optik yoğunluğu 0,4-0,6 arasında bir değere ulaşmaya kadar yaklaşık 2 saat 37 °C'de büyütüldü.

- Bu optik yoğunluk aralığına ulaşan hücre kültürü steril bir tüpe aktarılarak 4 °C’de 4.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüp içine 10 mL 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ilave edildi ve hücre peltesi yavaşça pipetlenerek süspansiyon haline getirildi.
- Süspansiyon, 30 dakika buz içinde bekletildikten sonra 4 °C’de 4.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelte, 2 mL 0,1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde tekrar süspansiyon edilerek 200 µL’lik kısımlar halinde steril eppendorf tüplerine bölündü.
- Kompetent hücreler 2 saat buzda bekletilip transformasyona hazır hale getirildi.

### 2.2.10. Transformasyon

Rekombinant olan ve olmayan pUC18 vektörlerini birbirinden ayırabilmek için 2.2.8. nolu kısımda anlatıldığı şekilde elde edilen ligasyon ürünü önceden hazırlanan kompetent hücrelere aktararak çoğaltıldı (Maniatis vd.,1989).

- Eppendorf tüp içinde bulunan kompetent hücrelere 3-5 µL ligasyon ürünü ilave edilerek 30 dakika buz içinde bekletildi.
- Karışım, 2 dakika 42 °C’de bekletilerek plazmitin hücre içine girmesi sağlandı.
- Bu sürenin bitiminde buz içine alınan hücrelere 200 µL LB besiyeri eklenerek 37 °C’de 1 saat bekletildi.
- Eppendorf tüp içindeki süspansiyon karışım, 50 µg/mL amfisilinli LB agar içeren, sırasıyla 45 µL IPTG ve 45 µL X-Gal sürülmüş ve iyice kurutulmuş petrilere yayma ekim yöntemiyle ekilerek 37 °C’de 1 gece bekletildi ve plazmiti içeren hücrelerin büyümesi sağlandı.

### 2.2.11. Rekombinant Plazmitlerin Seçimi, İzolasyonu ve DNA Sıra Analizi

Petrilerde büyüyen mavi ve beyaz kolonilerden sadece beyaz olanlar seçilip 50 µg/mL amfisilin içeren LB besiyerine ekilerek, 37 °C’de bir gece büyütülüp gece kültürleri hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden 900 µL alınıp 300 µL %80’lik gliserol çözeltisi ile karıştırılarak, gliserol stoğu hazırlandı. Hazırlanan stoklar, gerektiğinde kullanabilmek amacıyla -20 °C’de saklandı. Hazırlanan gece kültürlerinden

aynı zamanda kit kullanılarak plazmit izolasyonu yapıldı ve izole edilen plazmitler DNA sıra analizi için MacroGen Inc.(Güney Kore)'ye gönderildi.

### 2.2.12. DNA Sıralarının İncelenmesi

MacroGen Inc.'den gelen DNA sıraları öncelikle protein sırasına dönüştürüldü (URL-11, 2008) ve daha sonra BLAST programı (URL-12, 2008) yardımıyla incelendi.

### 2.3. Maltojenik Amilaz (*Gca* TK4 MA) Geninin Eksik Kalan Kısımlarının İncers PCR ile Bulunması

İncers PCR, DNA sırası bilinen bir bölgenin hemen yan tarafının DNA'sının *in vitro* olarak çoğaltılması için kullanılan bir metottur (Ochman vd., 1988). Bu metotta normal PCR'daki yönün tersi şekilde yönlenmiş olan primerler kullanılarak PCR yapılır. Bu primerler için kullanılan DNA kalıbı ise bir çember oluşturmak üzere kendi üzerine yapılmış olan restriksiyon parçasıdır.

#### 2.3.1. İncers PCR İçin Primer Tasarlanması

Gelen sonuçların incelenmesinden sonra vektöre aktarılan gDNA parçalarından birinin Maltojenik amilaz genini içerdiği tespit edildi. *Gca* TK4 MA geninin başında yaklaşık 822 bazlık ve sondan ise 741 bazlık kısmının belirlenebilmesi için 3 farklı incers PCR yapıldı. Genin eksik kalan kısmının incers PCR yardımıyla bulunabilmesi amacıyla, bilinen DNA sıralarından yola çıkarak bir set ileri ve geri primerler MaF1, MaR1, MaF2, MaR2, MaF3 ve MaR3 tasarlandı (Tablo 8). Yapılan birinci incers PCR sonuçları incelendiğinde genin başında 681 bazlık ve sonunda 183 bazlık bir kısmın hala eksik olduğu tespit edildi ve bu sebeple ikinci incers PCR işlemi gerçekleştirildi. Yapılan ikinci incers PCR sonucunda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde genin sonunda DUR kodonunun yakalandığı ancak baştan hala 66 bazlık bir kısmın eksik olduğu tespit edildi. Genin tam sırasının belirlenebilmesi amacıyla, gDNA parçaları kalıp olarak kullanılarak, hem MaF3, MaR3 ve hem de MaF2, MaR2 ve MaF1 primerlerinin farklı kombinasyonları ile tekrar incers PCR yapıldı.

### 2.3.2. Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

*G. caldxylolyticus* TK4 genomik DNA'sı primer çiftleri arasında kalan, sırası bilinen bölgeyi kesmeyen *Ava* II, *Bfa* I, *Nde* I, *Hind* III, *Psp* G I ve *Pst* I enzimleriyle kesildi.

*Ava* II için;

gDNA	10 µg
10X C tamponu	5 µL
BSA	5 µL
<i>Ava</i> II (10 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

*Nde* I için;

gDNA	10 µg
10X R tamponu	5 µL
<i>Nde</i> I (10 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

*Bfa* I için;

gDNA	10 µg
10X 4 tamponu	5 µL
<i>Bfa</i> I (10 U/µL)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

*Hind* III için;

gDNA	10 µg
10X E tamponu	5 µL
BSA	0,5 µL
<i>Hind</i> III (10 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

*Psp* G I için,

gDNA	10 µg
10X 2 tamponu	5 µL
<i>Psp</i> G I (10 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

*Pst* I için,

gDNA	10 µg
10X 0 tamponu	5 µL
<i>Pst</i> I (10 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Reaksiyon karışımları uygun şartlar altında inkübe edildikten sonra enzimler deaktive edildi.

### 2.3.3. DNA Parçalarının Ligasyonu

Etanol ile çöktürülerek temizlenmiş olan enzim kesikleri DNA parçalarının her birinin kendi üzerine yapışarak dairesel forma dönüşmesi için T4 DNA Ligaz enzimi kullanılarak ligasyon yapıldı (Maniatis vd.,1989).

Kesik gDNA karışımı	25 µL (yaklaşık 5 µg)
10X ligaz tamponu	25 µL
T4 DNA Ligaz (3 U/µL)	3 µL
Nükleaz içermeyen su	197 µL

Reaksiyon karışımı, 23 °C'de 1 gece bekletildikten sonra etanol çöktürmesi yapılarak protein ve diğer bileşenler uzaklaştırıldı. Bu sayede invers PCR için kullanılacak kalıp DNA elde edilmiş oldu.



### 2.3.4. İnvrs PCR

İnvrs PCR için, kalıp DNA, primer çiftleri, dNTP karışımı, tampon ve DNA polimerazın ilavesi ile ayrı ayrı reaksiyon karışımları hazırlandı (Tablo11) ve uygun şartlarda (Tablo 12) PCR yapıldı. Sonuçlar %1'lik agaroz jelde incelendi.

Tablo11. İnvrs PCR'da kullanılan kimyasallar

Bileşen	Kullanılan Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL
İleri primer	1 µL (20 pmol)
Geri primer	1 µL (20 pmol)
MgCl <sub>2</sub> çözeltisi (25 mM)	4 µL
5X Yeşil GoTaq Flexi reaksiyon tamponu	10 µL
GoTaq Flexi DNA polimeraz (5 U/µL)	0,25 µL
Kalıp DNA	1 µg
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Tablo 12. İnvrs PCR uygulama şartları

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Çevrim Sayısı
İlk Denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması	53, 55	1	36
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	3	1

### 2.3.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması için “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)” kiti kullanıldı.

- PCR ürününü içeren reaksiyon karışımına eşit hacimde Membran Bağlanma Çözeltisi (Membrane Binding Solution) ilave edilip karıştırılarak toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan minikolon içine aktarıldı.

- Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra 16.000 x g’de 1 dakika santrifüj edilip minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Minikolona 700 µL Membran Yıkama Çözeltisi (Membrane Wash Solution) ilave edilip 16.000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı.

- Yıkama işlemi 500 µL yıkama çözeltisi kullanılarak tekrarlandı. 16.000 x g’de 5 dakika santrifüj edildi.

- Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırılarak yıkama çözeltisinden gelen etanolün tamamen uzaklaşması için 1 dakika daha santrifüj edildi.

- Minikolon temiz bir eppendorf tüpüne alınıp 50 µL nükleaz içermeyen su ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Saf PCR ürünü +4 °C’de saklandı.

### 2.3.6. PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Ligasyonu

PCR ürünleri pGEM-T Easy klonlama vektörüne T4 DNA Ligaz enzimi yardımı ile yapıştırıldı.

Saf PCR ürünü	3,5 µL
2X ligaz tamponu	6 µL
pGEM-T Easy vektörü	0,5 µL
T4 DNA Ligaz (3 U/µL)	2 µL

Reaksiyon karışımları +4 °C’de bir gece bekletilerek ligasyon gerçekleştirildi.



#### 2.4.2. *Gca* TK4 MA Geninin Tamamının PCR Yöntemiyle Çoğaltılması

gDNA, primerler, dNTP karışımı, tampon ve DNA polimerazın ilavesi ile bir reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo13) ve uygun programa (Tablo 14) ayarlanan PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi. Sonuçlar %2'lik agaroz jelde incelendi.

Tablo13. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler

Bileşen	Kullanılan Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	1 µL
İleri primer	1 µL (20 pmol)
Geri primer	1 µL (20 pmol)
MgCl <sub>2</sub> çözeltisi (25 mM)	4 µL
5X Yeşil GoTaq Flexi reaksiyon tamponu	10 µL
GoTaq Flexi DNA polimeraz (5 U/µL)	0,25 µL
gDNA	1 µg
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 50 µL'ye tamamlandı

Tablo 14. PCR reaksiyonun şartları

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Çevrim Sayısı
İlk Denatürasyonu	95	2	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması	55	1	36
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	5	1

Agaroz jelde istenilen büyüklükte görüntülenen PCR ürünü “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)” kiti kullanılarak saflaştırıldı.

### 2.4.3. PCR Ürünü ve pET-28a(+) Vektörünün *Nhe* I ve *Hind* III İle Kesilmesi

Daha sonra saf PCR ürünü ve pET-28a(+) vektörü *Nhe* I ve *Hind* III ile kesilerek her iki uçtan da sarkık uçlar oluşturularak ligasyona hazır hale getirildi.

pET-28a(+) vektörü /PCR ürünü	10 µL (yaklaşık 1 µg)
10X Tango tamponu	2 µL
<i>Hind</i> III (10 U/µL)	2 µL
<i>Nhe</i> I (10 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	5 µL

Reaksiyon karışımları 37 °C’de 4 saat inkübe edildikten sonra, 65 °C’de 20 dakika bekletilerek enzimlerin deaktivasyonu sağlandı.

### 2.4.4. Kesik PCR Ürününün ve pET-28a(+) Vektörünün Ligasyonu

Kesim enzimleri kullanılarak her iki uçtan da kesilen PCR ürünü ve pET-28a(+) ekspresyon vektörü etanol ile çöktürülerek saflaştırıldı ve T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla birbirlerine yapışması sağlandı.

Kesik PCR ürünü ve pET-28a(+) vektörü	10 µL
10X ligasyon tamponu	2,5 µL
T4 DNA Ligaz, HC (20 U/µL)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	1,5 µL

Elde edilen reaksiyon karışımı 16 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

### 2.4.5. Rekombinant pET-28a(+) Vektörünün *E. coli* BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu

Elde edilen ligasyon ürünü önceden hazırlanan *E. coli* BL21(DE3)pLysS kompetent hücrelerine uygun şartlarda aktarıldı. Rekombinant vektörü içeren bu kompetent hücreler 50 µg/mL kanamisinli LB agar içeren ve 45 µL IPTG eklenip iyice yayılarak kurutulmuş olan petrilerin üzerine yayma ekim yöntemiyle ekildi. Petriler, 37 °C’de 1 gece bekletilerek plazmiti içeren hücrelerin büyümesi sağlandı. Gece boyu bekletilen petrilerde büyüyen kolonilerin tamamı seçildi ve 50 µg/mL kanamisin içeren LB besiyerine ekimi yapılarak yine 37 °C’de büyütülüp gece kültürleri hazırlandı. Elde edilen gece kültürlerinden hem

gliserol stoğu hazırlandı hem de plazmit izolasyonu yapıldı. İzolasyonu yapılan plazmitler *Nhe* I ve *Hind* III kesim enzimleriyle kesilerek klonlama yapılan vektörün gen parçasını içerip içermediği kontrol edildi.

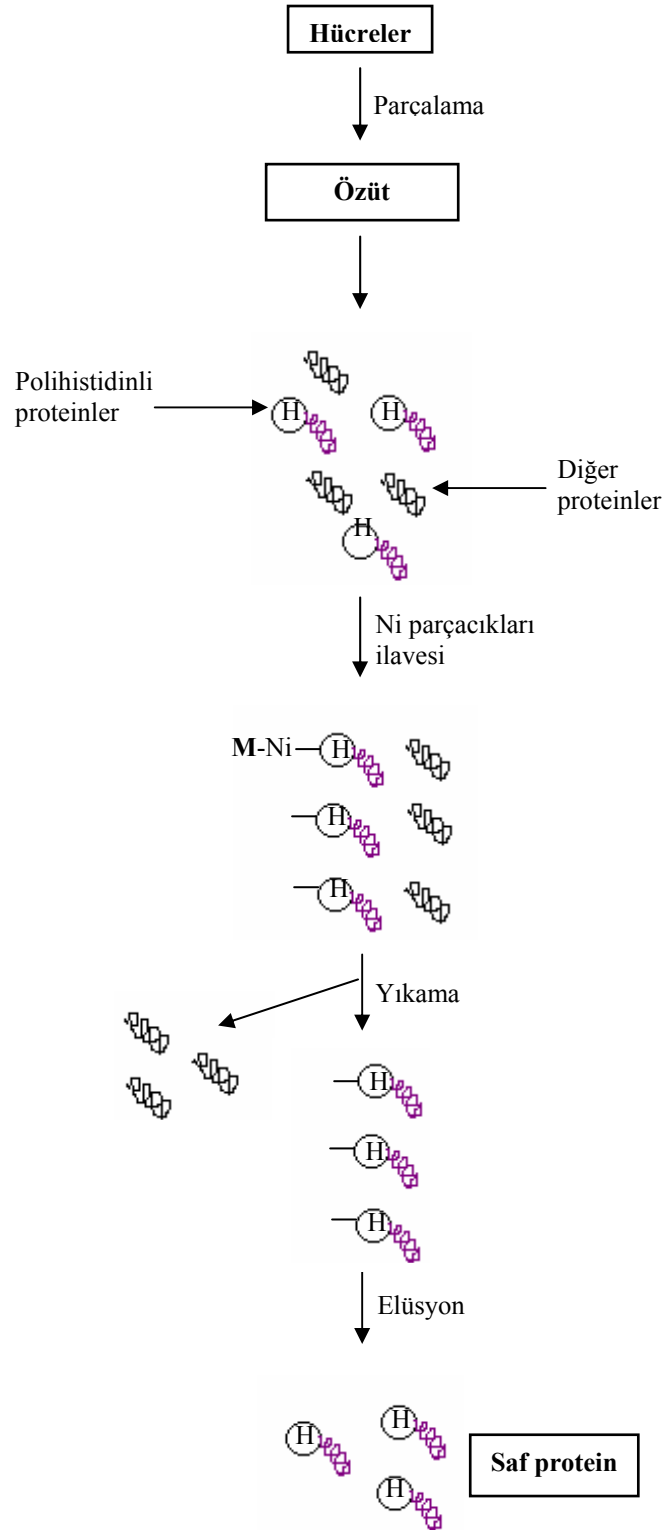
#### 2.4.6. *Gca* TK4 MA'ın *E. coli* BL21(DE3)pLysS'de Ekspresyonu

Rekombinant *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerinin gliserol stoğundan 50 µg/mL kanamisin içeren 3 mL LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 1 gece büyütülüp gece kültürü hazırlandı. Hazırlanan bu gece kültürü %1 (v/v) olacak şekilde 50 µg/mL kanamisin içeren LB'ye aktarılarak OD<sub>600</sub> = 0,6-1,0 arasındaki bir değere ulaşana kadar büyütme işlemine devam edildi. Hücre yoğunluğu istenilen optik değere ulaştığında nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde izopropil β-D-tiyogalaktopiranozid (IPTG) ilavesiyle ve 37 °C'de 4 saat indüklemeye yapıldı.

#### 2.5. *E. coli* BL21(DE3)pLysS'de Ekspres Edilen *Gca* TK4 MA'ın Saflaştırılması

Yapılan 4 saat indüklemenin ardından hücreler 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı. Toplanan bu hücreler, 1 mL 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) tamponunda süspansiyeye edilerek, karışıma 0,5 mg/mL içerecek şekilde lizozim ilave edildi ve 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra hücreler, sonikatör cihazında %80 şiddetinde, 1 devirde 5 dakika boyunca bırakılarak patlatıldı. Oluşan ham karışım +4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant ham enzim özütü olarak kullanıldı. Ön saflaştırma amacıyla, ham enzim özütü 75 °C'de 15 dakika bekletilerek denatüre olan proteinlerin 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmesiyle uzaklaştırılması sağlandı.

Ekspres edilen *Gca* TK4 MA, N-ucunda klonlama yapılırken 6 tane histidin biriminin eklenmiş olmasından dolayı, nikel afinite kolonu içeren "MagneHis Protein Purification System (Promega)" kullanılarak saflaştırma işlemi yapıldı (Şekil 15).



Şekil 15. *Gca* TK4 MA saflaştırılması amacıyla kullanılan MagneHis Protein Saflaştırma sisteminin şematik gösterimi

Elde edilen ham özütteki *Gca* TK4 MA enzimini saflaştırmak amacıyla aşağıda izah edilen metot izlendi:

*E. coli* proteinleri ısı şoku yardımıyla kısmen uzaklaştırılmış olan eppendorf tüp içindeki 1 mL özüte, 120 µL vortekslenmiş Ni<sup>2+</sup> ve bağlanmayı kolaylaştırmak amacıyla nihai konsantrasyonu 500 mM olan NaCl ilave edildi. Oda sıcaklığında 4 dakika alt üst edilerek karıştırıldı. Bu işlem sonucunda, rekombinant proteinin N-ucunda bulunan 6 tane histidin aminoasidinden dolayı protein +2 yüklü nikel iyonlarına bağlanarak özütten ayrıldı.

Ni parçalarını tüpün iç cidarında toplamak amacıyla tüp manyetik tutucuya yerleştirildi ve 1 dakika bekletildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

Manyetik tutucudan alınan eppendorf tüp içine 1000 µL Bağlanma/Yıkama tamponu ilave edildi ve 2 dakika boyunca yavaşça alt üst edilerek Ni parçaları yıkandı. Tüp manyetik tutucuda 1 dakika tutulduktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

Yıkama işlemi 750 µL Bağlanma/Yıkama tamponu kullanılarak 1 defa daha tekrarlandı.

Ni parçaları üzerine 150 µL elüsyon tamponu ilave edildi ve tüp oda sıcaklığında 4 dakika yavaşça alt üst edildikten sonra manyetik standda yerleştirildi. Süpernatant dikkatlice alınarak +4 °C'de saklandı.

## **2.6. *Gca* TK4 MA'ın Biyokimyasal Karakterizasyonu**

### **2.6.1. Protein Tayini**

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirildi (Lowry vd., 1951) Protein standardı olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı.

Kalibrasyon grafiği çizebilmek amacıyla hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konuldu. Bu şekilde tüplerde BSA'nın nihai konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olması sağlandı.

Standart içeren tüplerin dışında saf proteinden ayrı bir deney tüpüne 3 µL ilave edildi.

Standartların ve örneğin son hacimlerini 500 µL'ye tamamlayacak şekilde 0,1 N NaOH içindeki %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.



Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi (%2 sodyum-potasyum tartarat, %1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 0,1N NaOH içerisinde %2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi

Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100  $\mu\text{L}$  ilave edildi ve karanlık ortamda 30 dakika bekletildi.

650 nm'de absorbanslar okundu.

Kalibrasyon grafiği çizilerek saf proteinin konsantrasyonu hesaplandı.

### 2.6.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre %5'lik yığma jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 15).

Tablo 15. SDS-PAGE elektrofrezinde kullanılan bileşenler ve oranları

	%5'lik Yığma Jeli Bileşenleri (mL)	%12'lik Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	3,3
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	4,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5
%10'luk SDS	0,04	0,1
%10'luk % 10 Amonyum persülfat (APS)	0,04	0,1
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	0,004	0,004

Hazırlanan jel karışımı plakalar arasına yüklendikten sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık olarak 40  $\mu\text{g}$  saf protein SDS yükleme çözeltisi ile karıştırılıp kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Bu sayede üç boyutlu yapısı bozulan proteinler Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Proteinler, yığma jelinden çıkana kadar 20 mA'de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi ilave edildi ve yavaş bir şekilde 10 dakika sallanarak bekletildi. Boyanan jel, boyanın fazlasını uzaklaştırmak ve protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandı.

### 2.6.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal PAGE)

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5'lik yığıma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 16).

Tablo 16. Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları

	%5'lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	%10'luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,74	4,1
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1,5 M Tris (pH 8,8)	---	2,5
%10'luk APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Jel SDS-PAGE'de olduğu gibi ancak SDS içermeyecek şekilde hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Yaklaşık 40 µg saf protein doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırdı ve Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, boya yığıma jelinden çıkana kadar 20 mA'de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi ilave edildi ve yavaş bir şekilde 10 dakika sallanarak bekletildi. Boyanan jel, boyanın fazlasını uzaklaştırmak ve protein bantları görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandı.

Substrat boyaması için, doğal-PAGE jeline %1'lik nişasta çözeltisi ilave edildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra 45 °C'de yaklaşık olarak 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel üzerine boyama çözeltisi ilave edilerek protein bantı görünür hale getirildi.

### 2.6.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi için, dakikada 1 µM maltoz açığa çıkaran enzim miktarı bir ünite olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi tayini 3,5-dinitrosalisilik asit metodu (DNS)

kullanılarak yapıldı (Miller, 1959). 200  $\mu$ L 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0) ve 250  $\mu$ L  $\beta$ -siklodekstrin ( $\beta$ -CD) karıştırılarak enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değerinde 5 dakika ön ısıtma işlemi yapıldı. Daha sonra saf enzim daha önceden ısıtılmış olan bu karışım üzerine ilave edilerek 30 dakika boyunca aynı sıcaklıkta inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak ve renklendirmek amacıyla, karışım üzerine 500  $\mu$ L DNS çözeltisi ilave edilerek su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Reaksiyon karışımının absorbanı spektrofotometrede 575 nm’de ölçüldü.

### 2.6.5. İnce Tabaka Kromatografisi

Maltojenik amilazın substratıyla etkileşimi sonucu ortaya çıkan parçalanma ürünlerinin kalitatif olarak belirlenmesi amacıyla ince tabaka kromatografisi (TLC) yapıldı. Bu amaçla, TLC kartı (Kieselgel-Silica gel/TLC-cards ) 110 °C’de 30 dakika bekletilerek aktive edildi. Örnekler tabaka üzerine tatbik edildikten sonra TLC kartı, 3:1:1 (v/v/v) oranında karıştırılmış, izopropil alkol: etilasetat: su karışımının bulunduğu ve oda sıcaklığında bu çözeltinin buharıyla tamamen doymuş hale getirilmiş tank içerisine yerleştirildi. İşlem tamamlandıktan sonra kart, yürütme çözeltisinin uçurulması için etüvde kurutuldu. Daha sonra TLC kartı üzerinde oluşan görüntüyü görünür hale getirmek için, 1L metanol içerisinde 50 mL derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> olacak şekilde hazırlanan çözelti kartı kaplayacak şekilde ve tabaka üzerinden taşırmadan TLC kartı üzerine püskürtüldü ve 110 °C’de 10 dakika bekletildi.

### 2.6.6. Bazı Parametrelerin *Gca* TK4 MA Aktivitesi Üzerine Etkisi

#### 2.6.6.1. pH’nın Etkisi

*Gca* TK4 MA aktivitesi, pH’nın bir fonksiyonu olarak farklı pH’larda hazırlanan tampon çözeltiyle ve substrat olarak  $\beta$ -CD kullanılarak belirlendi. Bunun için, 50 mM konsantrasyonda hazırlanan pH 3,0-6,0 arasında Mcilvaine tamponu (sitrik asit/disodyum hidrojen fosfat tamponu) ve 7,0-9,0 arasında Tris-HCl tamponları kullanıldı. Tespit edilen optimum pH değerinden faydalanılarak substrat konsantrasyonu, protein miktarının ve diğer parametrelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

### 2.6.6.2. Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 10 °C'lik artışlarla 30-80°C aralığında sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. Tampon ve substrat çözeltisi karışımları, belirlenen optimum pH değerinde ve belirtilen sıcaklık aralığında 30 dakika inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar sıcaklığın fonksiyonu olarak grafiğe aktarıldı. Grafikte gözlenen tek pik optimum sıcaklık değeri olarak alındı.

### 2.6.6.3. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

*Gca* TK4 MA'nın konsantrasyonun değiştirilmesiyle enzim aktivitesinin değişimini incelemek ve aktivenin en yüksek olduğu optimum protein miktarını belirlemek amacıyla, önceden belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta ve sabit substrat miktarına karşılık proteinin değişen miktarlarına karşılık (0,01-1 mg/mL) aktivite değişimi grafiğe geçirildi.

### 2.6.6.4. Substrat Konsantrasyonu

Enzimin aktivite gösterdiği en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, daha önceden ifade edilen optimum şartlarda enzim aktivitesi değişen substrat miktarlarına (0,1-2 mg/mL) karşı belirlendi. Diğer parametrelerin belirlenmesinde ölçülen en yüksek hız değerindeki substrat konsantrasyonu kullanıldı.

### 2.6.6.5. Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısı kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim, 50-90 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda 10 °C'lik artışlarla 1, 5 ve 7 gün boyunca inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde enzim buz banyosunda 5 dakika bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığına getirilerek aktivite tayini yapıldı. Kalan yüzde *Gca* TK4 MA aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı.

#### **2.6.6.6. pH Kararlılığının İncelenmesi**

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 3,0-6,0 Mcilvaine tamponları ve pH 7,0-9,0 aralığında olan Tris-HCl tamponları ile 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 ve 50 °C’de toplam 7 güne kadar değişen sürelerde inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanan ancak inkübasyona bırakılmamış enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bulunarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı.

#### **2.6.6.7. Bazı Kimyasalların ve Metal İyonlarının Etkisi**

Aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve kimyasalların etkisini incelemek amacıyla, Li<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM’lık stok çözeltileri ve ayrıca PMSF, EDTA, Tween 20, ve 2-merkaptolanol (2-ME), kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 5 mM, kullanılan diğer kimyasalların ise nihai konsantrasyonları Tween 20 ve 2-ME %0,1; PMSF, SDS ve EDTA %1 nihai konsantrasyonda olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu ve kimyasal içermeyen karışımın aktivitesi elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı.

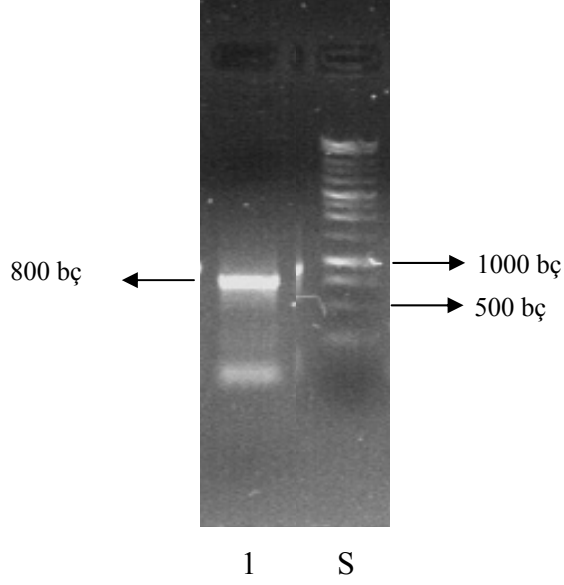
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Genomik DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

*Geobacillus caldxylolyticus* TK4 bakterisinden genomik DNA kütüphanesi oluşturmak için bakteriden elde edilen genomik DNA (gDNA) *EcoR* I enzimi ile kesildi ve oluşan DNA parçaları yine aynı enzimle kesilen pUC18 vektörüne yapıştırıldı. Rekombinant vektörün *E. coli* JM101'e aktarılmasıyla yaklaşık olarak 250 adet klon elde edildi. Elde edilen bu klonların 50 tanesinden plazmit izolasyonu yapılarak DNA sıraları belirlendi. DNA sıralarının protein sırası haline dönüştürülüp BLAST programı yardımıyla incelenmesi sonucunda 24 nolu klon içindeki 201 baz çifti içeren DNA parçasının, *Bacillus thermoalkalophilus* maltojenik amilazı, *Geobacillus kaustophilus* HTA426  $\alpha$ -siklodekstrinazı, *Bacillus* sp. WPD616 amilazı, *Thermus* sp. YBJ-1  $\alpha$ -siklodekstrinazı ve *Geobacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -siklodekstrinazı ile yaklaşık %88 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi. Ancak genin, baştan 822 bazlık, sondan ise 741 bazlık kısmının sırasının henüz belirlenemediği görüldü.

#### 3.2. Maltojenik Amilaz (*Gca* TK4 MA) Geninin Eksik Kalan Kısımlarının İncers PCR ile Elde Edilmesi

*Gca* TK4 MA geninin başında ve sonunda bulunan eksik kısımların DNA sırasının incers PCR yardımıyla bulunabilmesi amacıyla bilinen sıradan yola çıkarak uygun primerler tasarlandı ve *G. caldxylolyticus* TK4 gDNA'sı *Bfa* I enzimi ile uygun şartlar altında kesildi. *Bfa* I kesiği DNA parçalarının her birinin kendi üzerine yapışarak dairesel forma dönüşmesi için T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla ligasyon yapıldı. Oluşan ligasyon ürünü etanol ile çöktürülerek incers PCR için kalıp DNA hazır hale getirilmiş oldu. MaF1/MaR1 primer çifti kullanılarak incers PCR işlemi gerçekleştirildi. Sonuçların %1'lik agaroz jelde incelenmesiyle, yaklaşık 800 bazlık bir DNA parçasının varlığı gözlemlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Birinci invers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1: MaF1/MaR1 primer çifti ile elde edilen PCR ürünü, S: DNA standardı

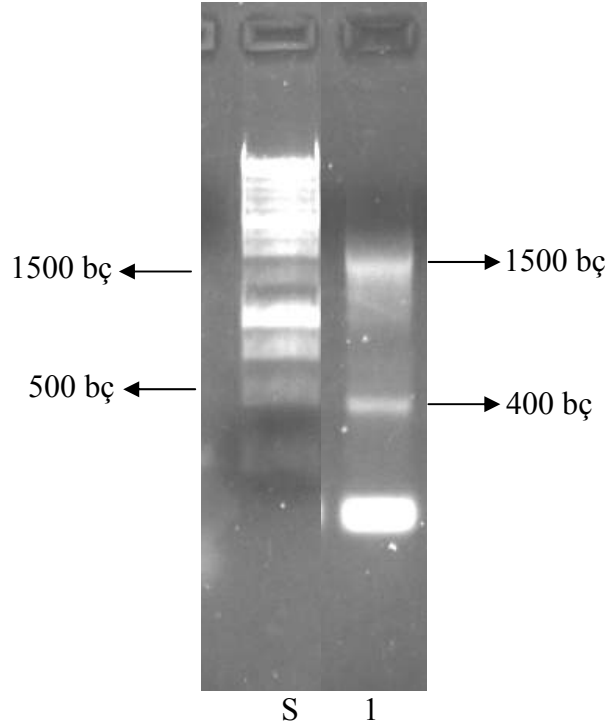
Elde edilen PCR ürünü saflaştırıldıktan sonra pGEM-T Easy vektörüne yapıştırıldı ve elde edilen rekombinant vektör *E. coli* JM101'e aktarıldı. *E. coli* hücreleri uygun şartlarda LBA besiyerinde büyütüldü ve elde edilen beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu yapılarak DNA sıra analizine gönderildi. Gelen sonucun DNA sırasının protein sırası haline dönüştürülüp BLAST programı ile incelenmesiyle birlikte genin baştan 681 bazlık ve sondan 183 bazlık kısmının hala eksik olduğu tespit edildi (Şekil 17).

Genin başında ve sonunda eksik kalan kısımların belirlenebilmesi amacıyla yeniden invers PCR yapıldı. Bu amaçla, *G. caldoxylolyticus* TK4 gDNA'sı, MaR2/MaF2 primerleri arasında kalan bölgeden DNA'yı kesmeyen *Hind* III, *Ava* II, *Bam*H I ve *Nde* I enzimleri ile uygun şartlar altında kesildi ve yukarıda anlatılan işlemler tekrarlanarak kalıp DNA invers PCR için hazır hale getirildi. *Ava* II enzimi ile kesim sonucu elde edilen DNA kullanılarak yapılan PCR'da yaklaşık 400 ve 1500 bazlık DNA parçalarının varlığı gözlemlendi. Bu DNA parçaları PCR saflaştırma kiti kullanılarak jelden alındı, saflaştırıldı ve gerekli işlemlerden sonra sıra analizine gönderildi. Gelen sonuçlarla, 1500 bazlık DNA parçasından elde edilen sıra ile var olan DNA sırası birleştirildi ve genin eksik kalan bazı kısımlarının belirlendiği görüldü (Şekil 18). BLAST programı ile yapılan inceleme sonucunda genin sonunda DUR kodonunun bulunduğu, ancak genin baştan 66 bazlık kısmının hala eksik olduğu tespit edildi.

CTAGTTGATCTTTGTCATGAAAAAGGGATACGTGTCATGTTAGACGCGGTGTTTAATCATT  
← **MaR2**
 GCGGCTACTATTTTGCACCGTTTCAAGATGTGCTGAAAAACGGGGAAGCATCTAAATATAA  
AGATTGGTTCCATATTCACGAATTCCCGCTCCAGACAACACCGAGGCCAAACTATGACGCG  
**TTTGCATTTGTCGCACAAATGCCAAAGCTAAATACGGAAAACCCCGAAGTGAAAAATATT**  
**TGTTAGACGTAGCGGCCTATTGGATTCAGGAATTTGACATCGACGGTTGGCGGCTCGATGT**  
**AGCCAATGAAATAGACCATCAATTTTGGCGCGAATTC**CGTCAGGTAGTAAAGTCTATGAAA  
 CCGGACGTTTATATTCTCGGAGAAAATTTGGCATGATGCGATGCCATGGCTGCGCGGCGATC  
 AGTTTGATGCCGTCATGAACTACCCATTTACCAATGGAGCAATCCGCTTTTTTTCGAAAAA  
 TGAAATTGGCGCCAAACAATTTGCGAATATCATTACTAATGTTCTTCACTCGTACCCGGAA  
 AACGTCAACGAAGTGGCGTTTCATTTGCTTGGCAGCCATGATACACCGAGAATTTTAACAG  
 TGTGCGACAATGATGTTCCGAAGGTCAAACGTTGTTTTTATTTTCAGCTCTCTTTTACCGG  
 TTCGCCATGCATATACTATGGCGATGAAATTGGCATGACCGGCGGGCAAGATCCAGGATGT  
 CGGAAATGTATGGTTTGGGAGGAAGAAAAACAAAATAGGGATATATTGGAGCATGTAAAAA  
 AACTGATTGCGCTTCGCAAAGCCCATCCCGCTTTCAGGCGGGGAAAAATTACATTTATGGA  
TGCAAGCGATGAATCAAACCATTTAATATATACGAAAACCTAT  
→ **MaF2**

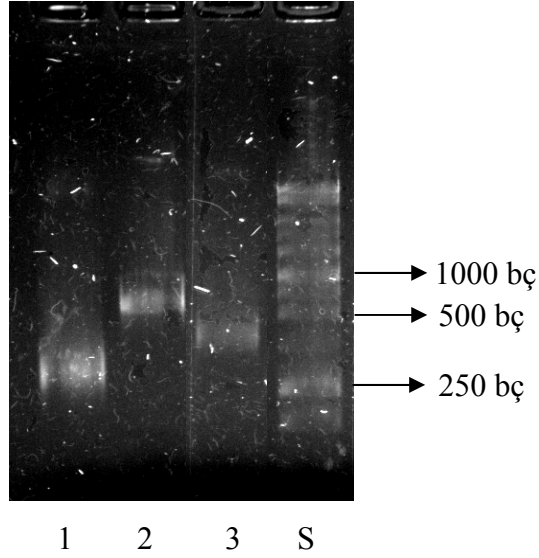
Şekil 17. *G. caldxylolyticus* TK4 MA geninin 681 bç'lik bölgesini içeren kısmı. Koyu yazılan DNA sırası ilk bilinen gen parçasını göstermektedir. Oklarla gösterilen bölgeler invers PCR için kullanılan primerlerin tam DNA sıralarını temsil etmektedir.





Şekil 18. İkinci invers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.  
1: MaF2/MaR2 primer çifti ile elde edilen PCR ürünü, S: DNA standardı

*Gca* TK4 MA geninin eksik kalan baş kısmının belirlenmesi amacıyla, MaF3, MaR3, MaF2, MaR2 ve MaF1 primerleri farklı kombinasyonlarda kullanılarak *G. caldoolyolyticus* TK4 gDNA'sı primerler arasında kalan bölgeden DNA'yı kesmeyen *Ava* II, *Pst* I ve *PspG* I enzimleri ile uygun şartlar altında kesildi. gDNA'nın bilinen sırasından yola çıkılarak gen parçası istenilen bölgeden kesilebileceğinden dolayı, invers PCR, genin eksik olan baş kısmının çoğaltılma ihtimalini arttırmış oldu (Şekil 19). İncelenen sıra analizi sonuçlarında *Pst* I enzimiyle yapılan kesimde genin tamamının belirlendiği görüldü (Şekil 20).



Şekil 19. MaF3, MaR3, MaF2, MaR2 ve MaF1 primerleriyle yapılan invers PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1: *Ava* II kesimi, 2: *Pst* I kesimi, 3: *PspG* I kesimi, S: DNA standardı

**YMaFS**  
**ATGTTTAAAGAAGCGATTTATCATCGTCCCAAAGATAACTTTGCTTACGCATACGACGAAAAACA**TTACATA  
 TTCGCCTGCGCAGAAAAAGGATGATGTGGAAGCCGTTTCATCTTCTTTACGCCGATCCATATGAATGGAAAGA  
**MaR3**  
 TGGCGTCTGGCAGCTAAATCGTGCACCTATGGTAAAAAGCGATCTGACGATTTATTTGACTATTGGTTTATC  
 GAAGTAATTCCCCATATCGCCGCCTTCGCTACGGATTTGAGTTAACGTCCGAAATGAAAAATAGTATATA  
 CAGAAAAAGGTTTTTATCATGAGGCACCGACAGACGATACGGCTTATTATTTTTGCTTTCCGTTTTTAAATAA  
 AATAGATGTATTTTCATGCACCGAATGGGTGAAAGACACTGTTTGGTATCAGATTTTCCCTGAACGCTTCGCT  
 AATGGAAATCCAGCTATCGATCCAGAAGGAACACTGCCATGGGCAAGTGAAGACCCGACACCAACGAGCTTTT  
 TCGGCGCGGATTTAGAAGGATTATCCAGCATCTCGACTATCTTGTCGACCTTGGCGTTAATGGCATTATTT  
 AACGCCTATTTTCCACGCACCTTCTAACCATAAATATGACACAACCAATTATTTCGAAATTGATCCTCACTTT

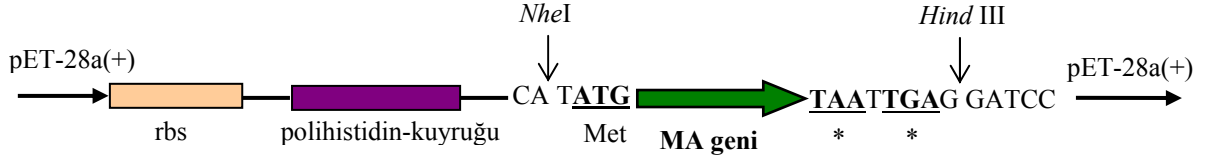
Şekil 20. *G. caldxylolyticus* TK4'ün MA gen dizini. Altı çizili yazılan kodonlar genin Metiyonun (ATG) ve DUR (TAA) kodonlarını göstermektedir. Koyu renkli yazılan kısım DNA'nın invers PCR ile çoğaltılan kısmıdır. Oklarla gösterilen bölgeler invers PCR için kullanılan primerlerin tam DNA sıralarını ve genin tamamını çoğaltmak için (YMaRS ve YMaFS) kullanılan primerlerin DNA sıralarının bir kısmını göstermektedir.

## Şekil 20'nin devamı

GGCGATAAACAAACATTCAAAAAACTAGTTGATCTTTGTCATGAAAAAGGGATACGTGTCATGTTAGACGCGG  
 TGTTTAATCATTGCGGCTACTATTTTGCACCGTTTCAAGATGTGCTGAAAAACGGGAAGCATCTAAATATAA  
 AGATTGGTTCCATATTCACGAATTCCCGCTCCAGACAACACCGAGGCCAAACTATGACGCGTTTGCATTTGTC  
 GCACAAATGCCAAAGCTAAATACGGAAAACCCCGAAGTGAAAAATATTTGTTAGACGTAGCGGCCTATTGGA  
 TTCAGGAATTTGACATCGACGGTTGGCGGCTCGATGTAGCCAATGAAATAGACCATCAATTTTGGCGCGAATT  
 CCGTCAGGTAGTAAAGTCTATGAAACCGGACGTTTATATTCTCGGAGAAATTTGGCATGATGCGATGCCATGG  
 CTGCGCGGCGATCAGTTTGATGCCGTCATGAACTACCCATTTACCAATGGAGCAATCCGCTTTTTTTCGAAAA  
 ATGAAATTTGGCGCCAAACAATTTGCGAATATCATTACTAATGTTCTTCACTCGTACCCGGAAAACGTCAACGA  
 AGTGGCGTTTCATTTGCTTGGCAGCCATGATACACCGAGAATTTAACAGTGTGCGACAATGATGTTTCGGAAG  
 GTCAAACCTGTTGTTTTTATTTTTCAGCTCTCTTTTACCGGTTTCGCCATGCATATACTATGGCGATGAAATTGGCA  
 TGACCGGCGGGCAAGATCCAGGATGTCGGAAATGTATGGTTTGGGAGGAAGAAAAACAAAATAGGGATATATT  
 GGAGCATGTAAAAAACTGATTGCGCTTCGCAAAGCCCATCCCGCTTTCAGGCGGGGAAAAATTACATTTATG  
 GATGCAAGCGATGAATCAAACCATTTAATATATACGAAAACCTATCTAGATGAAACGATTTTAGTCATGATCA  
ACAATAGCAGTAAGGAGATTGACATCACCGTTCCTTTGTCTTAAAAGGAAAAATGGCTTGTCAATTTATGGAC  
MaF2 YMaRS  
 AAATGAACAGTTTGGCTGCAGAAGCCGAAACATTGCGTGCTGCTATTCTCCATATAGCTAAACATTCAAAAAAC  
 TAGTTGATCTTTGTCATGAAAAAGGGATACGTGTCATGTTAGACGCGGTGTTTAATCATTGCGGCAAT  
MaF3

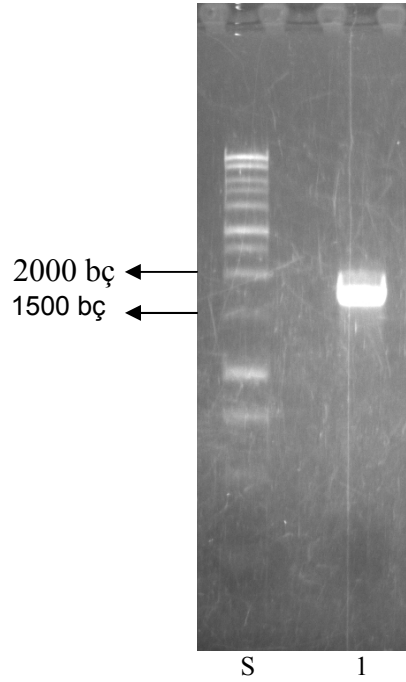
### 3.3. *Gca* TK4 MA Geninin pET-28a(+) Vektörüne Aktarılması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması

*Gca* TK4 MA geninin klonlanması amacıyla ekspresyon vektörü olarak pET-28a(+) kullanıldı. pET-28a(+) vektörü, ribozom bağlanma bölgesi (rbs)'nden sonra ve *Nhe* I kesim bölgesinin hemen önünde 6 tane histidin kodlayan kodon (polihistidin-kuyruğu) içermektedir. *Gca* TK4 MA geninin tamamı PCR ile çoğaltıldıktan sonra 5'-ucundan *Nhe* I ve 3'-ucundan ise *Hind* III ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilen pET-28a(+) vektörüne yapıştırıldığı takdirde oluşan rekombinant vektör *Gca* TK4 MA geninin başlama kodonundan hemen önce 6 tane histidin kodlayan kodon içermiş olur (Şekil 21). Bu durumda *Gca* TK4 MA, N-ucunda 6 tane histidin amino asidi (histidin kuyruğu) içeren bir kuyruğa sahip olacak şekilde hücre tarafından ekspres edilecektir.



Şekil 21. *Gca* TK4 MA geninin pET-28a(+) vektörüne aktarıldığı bölgenin şematik olarak gösterimi. Turuncu ile gösterilen bölge ribozom bağlanma bölgesini (rbs), mor ile gösterilen bölge 6 tane histidin birimini, yıldızla gösterilen kodonlar ise “DUR” sinyallerini göstermektedir.

*Gca* TK4 MA geninin tamamını çoğaltabilmek amacıyla, genin tam DNA sırası dikkate alınarak bir set primer tasarlanarak sentezletirildi. *G. caldxylolyticus* TK4 gDNA’sı ve bu primerler yardımıyla yapılan PCR sonucunda yaklaşık yaklaşık 1740 bazlık bir DNA parçasının varlığı gözlemlendi (Şekil 22).



Şekil 22. PCR ile tamamı çoğaltılan *Gca* TK4 MA geninin %2’lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1: PCR ile çoğaltılan *Gca* TK4 MA geni, S: DNA standardı

Elde edilen PCR ürünü *Nhe* I ve *Hind* III enzimi ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilen pET-28a(+) vektörüne klonlandı. Rekombinant vektör, *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücresine aktarılarak gece kültürü hazırlandı ve gerektiğinde kullanılmak üzere gliserol stoğu yapıldı. Stok kültür -20 °C’de saklandı.

*Gca* TK4 MA geninin tam DNA sırası protein sırasına dönüştürüldükten sonra (Şekil 23) BLAST programında incelenmesi ile elde edilen genin amino asit sırasının maltojenik amilaz başta olmak üzere neopullulanaz,  $\alpha$ -siklodekstrinaz, amilaz ve siklomaltodekstrinaza çeşitli oranlarda benzediği görüldü (Tablo 17).

```

atg ttt aaa gaa gcg att tat cat cgt ccc aaa gat aac ttt gct tac gca tac
M F K E A I Y H R P K D N F A Y A Y
gac gaa Aaa aca tta cat att cgc ctg cgc acg aaa aag gat gat gtg gaa gcc
D E K T L H I R L R T K K D D V E A
gtt cat ctt ctt tac gcc gat cca tat gaa tgg aaa gat ggc gtc tgg cag cta
V H L L Y A D P Y E W K D G V W Q L
aat cgt gca cct atg gta aaa agc gga tct gac gat tta ttt gac tat tgg ttt
N R A P M V K S G S D D L F D Y W F
atc gaa gta att ccc cca tat cgc cgc ctt cgc tac gga ttt gag tta acg tcc
I E V I P P Y R R L R Y G F E L T S
gga aat gaa aaa ata gta tat aca gaa aaa ggg ttt tat cat gag gca ccg aca
G N E K I V Y T E K G F Y H E A P T
gac gat acg gct tat tat ttt tgc ttt ccg ttt tta aat aaa ata gat gta ttt
D D T A Y Y F C F P F L N K I D V F
cat gca ccg gaa tgg gtg aaa gac act gtt tgg tat cag att ttc cct gaa cgc
H A P E W V K D T V W Y Q I F P E R
ttc gct aat gga aat cca gct atc gat cca gaa gga aca ctg cca tgg gca agt
F A N G N P A I D P E G T L P W A S
gaa gac ccg aca cca acg agc ttt ttc ggc ggc gat tta gaa ggg att atc cag
E D P T P T S F F G G D L E G I I Q
cat ctc gac tat ctt gtc gac ctt ggc gtt aat ggc att tat tta acg cct att
H L D Y L V D L G V N G I Y L T P I
ttc cac gca cct tct aac cat aaa tat gac aca acc aat tat ttc gaa att gat
F H A P S N H K Y D T T N Y F E I D
cct cac ttt ggc gat aaa caa aca ttc aaa aaa cta gtt gat ctt tgt cat gaa
P H F G D K Q T F K K L V D L C H E
aaa ggg ata cgt gtc atg tta gac gcg gtg ttt aat cat tgc ggc tac tat ttt
K G I R V M L D A V F N H C G Y Y F
gca ccg ttt caa gat gtg ctg aaa aac ggg gaa gca tct aaa tat aaa gat tgg
A P F Q D V L K N G E A S K Y K D W

```

Şekil 23. *G. caldxylolyticus* TK4 MA gen dizini ve protein sırası. (•••) ile gösterilen kodon genin DUR kodonunu temsil etmektedir.

## Şekil 23'ün devamı

ttc cat att cac gaa ttc ccg ctc cag aca aca ccg agg cca aac tat gac gcg  
 F H I H E F P L Q T T P R P N Y D A  
 ttt gca ttt gtc gca caa atg cca aag cta aat acg gaa aac ccc gaa gtg aaa  
 F A F V A Q M P K L N T E N P E V K  
 aaa tat ttg tta gac gta gcg gcc tat tgg att cag gaa ttt gac atc gac ggt  
 K Y L L D V A A Y W I Q E F D I D G  
 tgg cgg ctc gat gta gcc aat gaa ata gac cat caa ttt tgg cgc gaa ttc cgt  
 W R L D V A N E I D H Q F W R E F R  
 cag gta gta aag tct atg aaa ccg gac gtt tat att ctc gga gaa att tgg cat  
 Q V V K S M K P D V Y I L G E I W H  
 gat gcg atg cca tgg ctg cgc ggc gat cag ttt gat gcc gtc atg aac tac cca  
 D A M P W L R G D Q F D A V M N Y P  
 ttt acc aat gga gca atc cgc ttt ttt gcg aaa aat gaa att ggc gcc aaa caa  
 F T N G A I R F F A K N E I G A K Q  
 ttt gcg aat atc att act aat gtt ctt cac tcg tac ccg gaa aac gtc aac gaa  
 F A N I I T N V L H S Y P E N V N E  
 gtg gcg ttt cat ttg ctt ggc agc cat gat aca ccg aga att tta aca gtg tgc  
 V A F H L L G S H D T P R I L T V C  
 gac aat gat gtt cgg aag gtc aaa ctg ttg ttt tta ttt cag ctc tct ttt acc  
 D N D V R K V K L L F L F Q L S F T  
 ggt tcg cca tgc ata tac tat ggc gat gaa att ggc atg acc ggc ggg caa gat  
 G S P C I Y Y G D E I G M T G G Q D  
 cca gga tgt cgg aaa tgt atg gtt tgg gag gaa gaa aaa caa aat agg gat ata  
 P G C R K C M V W E E E K Q N R D I  
 ttg gag cat gta aaa aaa ctg att gcg ctt cgc aaa gcc cat ccc gct ttc agg  
 L E H V K K L I A L R K A H P A F R  
 cgg gga aaa att aca ttt atg gat gca agc gat gaa tca aac cat tta ata tat  
 R G K I T F M D A S D E S N H L I Y  
 acg aaa acc tat cta gat gaa acg att tta gtc atg atc aac aat agc agt aag  
 T K T Y L D E T I L V M I N N S S K  
 gag att gac atc acc gtt cct ttg tcc tta aaa gga aaa tgg ctt gtc aat tta  
 E I D I T V P L S L K G K W L V N L  
 tgg aca Aat gaa cag ttt gct gca gaa gcc gaa aca ttg cgt gct gct att cct  
 W T N E Q F A A E A E T L R A A I P  
 cca tat agc taa  
 P Y S ...

Tablo 17. *G. caldoxylolyticus* TK4'den elde edilen MA'nın amino asit sırasının diğer türlerdeki proteinlere benzerliği

Bakteri Adı	Protein	Benzerlik (%)
<i>Bacillus thermoalkalophilus</i>	Maltojenik amilaz	86
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	Neopullulanaz	76
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	BSMA (Maltojenik amilaz)	77
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Neopullulanaz	76
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	$\alpha$ -siklodekstrinaz	75
<i>Thermus sp.</i> YBJ-1	$\alpha$ -siklodekstrinaz	75
<i>Thermus sp.</i> IM6501	Maltojenik amilaz	75
<i>Bacillus sp.</i> WPD616	Amilaz	74
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Siklomaltodekstrinaz	73
<i>Bacillus cereus</i> G9842	Neopullulanaz	62

*G. caldoxylolyticus* TK4 MA'nın amino asit sırası ClustalW programı (URL-13) kullanılarak, *Bacillus thermoalkalophilus* maltojenik amilazı, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Geobacillus thermodenitrificans* neopullulanazının amino asit sıralarıyla karşılaştırılarak korunmuş bölgeler tespit edildi (Şekil 24). Karşılaştırma sonucunda, *Gca* TK4 MA'nın aktif bölgesinde bulunan Asp ve Glu amino asitlerinin yanında, oldukça korunmuş 6 bölgenin varlığı da ayrıca tespit edilmiş oldu.

<i>B. thermoalkalophilus</i>	MLKEA-IYHRPKDNFAYAYNEKTLH-IRLRRTKKNDIETVYLLYADDPYEWV 48
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	MFKEA--YHRPKDNFAYAYDEKTLH--RLRRTKKDDVEAVHLLYADDPYEWK 46
<i>G. stearothermophilus</i>	MFKEA-IYHRPKDNFAYAYDEQTLH-IRLRRTKKNDVEHVRLIYGDYPYEW 48
<i>B. stearothermophilus</i>	MRKEA-IYHRPADNFAYAYDSETLH-LRLRRTKKDDIDRVELLHGDPYDWQ 48
<i>G. thermodenitrificans</i>	MRKEA-IYHRPADNFAYAYDSETLH-LRLRRTKKDDIDRVELLHGDPYDWQ 48
<i>B. thermoalkalophilus</i>	NGVWQLNRAPMVKSGSDDLFDYWFIEVV--PPYRRLRYGFELTAGSET-I 95
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	DGVWQLNRAPMVKSGSDDLFDYWF--EV--PPYRRLRYGFELTSGNEK-- 90
<i>G. stearothermophilus</i>	NGHWQVSYQSMQKSGTDELFDYWFIALT--PPYRRLRYGFELTSNNEQ-I 95
<i>B. stearothermophilus</i>	NGAWQFQMMPMRKTGSDELFDYWFAEVK--PPYRRLRYGFVLYSGEEK-L 95
<i>G. thermodenitrificans</i>	NGAWQFQMMPMRKTGSDELFDYWFAEVK--PPYRRLRYGFVLYSGEEK-L 95
<i>B. thermoalkalophilus</i>	VYTEKGFYNEAPTD DTAYYFCFPFLNK-IDVFHAP EWAKDTI WYQ-IFPE 143
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	VYTEKGFYHEAPTD DTAYYFCFPFLNK--DVFHAP EWVKDTVWYQ--FPE 136
<i>G. stearothermophilus</i>	VYTEKGFYRTAPMD DTAYYFCFPFLNK-IDVFQAP EWVKDTI WYQ-IFPE 143
<i>B. stearothermophilus</i>	VYTEKGFYFEVPTD DTAYYFCFPFLHR-VDLFEAP DWVKDTVWYQ-IFPE 143
<i>G. thermodenitrificans</i>	VYTEKGFYFEVPTD DTAYYFCFPFLHR-VDLFEAP DWVKDTVWYQ-IFPE 143
<i>B. thermoalkalophilus</i>	RFANGNPS-LNPEGTLPWGSEEP TPTSFFGGDFEG--IIQHLDYLV ELGI 190
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	RFANGNPA--DPEGTLPWASEDPTPTSFFGGDLEG----QHLDYLV DLGV 180
<i>G. stearothermophilus</i>	RFANGNEA-LNPAGTLPWG S ADPTPTSFFGGDFEG--IIQKLDH LVDLGV 190
<i>B. stearothermophilus</i>	RFANGNPS-ISPEGSRPWG SEDPTPTSFFGGDLQG--IIDHLDYLV DLGI 190
<i>G. thermodenitrificans</i>	RFANGNPS-ISPEGSRPWG SEDPTPTSFFGGDLQG--IIDHLDYLV DLGI 190

Şekil 24. *G. caldoxylolyticus* TK4 MA'nın amino asit sırasının *Bacillus thermoalkalophilus* maltojenik amilazı ve *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans* neopululanazı ile karşılaştırılması. Yeşil renk ile boyalı amino asitler tüm sıralardaki korunmuş birimleri göstermektedir. Yıldız (\*) ile gösterilen birimler aktif bölgedeki korunmuş amino asitleri göstermektedir.



Şekil 24'ün devamı

<i>B. thermoalkalophilus</i>	NG-IYFTP-IFYAPSNHKYDTIDYFE-IDPHFGDKQTFKKLVLDLCHQKG-	236
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	NG--YLTP--FHAPSNHKYDTTNYFE--DPHFGDKQTFKKLVLDLCEKKG-	223
<i>G. stearothermophilus</i>	NG-IYFTP-IFKASSNHKYDTIDYFE-IDPQFGDKQTFKRLVELCHQKA-	236
<i>B. stearothermophilus</i>	TG-IYLTP-IFRSPSNHKYDTADYFE-VDPHFGDKETLKTLLIDRCHEKKG-	236
<i>G. thermodenitrificans</i>	TG-IYLTP-IFRSPSNHKYDTADYFE-VDPHFGDKETLKTLLIDRCHEKKG-	236
*		
<i>B. thermoalkalophilus</i>	IRVMLDAVFNHCGYYFAPFQDVLKNGNNSKYKDWFH-IHEFPLRTVPRPN	285
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	-RVMLDAVFNHCGYYFAPFQDVLKNGEASKYKDWFH--HEFPLQTTPRPN	270
<i>G. stearothermophilus</i>	IRVMLDAVFNHSGYEFPPFQDVLKYGENSKYKHWFH-IREFPLQTVPRPN	285
<i>B. stearothermophilus</i>	IRVMLDAVFNHCGYEFAPFQDVWKNGES SKYKDWFH-IHEFPLQTEPRPN	285
<i>G. thermodenitrificans</i>	IRVMLDAVFNHCGYEFAPFQDVWKNGES SKYKDWFH-IHEFPLQTEPRPN	285
*		
<i>B. thermoalkalophilus</i>	YDTFAFVEQMPKLNTENPEVKQYLLDVATYW-IREFD-IDGWRLDVANEV	333
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	YDAFAFVAQMPKLNTENPEVKKYLLDVAAYW--QEFD--DGWRLDVANE-	315
<i>G. stearothermophilus</i>	YDTFAFTPMPKLNTENQEVKNYLLDVATYW-IREFD-IDGWRLDVANEV	333
<i>B. stearothermophilus</i>	YDTFAFVPQMPKLNTANPEVKRYLLDVATYW-IREFD-IDGWRLDVANEI	333
<i>G. thermodenitrificans</i>	YDTFAFVPQMPKLNTANPEVKRYLLDVATYW-IREFD-IDGWRLDVANEI	333
*		
<i>B. thermoalkalophilus</i>	-DHQFWREFRQAVKAIKPDVY-ILGE-IWHDAMPWLRGDQF DAVMNY PFT	380
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	-DHQFWREFRQVVKSMKPDVY--LGE--WHDAMPWLRGDQF DAVMNY PFT	360
<i>G. stearothermophilus</i>	-DHQFWREFRQAVKTIKPDAY-ILGE-IWHDAMPWLRGDQF DAVMNY PFT	380
<i>B. stearothermophilus</i>	-DHEFWREFRQEVKALKPDVY-ILGE-IWHDAMPWLRGDQF DAVMNY PFT	380
<i>G. thermodenitrificans</i>	-DHEFWREFRQEVKALKPDVY-ILGE-IWHDAMPWLRGDQF DAVMNY PFT	380
*		

Şekil 24'ün devamı

*B. thermoalkalophilus* NGV-IRFFAKDE-IRAEQFAN--IIMNVLHSYPANVNEVAFNLLGSHDTP 426  
*G. caldoxylolyticus* TK4 NGA--RFFAKNE--GAKQFAN----TNVLHSYPENVNEVAFHLLGSHDTP 402  
*G. stearothermophilus* NGT-LRFFAQHE-IRASQFVG--MMTHVLHSYPTNVNEVAFNLLGSHDTP 426  
*B. stearothermophilus* DGV-LRFFAKEE-ISARQFAN--QMMHVLHSYPNNVNEAAFNLLGSHDTS 426  
*G. thermodenitrifican* DGV-LRFFAKEE-ISARQFAN--QMMHVLHSYPNNVNEAAFNLLGSHDTS 426

\*

*B. thermoalkalophilus* R-ILTTCNNDVRKVKLLFLFQLSFTGSPC-IYYGDE-IGMTGGQDPGCRK 473  
*G. caldoxylolyticus* TK4 R--LTVCNDVRKVKLLFLFQLSFTGSPC--YYGDE--GMTGGQDPGCRK 446  
*G. stearothermophilus* R-LLTLCKEDVRKAKLSFLFQLSFTGTPC-IYYGDE-IGITGDQDPGCRK 473  
*B. stearothermophilus* R-ILTVCGGDIRKVKLLFLFQLTFTGSPC-IYYGDE-IGMTGGNDPECRK 473  
*G. thermodenitrifican* R-ILTVCGGDIRKVKLLFLFQLTFTGSPC-IYYGDE-IGMTGGNDPECRK 473

*B. thermoalkalophilus* CMIWDESKQDRD-ILEHVKKL-ISLRKTHPALGSQGNITFIDANNE TNHL 521  
*G. caldoxylolyticus* TK4 CMVWEEEKQNRD--LEHVKKL--ALRKAHPAFRRGK--TFMDASDES NHL 490  
*G. stearothermophilus* CMIWDEHQONRE-LFRHVQKL-IALRKAYKAFGNRGNLHFIDANDET NHL 521  
*B. stearothermophilus* CMVWDPMQONKE-LHQHVQKL-IALRKQYRSLRRGE-ISFLHADDEMNYL 520  
*G. thermodenitrifican* CMVWDPMQONKE-LHQHVQKL-IALRKQYRSLRRGE-ISFLHADDEMNYL 520

*B. thermoalkalophilus* -IYTKTYKHET-ILVM-INNNKN--IEVTVPLSLKGKRLTNLWTNEQFA 566  
*G. caldoxylolyticus* TK4 --YTKTYLDET--LVM--NNSKE--D--TVPLSLKGKWL VNLWTNEQFA 530  
*G. stearothermophilus* -IYMKTFFEEEA--IIFLVNNEQE--IEITLPLSLKGKLLTNLWTNEQFS 566  
*B. stearothermophilus* -IYKKTGDGET--VLVIINRSDQK--ADIPIPLDARGTWLVNLLTGERFA 565  
*G. thermodenitrifican* -IYKKTGDGET--VLVIINRSDQK--ADIPIPLDARGTWLVNLLTGERFA 565

Şekil 24'ün devamı

<i>B. thermoalkalophilus</i>	VEAKTLRAN-IPPYGFLLNQVEN--	588
<i>G. caldoxylolyticus</i> TK4	AEAETLRAA--PPYS-----	543
<i>G. stearothermophilus</i>	AADTLKST-LPPYGFPIYKIEDWL	590
<i>B. stearothermophilus</i>	AEAETLCTS-LPPYGFVLYAIEHW-	588
<i>G. thermodenitrifican</i>	AEAETLCTS-LPPYGFVLYAIEHW-	588

*Gca* TK4 MA proteini N-ucunda 6 tane histidin içerecek şekilde *E.coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspres edildiğinden dolayı nikel afinite kolonu kullanılarak kolaylıkla saflaştırıldı. *Gca* TK4 MA proteininde var olan bu histidin birimlerinin azotları nikel parçacıkları ile etkileşerek *Gca* TK4 MA'nın diğer proteinlerden ayrılmasını sağlamaktadır.

### 3.4. *Gca* TK4 MA'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu

#### 3.4.1. Protein Tayini

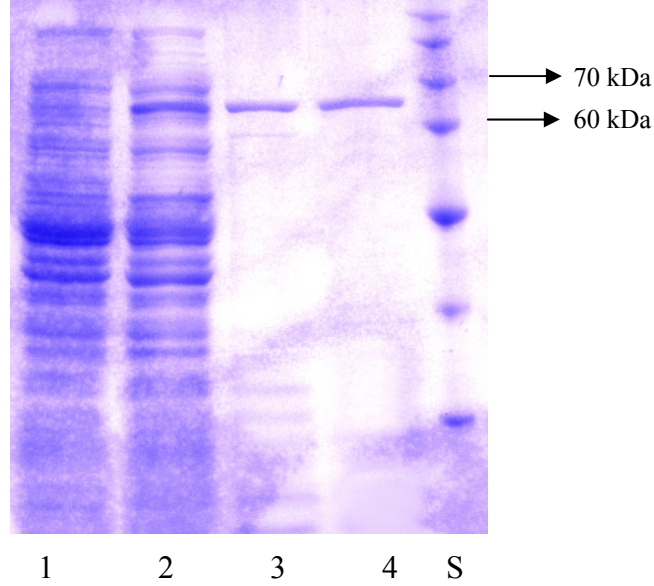
Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı ve protein standardı olarak Sığır Serum Albumini (BSA) kullanıldı. Aynı ayrı zamanlarda ekspres edilip saflaştırılan enzimlerin protein miktarlarının yaklaşık olarak 5,7 ile 6,1 mg/mL arasında olduğu bulundu.

#### 3.4.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE %12'lik jele yaklaşık 40 µg protein yüklenerek yapıldı. Elektrofrez jelinin Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanıp fazla boyanın uzaklaştırılması sonucunda *Gca* TK4 MA geninin *E. coli*'de ekspres edildiği ve kullanılan saflaştırma kitiyle etkili bir biçimde saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 25).

Saf proteinin kromatogramda tek bant halinde olması, enzimin farklı molekül ağırlıklı alt birimlerden oluşmadığını veya alt birim içermediğini göstermektedir. Standart proteinlerin  $R_f$  değerleri, bu proteinlerin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı grafiğe geçirilerek ve saf proteinin  $R_f$  değerinden faydalanılarak *Gca* TK4 MA'nın molekül ağırlığı tespit edildi. Yapılan bu hesaplamayla *Gca* TK4 MA'nın monomer molekül ağırlığı yaklaşık 68,27 kDa, olarak belirlendi. Sadece amino asit sırasından faydalanarak yapılan teorik hesaplamada (URL-14, 2008) ise *Gca* TK4 MA'nın molekül ağırlığı 67,56 kDa olarak bulundu. Fakat rekombinant enzimin molekül ağırlığı belirlenirken, *Gca* TK4 MA geni pET-28a(+) vektöründe ekspres edildiğinden dolayı başlama sinyalinin önce var olan polihistidin kuyruğunun ve diğer amino asitlerin de dikkate alınması gerekmektedir. Bu şekilde yapılan hesaplama sonucunda pET-28a(+) vektöründe ekspres edilen *Gca* TK4 MA'nın molekül ağırlığı yaklaşık olarak 70,03 kDa olmaktadır. Sonuçlar göz önüne

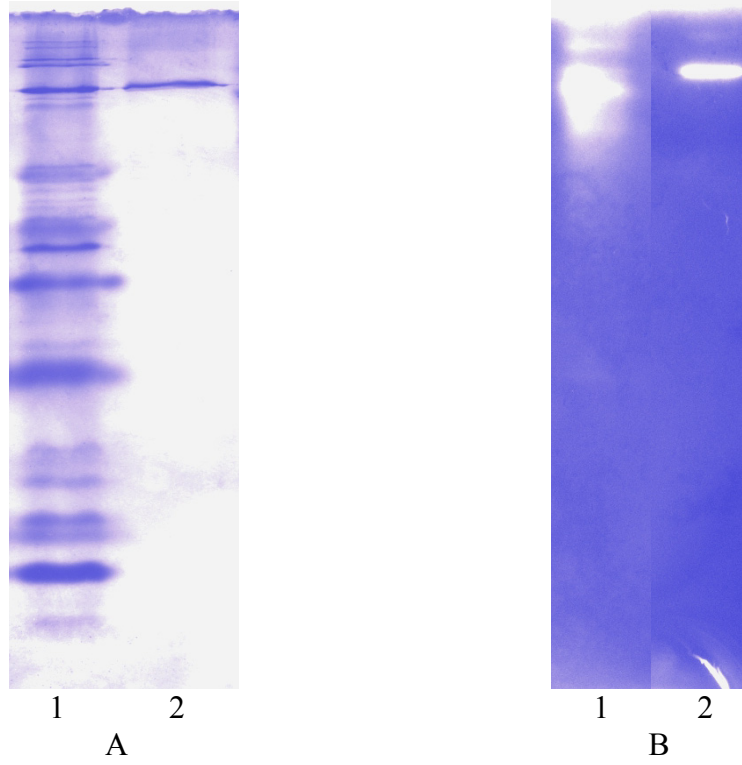
alındığında, teorik ve deneysel olarak yapılan hesaplamalarda molekül ağırlıklarının birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 25. SDS-PAGE elektroforezi. 1: *Gca* TK4 MA genine sahip indüklenmemiş *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 2: *Gca* TK4 MA genine sahip indüklenmiş *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 3: Isı şoku uygulanmış *Gca* TK4 MA genine sahip *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, 4: Saf enzim, S: Molekül ağırlık standartları

### 3.4.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal PAGE)

Doğal PAGE’de saf enzimin yürütülüp Comassie Brilliant Blue R250 ile boyanması sonucunda (Şekil 26A) tek bir bandın gözlenmesi enzimin başarılı bir şekilde saflaştırılabildiği sonucunu desteklemektedir. Ancak bu yöntemle, saf proteinin molekül ağırlığı belirlenemediğinden enzimin alt birimlerinin sayısı tespit edilememiştir. Enzim aktivite boyaması için (Şekil 26B), %10’luk doğal poliakrilamid jeline %1 son konsantrasyonda olacak şekilde nişasta ilave edilerek elektroforez yapıldı. Jelde açığa çıkan tek beyaz bölge saf enzimin varlığını ve nişasta üzerindeki aktivitesini göstermektedir. *E. coli*’den elde edilen ham özütte substratla boyamada birden fazla bant çıkması bakteri tarafından farklı amilolitik enzimlerin üretildiği anlamına gelmektedir.



Şekil 26. Doğal PAGE elektroforezi. A1: *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, A2: Saf enzim, B1: *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücre içi özütü, B2: Saf enzim

#### 3.4.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi amacıyla, *E. coli*'den elde edilen saf enzim için suda çözünür nişasta ve  $\beta$ -siklodekstrin ( $\beta$ -CD) substrat olarak kullanılmıştır (Tablo 18).

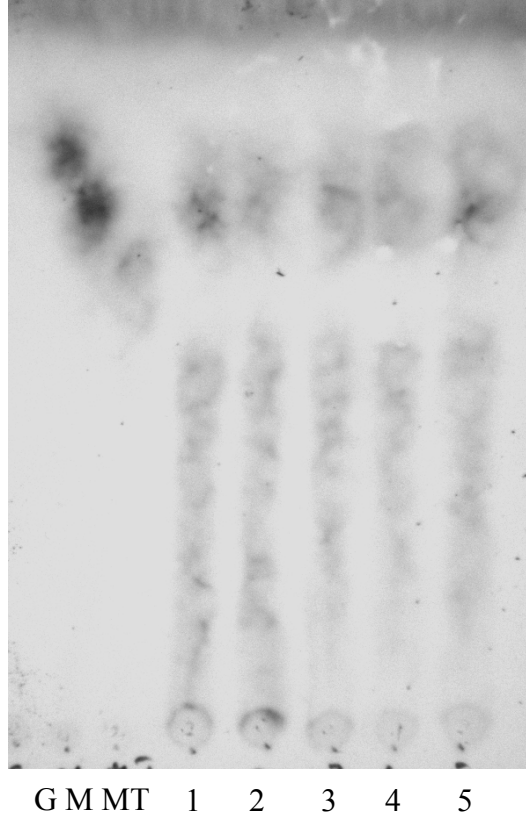
Tablo 18. *Gca* TK4 MA'ın kullanılan substratlar ile elde edilen aktivite değerleri

Substrat	Aktivite (%)
$\beta$ -CD	100
Çözünür nişasta	27

Elde edilen sonuçlar neticesinde, enzimin nişastaya göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu  $\beta$ -CD bundan sonraki karakterizasyon çalışmalarında substrat olarak kullanılmıştır.

### 3.4.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

*Gca* TK4 MA'nın  $\beta$ -CD'le reaksiyona sokulması sonucu açığa çıkan parçalanma ürünlerini tespit etmek amacıyla enzim substratıyla farklı sürelerde inkübe edilerek TLC yapıldı (Şekil 27).

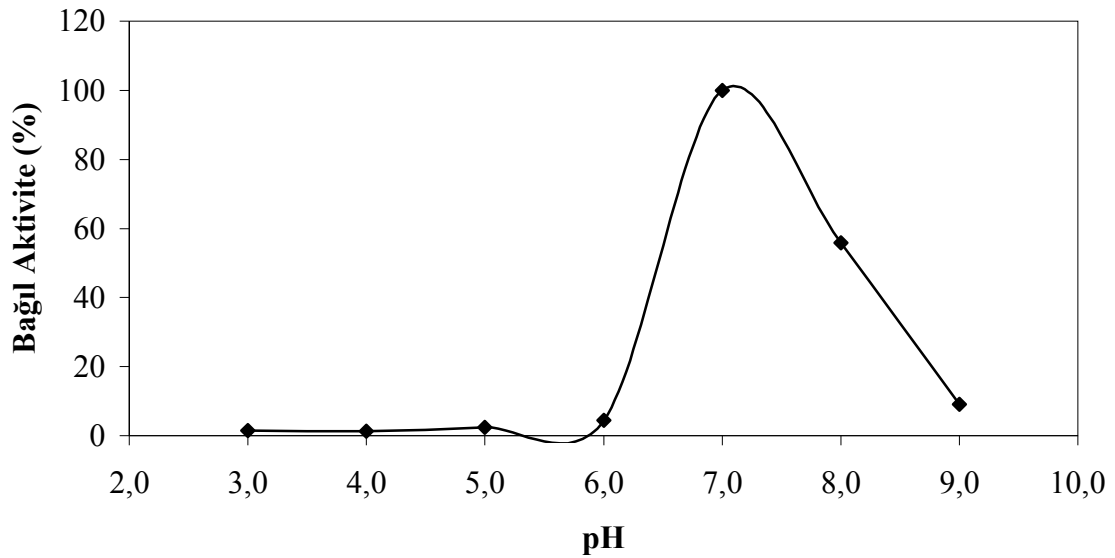


Şekil 27.  $\beta$ -CD'nin *Gca* TK4 MA'la reaksiyonu sonucu oluşan parçalanma ürünleri. G: Glukoz, M: Maltoz, MT: Maltotrioz 1: 30 dak., 2: 1 saat, 3: 2 saat, 4: 5 saat, 5: 8 saat inkübasyon.

Şekilde de görüldüğü gibi enzimin substratla etkileşimi sonucunda, enzim tipik MA'larda olduğu gibi başlıca glukoz ve maltoz açığa çıkarmaktadır. Bu da ekspres edilen ve saflaştırılan enzimin MA olduğu sonucunu destekler niteliktedir.

### 3.4.6. pH'nın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*Gca* TK4 MA'nın en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH değerini belirleyebilmek amacıyla,  $\beta$ -CD substratı varlığında farklı pH değerlerindeki tamponlar kullanılarak enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri kullanılarak pH-%bağıl aktivite eğrisi çizildi (Şekil 28). Buna göre, optimum pH'nın 7,0 olduğu görülmektedir.

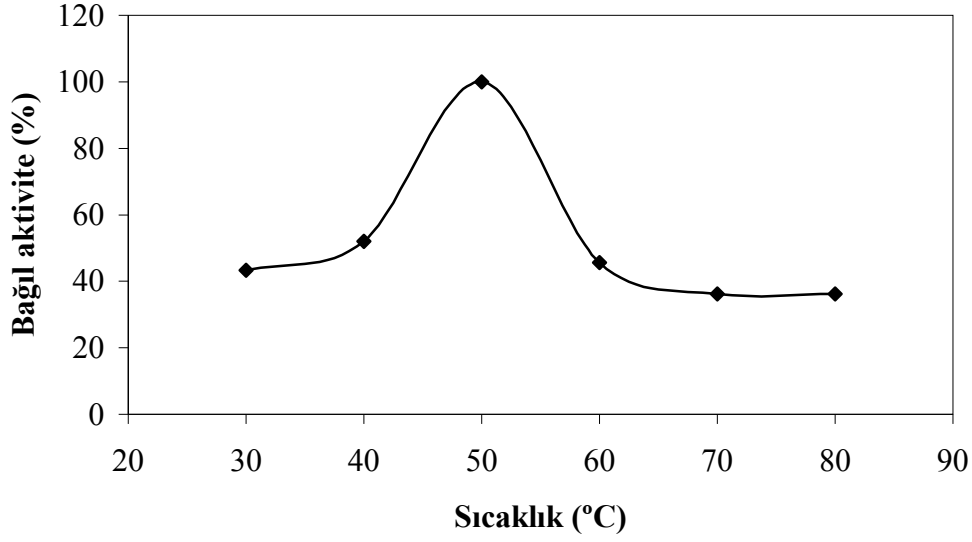


Şekil 28. *Gca* TK4 MA'nın pH bağımlılık eğrisi

### 3.4.7. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*Gca* TK4 MA aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi 10 °C'lik artışlarla 30-80 °C arasında denenmiş ve sıcaklık-%bağıl aktivite grafiği Şekil 29'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesinin 50 °C'de optimuma ulaştığı, ayrıca enzimin bu sıcaklığın dışındaki değerlerde ve özellikle 80 °C'de aktivitesini yaklaşık olarak %40 civarında koruduğu gözlenmiştir.

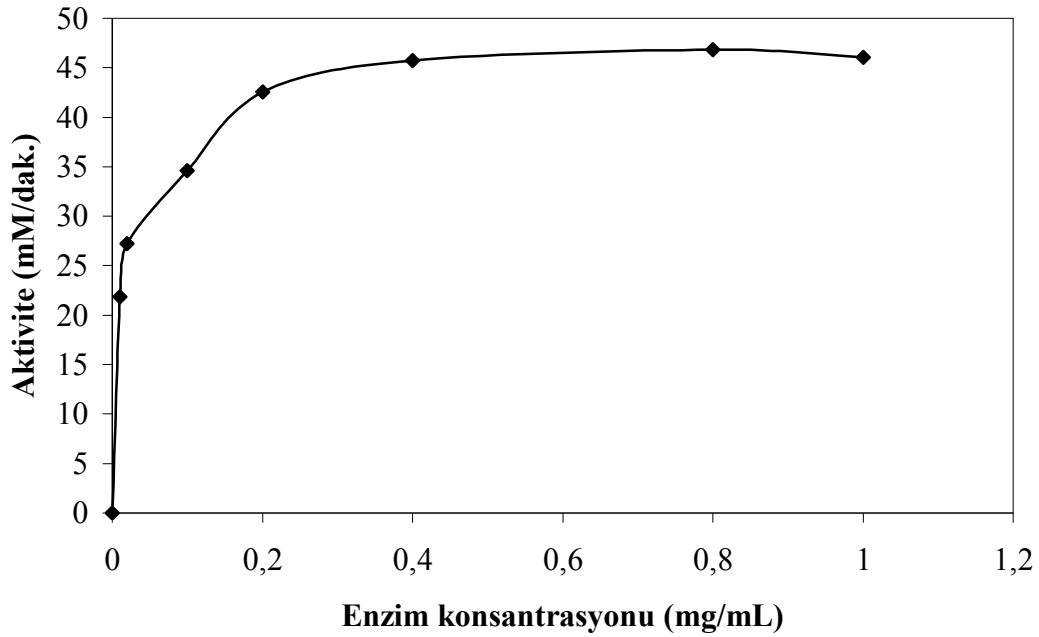




Şekil 29. *Gca* TK4 MA'ın sıcaklık bağımlılık eğrisi

#### 3.4.8. Enzim Konsantrasyonun Aktivite Üzerine Etkisi

*Gca* TK4 MA aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek amacıyla, önceden belirlenen substratın sabit konsantrasyonunda reaksiyon karışımındaki protein miktarına bağlı olarak aktivitelerin değişimi incelendi. Reaksiyon karışımında 0,01-1 mg/mL değerlerde son konsantrasyonda protein içerecek şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Protein konsantrasyonuna karşı aktivite değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen hiperbolik eğriden 1 mg/mL substrat konsantrasyonunda optimum enzim konsantrasyonu 0,2 mg/mL olarak belirlendi (Şekil 30).



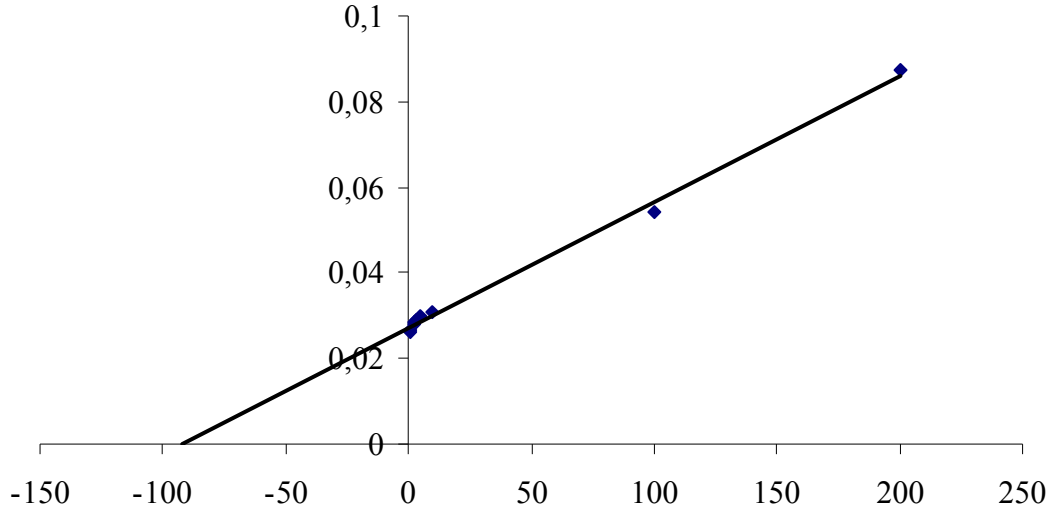
Şekil 30. *Gca* TK4 MA aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

### 3.4.9. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*Gca* TK4 MA aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için enzim konsantrasyonu sabit tutularak, reaksiyon karışımındaki 0,1-2 mg son konsantrasyonda  $\beta$ -CD varlığında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kullanılarak enzimin en yüksek aktiviteyi 1 mg/mL  $\beta$ -CD varlığında gösterdiği (Tablo 19) ve  $K_m$  değerinin 0,01 mM (Şekil 31) olduğu tespit edildi.

Tablo 19. *Gca* TK4 MA üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

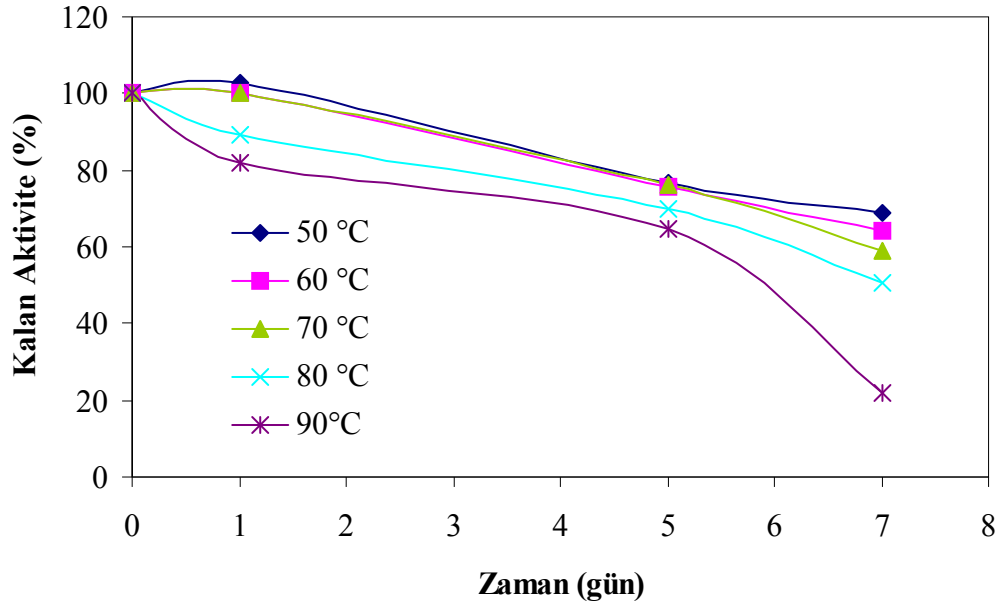
Substrat (mg/mL)	Aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
0,005	11,4	57,2
0,01	18,5	97,4
0,1	32,6	162,8
0,2	33,7	168,5
0,3	34,3	171,7
0,4	35,0	175,2
0,5	35,6	177,3
1	37,8	189,1
2	38,3	191,6



Şekil 31. *Gca* TK4 MA için Lineweaver-Burk eğrisi

#### 3.4.10. Rekombinant Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

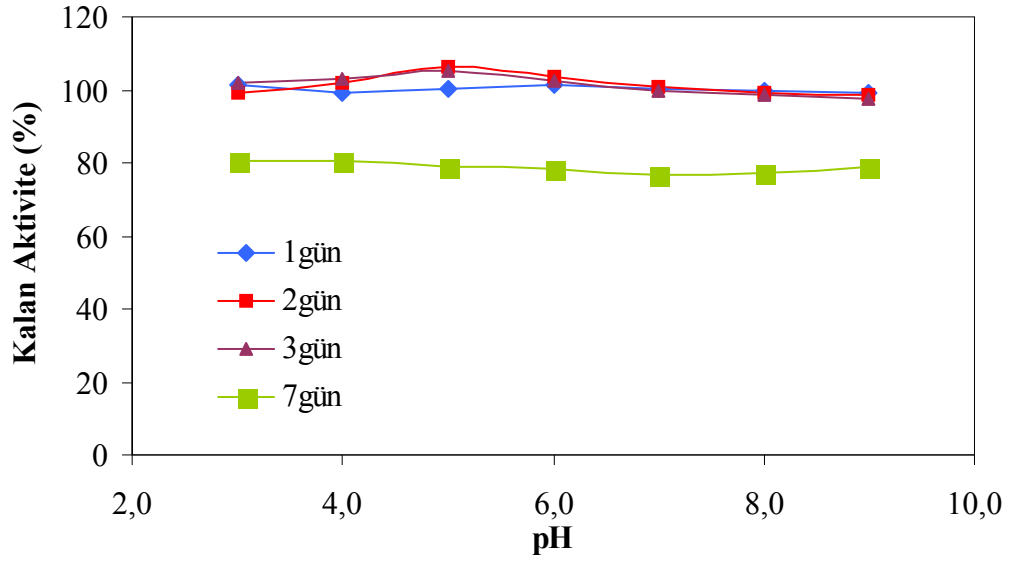
Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,0) içindeki saf enzim 50, 60, 70, 80 ve 90 °C’lerde ki sıcaklıklarda, 1, 5 ve 7 gün boyunca bekletildi ve belirtilen sürenin sonunda optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Gözlenen kalan aktiviteler sıcaklık değerlerine karşılık grafiğe geçirildi (Şekil 32). Enzimin 1 gün sonunda 50-70 °C arasında aktivitesinin neredeyse hiç değişmediği, 7 gün sonunda 90 °C’de aktivitesini yaklaşık %80 oranında kaybettiği ancak optimum sıcaklığı olan 50 °C’de aktivitesini %70 oranında koruduğu belirlendi.



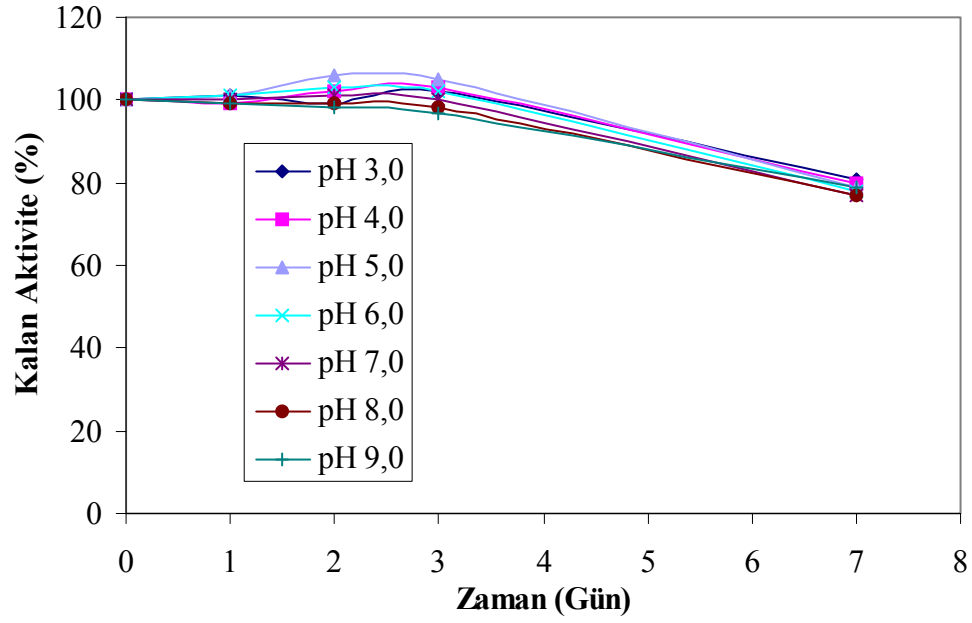
Şekil 32. *Gca* TK4 MA'nın ısıl kararlılık eğrisi

#### 3.4.11. Rekombinant Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

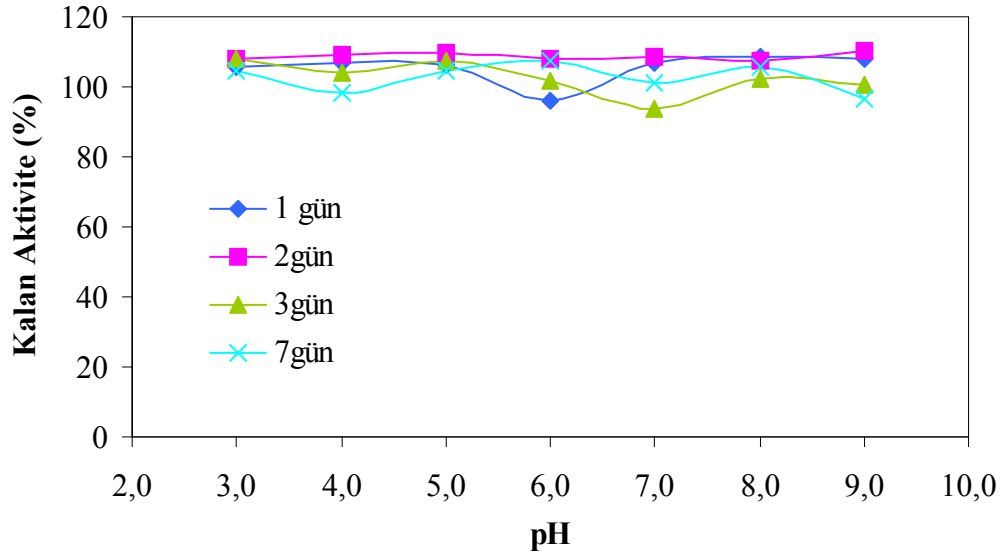
Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim, 1:1 oranında pH 3,0-9,0 arasındaki tamponlarla karıştırılarak ayrı ayrı 4 °C ve 50 °C'de 7 gün boyunca bekletildikten sonra, önceden belirlenen optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Gözlenen kalan aktiviteler, pH değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 33-36). Grafiklerden de görülebileceği gibi enzim farklı pH'lardaki tamponlar içinde 4 °C'de bekletildiğinde, 7 gün sonunda aktivitesini %80 oranında koruyabilmektedir. Bununla birlikte 50 °C'de 7 gün sonunda enzim aktivitesinde belirgin bir değişme gözlenmemiştir.



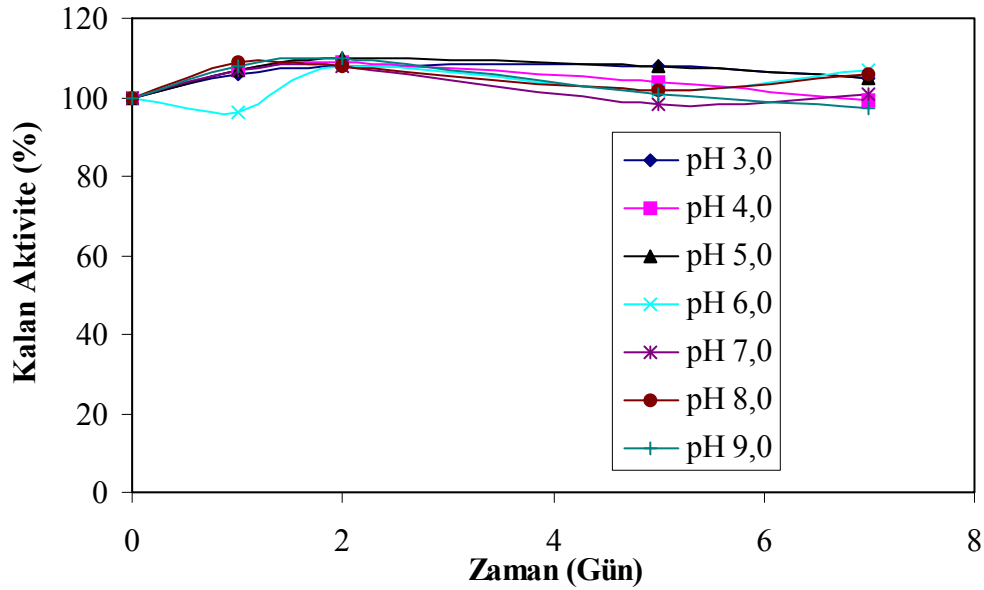
Şekil 33. *Gca* TK4 MA'nın 4 °C'deki pH kararlılık grafiği



Şekil 34. *Gca* TK4 MA'nın 4 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi



Şekil 35. *Gca* TK4 MA'nın 50 °C'deki pH kararlılık grafiği



Şekil 36. *Gca* TK4 MA'nın 50 °C'deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği

### 3.4.12. Bazı Kimyasalların ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*Gca* TK4 MA aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının ve kimyasalların etkisini incelemek amacıyla,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  gibi monovalent ve divalent iyonların klorür tuzlarının reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonları 5 mM ve ayrıca Tween 20 ve 2-merkaptotanol'ün (2-ME) % 0,1; PMSF, SDS ve EDTA'nın % 1 nihai

konsantrasyonlarda olacak şekilde optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu ve diğer kimyasalları içermeyen karışımın aktivitesi % 100 olarak kabul edilip metal iyonu ve diğer kimyasalların ilavesi durumunda % kalan aktiviteler hesaplandı (Tablo 20).

Elde edilen değerlerden görüldüğü gibi  $Zn^{2+}$ 'nin aktivite üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı,  $Mn^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  varlığında ise aktivitede sırasıyla %51 ve %8'lik bir artışın olduğu gözlemlendi.  $Li^+$  iyonu varlığında aktivitenin %67 oranında kaybolduğu tespit edildi. Kullanılan kimyasalların *Gca* TK4 MA aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği ve SDS varlığında aktivitenin %93 oranında inhibe olduğu gözlemlendi (Tablo 21).

Tablo 20. *Gca* TK4 MA aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

<b>Metal İyonu (5 mM)</b>	<b>%Kalan Aktivite</b>
Yok	100
$Li^+$	33
$Mn^{2+}$	151
$Zn^{2+}$	101
$Ca^{2+}$	108
$Co^{2+}$	77
$Fe^{2+}$	62
$Cu^{2+}$	85

Tablo 21. *Gca* TK4 MA aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi

<b>Kimyasal</b>	<b>% Kalan Aktivite</b>
Yok	100
PMSF	53
Tween 20	29
SDS	7
EDTA	14
2-ME	81

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Genetik ve protein mühendisliğinde kullanılan modern teknikler, ticari enzimlerin üretilmesinde ve bunların ısı kararlılıklarının, uç noktadaki pH'lara, okside edici kimyasallara ve organik çözücülere karşı kararlılıklarının artırılmasında önemli avantajlar sağlanmaktadır. Klonlama ve genomik bilginin ekspresyonu, endüstriyel bir enzimin uygun mezofilik bir konakçıda hızlı bir şekilde üretilmesi, özellikle biyotransformasyon uygulamalarının ihtiyacı olan ısı kararlı enzimlerin elde edilmesinde oldukça önemlidir (James 1995; Ikeda ve Clark, 1998).

Isıl kararlı enzimler, zorlu endüstriyel uygulamalardaki şartlara karşı oldukça iyi uyum sağlayabilmelerinden dolayı, birçok endüstriyel ve biyoteknolojik alanda ilgi çekmektedirler (Haki ve Rakshit, 2003). Enzimlerin endüstride kullanımı için termal kararlılık en önemli özelliktir. Bu sebeple, termofiller, termal kararlı maltojenik amilazın (MA) elde edilmesinde oldukça önemli kaynaklardır. Ancak, termofillerde MA üretiminin oldukça düşük seviyede olması sebebiyle, endüstri açısından bu organizmaların direkt enzim kaynağı olarak kullanılmaları pratik olmamaktadır. Bu amaçla, prokaryotik sistemlerde yabancı proteinlerin ekspresyonu amacıyla gerçekleştirilen moleküler yaklaşımlar, MA için ekonomik açıdan fazla miktarda ürün elde edilebildiğinden dolayı önemli bir alternatif olmaktadır (Cho vd., 1999; Kim vd., 2003). Yeni ekstremofil mikroorganizmaların keşfi ve sonrasında genetik mühendisliği yöntemleri yardımıyla biyokataliz ve biyotransformasyon reaksiyonları için yeni fırsatlar sağlanacağı belirtilmektedir (Gomes and Steiner 2004).

Gerçekleştirilen çalışmada, Çanakkale'nin Kestanbol Kaplıcası'ndan izole edilen, çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve DNA hibridizasyonu analizi ile yeni bir alt suş olduğu ortaya konulan *Geobacillus caldoolyolyticus* TK4 suşundan, ısı kararlı MA (*Gca* TK4 MA) geninin indüklenabilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET-28a(+) vektörüne klonlanarak, *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ekspres edilen protein saflaştırılarak, enzim aktivitesinin varlığı, elektroforetik ve spektroskopik yöntemlerle ortaya konmuş ve ayrıca biyokimyasal, kinetik ve bazı termodinamik özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler bilinen diğer organizmalardaki MA'larla karşılaştırılmıştır.



*G. caldxylolyticus* TK4 genomik DNA'sının (gDNA) *EcoR* I kesim enzimiyle kesilerek oluşturulan kütüphaneden elde edilen ve 201 baz çiftinden oluşan gDNA parçasının yapılan üç invers PCR'la çoğaltılması sonucu genin tamamının 1740 baz çiftinden ve 579 aminoasitten oluştuğu gözlenmiştir. Daha önceden yapılan çeşitli çalışmalarda, *Bacillus stearothermophilus* ET1 suşundan elde edilen genin 1770 baz çifti ve 590 amino asitten (Cha vd., 1998); *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 suşundan elde edilen MA geni 1722 baz çifti ve 574 amino asitten (Oh vd., 2005); *Bacillus* sp. WPD616 suşundan elde edilen genin 1764 baz çifti ve 588 amino asitten (Liu vd., 2006); *Thermoplasma volcanium* MA'nın 1872 baz çiftinden 624 amino asitten (Kim vd., 2007); *Bacillus thermoalkalophilus* MA'nın 1740 baz çifti ve 580 amino asitten (URL-15, 2008) oluştuğu bildirilmiştir.

BLAST programı kullanılarak *Gca* TK4 MA'nın amino asit sırasının diğer organizmalardaki benzer amino asit sıralarıyla kıyaslanması sonucunda *Bacillus* ve *Geobacillus* türü organizmalara benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda, *B. thermoalkalophilus* MA'na %86, *G. stearothermophilus* (BSMA) MA'na %77 ve *Thermus* sp. IM6501 MA'na ise %75 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Family 13 ailesine dahil olan neopullulanaz, siklodekstinaz ve amilaza da %74-76 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 17).

*Gca* TK4 MA amino asit sırası Clustal W programı yardımıyla, *B. thermoalkalophilus*, *G. stearothermophilus*, *B. stearothermophilus* ve *G. thermodenitrificans* türlerinde ilgili genlerin amino asit sıraları kıyaslanmıştır. Yapılan incelemede, diğer türlerde olduğu gibi *Gca* TK4 MA'nda da oldukça korunmuş altı bölgenin varlığı ve ayrıca aktif bölgede yer alan amino asitler olan (\*) işaretlenmiş, Asp-194, Asp-399 ve Glu-336 amino asitlerinin varlığı da tespit edilmiştir. Bu durumda aktif bölgenin tamamen korunmuş olduğu görülmektedir (Şekil 24). Proteinin N-ucunda bulunan yaklaşık 130 amino asit ve C-ucunda bulunan yaklaşık 80 amino asit, bu enzimi Family 13'e dahil olan amilolitik enzimler arasında CD'leri hidrolizleyen enzimler sınıfına dahil etmektedir (Kim vd., 1999).

Rekombinant *Gca* TK4 MA'nın ekspresyon işlemi, N- ucunda 6 tane histidin birimi içerecek şekilde (histidin kuyruğu) *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşunda ve saflaştırma işlemi ise Ni-afinite kolonu kullanılarak tek adımda gerçekleştirilmiştir. Literatüre bakıldığında, yine *E. coli*'de ekspres edilen *L. gasseri* ATCC 33323, N- ucunda 6 tane histidin biriminin yanında metiyonin ve glutamik asit amino asitlerini de içerecek şekilde klonlanmıştır. LB

besiyerinde büyütülerek elde edilen rekombinant hücreler, 30 dakika 37 °C’de lizozimle inkübe edildikten sonra sonikatör yardımıyla parçalanmış ve süpernatant Ni-NTA kolonuyla tek adımda saflaştırılmıştır (Oh vd., 2005). *Bacillus* sp. WPD616’dan elde edilen MA, *E. coli*’de GST füzyon proteini olarak ekspres edilmiş ve saflaştırma işlemi GST-afinite kromatografisi yardımıyla tek basamakta gerçekleştirilmiştir (Liu vd., 2006). *Thermoplasma volcanium* GSS1 MA geni, lösin ve glutamat amino asitlerine ilave olarak altı adet histidin birimi içerecek şekilde *E. coli* MC1061 suşunda ekspres edilmiş, Ni-NTA spherflow afinite kromatografisi kullanılarak tek adımda saflaştırılmıştır (Kim vd., 2007). *B. stearothermophilus* ET1, *E. coli* DH5 $\alpha$  suşunda ekspres edilerek, elde edilen protein amonyum sülfatla çöktürüldükten sonra DEAE-Toyopearl 650 iyon değişim kolonuna yüklenerek NaCl gradienti yardımıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılan protein, YM-10 ve PM-10 membran filtreleri yardımıyla deriştirilerek kullanılmıştır (Cha vd., 1998).

Yapılan elektroforetik çalışmalarla, indüklenmemiş *E. coli* hücre içi proteinleriyle kıyaslandığında, enzimin, etkili bir biçimde ekspres edildiği ve saflaştırıldığı ortaya konmuştur (Şekil 25, 26). Saflaştırma işlemi sonucu SDS poliakrilamid jel elektroforezinde tek bant gözlenmiştir. SDS jel elektroforezi sonuçlarına göre, belirlenen bu tek bant, proteinin ya tek alt birimden oluştuğunu ya da dördüncül yapısının homolog iki ya da daha fazla alt birimin organizasyonu ile oluşabileceğini göstermektedir. Histidin kuyruğu içerecek şekilde ekspres edilen rekombinant proteinin monomer halinin molekül ağırlığı 70,03 kDa ve sadece amino asit sırasından yola çıkarak yani histidin kuyruğu içermeyecek şekilde hesaplanan *Gca* TK4 MA’nın molekül ağırlığı 67,56 kDa olarak bulunmuştur. Bu değerler, SDS jel elektroforezindeki R<sub>f</sub> değerlerinden yola çıkılarak tespit edilen sonucu da (68,27 kDa) desteklemektedir. Termofilik *Bacillus* sp. MA’ından elde edilen GST-MA’nın molekül ağırlığı SDS jel elektroforezinden 93 kDa olarak hesaplanmıştır. *B. stearothermophilus*’tan saflaştırılan MA’nın molekül ağırlığını tespit etmek amacıyla yapılan SDS jel elektroforezi sonucunda, molekül ağırlığı 62 kDa ve MALDI-TOF/MS yöntemiyle yapılan inceleme sonucunda da 69,66 kDa olarak bulunmuştur (Cha vd., 1998). *L. gasseri* MA’nın (LGMA) molekül ağırlığı, SDS jel elektroforezi yöntemiyle 65 kDa ve MALDI-TOF/MS yöntemiyle de 67,76 kDa olarak tespit edilmiştir. Yapılan jel elektroforezinde (Superose 12) molekül ağırlığı ise 211 kDa olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar LGMA’nın aktif formunun tetramerik yapıda olduğunu vurgulamaktadır. MA’nın oligomerik yapıları üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, elde edilen enzimlerin çoğunun çözelti içerisinde dimerik yapıda olduğu tespit edilmiştir (Park vd., 2000). Kim ve

arkadaşları (2001), *Thermus* MA'nın (ThMA) çözeltide monomer/dimer dengesi halinde olduğu, ThMA'nın çözelti içinde hem monomer halinin hem de dimer halinin farklı substrat durumlarına göre enzimatik olarak aktif olabildiğini göstermiştir. Monomerik yapıdaki ThMA'nın nişasta üzerindeki aktivitesinin, dimerik formdaki  $\beta$ -siklodekstrin ( $\beta$ -CD) aktivitesiyle kıyaslandığında daha yüksek olduğu gözlenmiştir. *Thermoplasma volcanium*'dan elde edilen rekombinant MA'nın (TpMA) molekül ağırlığı, MALDI-TOF/MS yöntemiyle 72 kDa ve Superdex 200 HR jel elekleme kromatografisiyle 146 ve 66 kDa olarak bulunmuştur. Bu enzim üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde, enzimin moleküler ağırlığından yola çıkılarak, diğer CD-parçalayan enzimlerde olduğu gibi monomer ve dimer yapısında olabildiği ve ayrıca bu yapılara ilave olarak sulu çözelti içerisinde pentamer ve heksamer yapısında da olabileceği ifade edilmiştir. Monomerik yapısının çözüner nişastayı oligomerik yapısına nazaran 15 kat daha etkili bir biçimde hidrolizlediği yani nişasta gibi büyük substratlara ilgi duyduğu, oligomerik yapının ise,  $\beta$ -CD üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Kim vd., 2007). Diğer bir çalışmada, *Bacillus subtilis* SUH4-2 MA'nın molekül ağırlığı SDS jel elektroforezinde 64 kDa, MALDI-TOF/MS 68,9 kDa ve jel elekleme kromatografisiyle de (Superdex G200 HR 10/30) 109 kDa olarak bulunmuştur. Yapılan ultrasantrifüjleme sonucunda, enzimin çözelti içinde 3:2 oranında monomer ve dimer karışımından ibaret olduğu görülmüştür (Cho vd., 2000). *Gca* TK4 MA'nın molekül ağırlığının diğer organizmalardan elde edilen monomer molekül ağırlığına yakın olması ve substrat olarak  $\beta$ -CD nişastaya oranla daha etkili bir biçimde hidroliz etmesi, bu enzimin, monomerik yapıdan ziyade oligomerik yapıda olabileceğini göstermektedir.

Yapılan %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezinde, kromatogramda tek bir bandın gözlenmesi, proteinin etkili bir şekilde His-Taq Ni-afinite kolonuyla etkili bir şekilde saflaştırıldığını desteklemektedir. Ayrıca %1 nihai konsantrasyonda nişasta katılmasıyla hazırlanan %10'luk doğal poliakrilamid jelinin, 45°C'de 40 dakika bekletilmesi sonucu oluşan tek bir beyaz bölge, saflaştırılan enzimin istenilen şekilde amilolitik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 26A ve Şekil 26B).

Enzimin substrat özgünlüğünün belirlenebilmesi amacıyla, uygun şartlar altında  $\beta$ -CD ve suda çözünebilen nişasta kullanılarak yapılan incelemede, enzimin, nişastayla kıyaslandığında,  $\beta$ -CD'ne karşı oldukça yüksek bir ilgisinin olduğu görülmüştür (Tablo 18). MA'nın CD'leri, nişastayı ve pullulani substrat olarak kullandığı,  $\beta$ -CD'i

(7 glikoz biriminden oluşmaktadır) nişastaya ve pullulana göre 100 kat daha hızlı parçalayabildiği bilinmektedir. Buna karşılık, diğer amilolitik enzimler  $\beta$ -CD'i ve pullulani substrat olarak kullanamamaktadır (Kim vd., 1999). MA'nın hücre içi enzim olması,  $\beta$ -CD'i substrat olarak nişastaya tercih etmesi, bu enzimi diğer amilolitik enzimlerden farklılandırmaktadır (Park vd., 2000). Yaptığımız çalışma sonucunda, elde ettiğimiz rekombinant enzimin benzer özellikler göstermesi, klonlanan bu enziminde bir maltojenik amilaz olduğunu desteklemektedir. MA'lar,  $\beta$ -CD'i substrat olarak kullanarak gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonu sonucu, başlıca maltoz ve glikoz açığa çıkarmaktadırlar (Cha vd., 1998; Oh vd., 2005; Kim vd., 2007) ve bu sebeple maltojenik amilaz adını almaktadırlar (Kim vd., 1999).

*Gca* TK4 MA'nın substratıyla etkileşimi sonucu, ortaya çıkan parçalanma ürünlerini tespit edebilmek amacıyla ince tabaka kromatografisi (TLC) yapılmıştır (Şekil 27). Bu işlemi gerçekleştirmek amacıyla, enzim substratıyla uygun şartlar altında, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 5 saat ve 8 saat inkübe edilerek, enzimin substratıyla etkileşmesi sağlanmış ve bunun sonucunda da hidroliz ürünleri oluşturulmuştur. Elde edilen bu karışımlar, Kieselgel-Silica gel TLC kartı üzerine tatbik edilmiş ve uygun çözücü karışımı kullanılarak işlem gerçekleştirilmiştir (Şekil 27). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, parçalanma ürünü olarak başlıca maltoz ve glikoz olduğu ve bunun yanında maltotriozdan daha büyük parçalanma ürünlerinin de ortamda olduğu gözlenmiştir. İnkübasyon süresi uzadıkça, maltoz ve glikoz dışında oluşan hidroliz ürünlerinin miktarında da azalma gözlenmiştir. Elde edilen bu veriler göz önüne alındığında, ekspres edilen rekombinant *Gca* TK4 MA'nın hidroliz ürünlerinin, bilinen tipik MA'larla benzer olduğu (Oh vd., 2005; Lee vd., 2003; Kim vd., 2007; Cha vd., 1998) ve bu sebeple, saflaştırılan proteinin MA olarak sınıflandırılabilceği sonucunu ortaya koymaktadır.

Enzim kinetiği çalışmalarında, optimum pH değerleri, kullanılan materyalin kaynağına, ekstraksiyon şartlarına ve kullanılan substratlara göre farklılıklar gösterir (Jiang, 1999). Ayrıca, enzim aktivitesi sadece pH'ya bağımlı değil aynı zamanda kullanılan tampona da bağımlıdır (Oh vd., 2005). Proteinin N-ucunda His kuyruğu içerecek şekilde ekspres edilen *Gca* TK4 MA'nın pH bağımlılığı incelendiğinde, elde edilen grafikte tek bir pik gözlenmiş ve optimum pH değeri ise 7,0 olarak tespit edilmiştir (Şekil 28). *Lactobacillus gasseri*'den klonlanarak saflaştırılan MA (LGMA) en yüksek hidrolitik aktivitesini pH 5,0'da gösterdiği (Oh vd., 2005); termofilik *Basillus* sp.'den saflaştırılan rekombinant MA'nın optimum pH değerinin 6,0 (Liu vd., 2006); *Bacillus thermoalkalipus*

ET2'den saflaştırılarak karakterize edilen MA'nın optimum pH değerinin de 8,0 (Cheong vd., 2005) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Bacillus subtilis*'ten klonlanarak karakterize edilen saf MA'nın en yüksek hidrolitik aktiviteyi pH 7,0'da (Cho vd., 2000) gösterdiği bildirilmiştir. Literatürdeki bu veriler dikkate alındığında, *G. caldoxylolyticus* TK4 rekombinant MA'nın optimum pH değerinin bilinen MA'larla paralel olduğu görülmüştür.

Rekombinant *Gca* TK4 MA'nın en yüksek aktiviteyi gösterdiği optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla yapılan inceleme sonucunda, enzimin optimum sıcaklığı 50 °C olarak tespit edildi (Şekil 29). *B. stearothermophilus* ET1' den elde edilen MA optimum aktivite değerini 50 °C'de (Cha vd., 1998); *B. stearothermophilus*'tan elde edilen saf rekombinant enzim için optimum sıcaklık değeri 55 °C (Lee vd., 2003) ve *L. gasseri*'den elde edilen MA'nın ise optimum sıcaklık değeri yine 55 °C (Oh vd., 2005) olarak bildirilmiştir.

*G. caldoxylolyticus* TK4'ten elde edilen rekombinant MA'nın aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde, 0,2 mg/mL protein miktarına kadar enzim aktivitesinde artış gözlenmiş ancak bu değerden sonra protein konsantrasyonunun artırılmasıyla enzim aktivitesinde artışın gözlenmediği tespit edilmiştir (Şekil 30).

Termal kararlı enzimler, mikroorganizmanın optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda kararlılık ve aktiviteye sahip olabilirler (Saboto vd., 1999). Mezofilik ve termofilik enzimlerin konformasyonel entropileri incelendiğinde, termofilik proteinlerin mezofilik homologlarına göre daha fazla yapısal esnekliğe sahip oldukları görülmüştür (Leuschner ve Antranikian, 1995; Fredrich ve Antrakian, 1996; Diane vd., 1997). Enzimin ısı kararlılığını belirleyebilmek amacıyla yapılan denemelerde, optimum sıcaklık değeri olan 50 °C'de, enzim 1 ve 5 gün inkübe edildiğinde aktivitesinde belirgin değişimin olmadığı, 7 gün sonunda ise aktivitede yaklaşık %30'luk bir kaybın olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, 60 ve 70 °C'de enzim inkübe edildiğinde ise yine 1 ve 5 gün sonunda aktivitede ciddi bir kaybın olmadığı ve 7 gün sonunda ise yaklaşık olarak %35- 40'luk bir aktivite kaybının varlığı tespit edilmiştir. 80 °C'de yapılan inkübasyona bağlı olarak, 1 gün sonunda enzim aktivitesini %90 oranında koruyabiliyorken, 5 ve 7 gün sonunda sırasıyla aktivitede %30 ve %50 civarında bir kayıp gözlenmiştir. Enzim 90 °C'de inkübasyona maruz bırakıldığında ise, 1 gün sonunda aktivitesini %20 oranında kaybederken 5 ve 7 gün sonunda aktivitelerini %60 ve %20 oranında koruyabilmiştir (Şekil 31). *L. gasseri* MA'ı 55 °C'de 96 saat boyunca aktivite gösterebildiği (Oh vd., 2005); *B. stearothermophilus*

(Cha vd.,1998) MA'nın ise 24 saat boyunca 50 °C'de hidroliz işleminde kullanıldığı bildirilmiştir.

Karakterize edilen rekombinant *Gca* TK4 MA'nın, reaksiyon sıcaklığı olan 50 °C'de ve depolama sıcaklığı olan 4 °C'de, farklı pH değerlerinde toplam 7 gün boyunca inkübe edilerek pH kararlılığı incelendi. Bunun sonucunda, 4 °C'de 7 gün sonunda farklı pH (3,0-9,0) değerlerinde bekletildiğinde, 3 gün boyunca enzim aktivitesinin tamamen korunduğu 7 gün sonunda ise aktivitede tüm pH değerlerinde yaklaşık olarak %20'lik bir kaybın olduğu gözlenmiştir (Şekil 32). Benzer işlemler gerçekleştirilerek enzim 50 °C'de farklı pH'larda bekletildiğinde 7 gün sonunda enzim aktivitesinde herhangi bir azalmanın olmadığı tespit edildi (Şekil 33). Yapılan bu incelemeler sonucunda gerek ısıl kararlılık ve gerekse pH kararlılığı açısından enzimin, endüstrinin ihtiyaçlarını karşılayabilecek derecede önemli bir kararlılığa sahip olduğu görülmektedir. Literatürde bugüne kadar klon olarak saflaştırılan ve karakterizasyonu gerçekleştirilen MA'ların pH kararlılığı hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

MA'lar genelde aktivitelerini gösterebilmek için metal iyonlarına ihtiyaç duyduklarından dolayı, çeşitli metal iyonlarının ve bunun yanında bazı kimyasalların aktiviteyi nasıl etkilediği araştırıldı. Yapılan inceleme sonucunda,  $Zn^{2+}$  iyonu varlığında aktivitede herhangi bir değişimin olmadığı,  $Ca^{2+}$  iyonu varlığında aktivitede hafif bir artışın meydana geldiği ve  $Mn^{2+}$  varlığında ise enzim aktivitesinde ciddi bir artışın olduğu gözlemlendi.  $Cu^{2+}$  varlığında aktivitede %15'lik,  $Co^{2+}$  varlığında %23'lük,  $Fe^{2+}$  varlığında %38'lik,  $Li^{+}$  varlığında ise %67'lik bir kaybın olduğu tespit edildi. Bu durumda, *G. caldxylolyticus* TK4'ten elde edilen rekombinant MA'nın aktivitesi, denenilen metal iyonları içinde en çok  $Li^{+}$  iyonu tarafından inhibe edilmiştir (Tablo 20). *L. gasseri* MA aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisine bakıldığında (5 mM),  $Zn^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  iyonları tarafından sırasıyla %96 ve %90 oranında inhibe edildiği,  $Ca^{2+}$  varlığında ise aktivitede %4 oranında bir azalmanın olduğu görülmüştür (Oh vd., 2005). *Bacillus* sp.'den klonlanan MA aktivitesi üzerine metal iyonlarının (10 mM) etkisi incelendiğinde ise,  $Li^{+}$  iyonu varlığında %9,  $Mn^{2+}$  iyonu varlığında %50 oranında azaldığı, buna karşın  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  metal iyonları varlığında aktivitede herhangi bir değişimin olmadığı belirtilmiştir (Liu vd., 2006).

Enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisini incelemek için yapılan denemede, 2-merkaptetanol'un (2-ME) %19, PMSF'nin %47, Tween 20'nin %71, EDTA'nın %86 ve SDS'nin %93 oranında aktivitede bir azalmaya sebep olduğu

gözlenmiştir (Tablo 21). *Bacillus* sp. WPD616'dan klonlanan MA ile yapılan çalışmalarda, nihai konsantrasyonları %10 olacak şekilde, EDTA %29,9, PMSF %100, SDS %100 oranlarında ve nihai konsantrasyonları %1 olacak şekilde, Tween 20'nin %2,8, 2-ME'un %54,9 oranında enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuştur (Liu vd., 2006). *L. gasseri* rekombinant MA'nın ise 5mM EDTA varlığında aktivitesinde %74 oranında bir inhibisyonun söz konusu olduğu bildirilmiştir (Oh vd., 2005).

Elde edilen tüm bu veriler göz önüne alındığında, *G. caldxylolyticus* TK4 suşundan klonlanarak, *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşunda, baş kısmında 6 tane His kuyruğu olacak şekilde ekspres edilip saflaştırılan enzimin, CD parçalayan bir enzim olan maltojenik amilaz olduğu tespit edilmiştir. Karakterizasyonu yapılan bu enzimin, pH kararlılığı ve termal kararlılığı açısından oldukça üstün özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Endüstrinin ve hatta biyoteknolojinin ihtiyaç duyduğu ve önem verdiği bu özellikler sayesinde, elde edilen Maltojenik amilaz, bu sektörler için oldukça cazip bir enzim olarak görülmektedir.

## 5. ÖNERİLER

Enzimler doğanın katalizörleridirler ve dolayısıyla enzimsiz bir hayatın var olması düşünülemez. Bu yüzden enzimlerin özelliklerinin ve davranış biçimlerinin yaklaşık 200 yıldır inceleniyor olması sürpriz değildir. Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir (Kolcuoğlu, 2005). Günümüzde, rekombinant DNA teknolojilerinin çok gelişmiş olması ve farklı uygulama alanlarında kullanılabilir olması, bir enzimin özelliklerinin iyileştirilmesine veya çok daha uygun şartlarda üretilmesine imkan sağlamaktadır

Bu çalışma, *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 suşundan maltojenik amilaz (*Gca* TK4 MA) geninin uygun bir vektöre klonlanarak ekspres edilmesi açısından oldukça önemlidir. Kullanılan rekombinant DNA yöntemi sayesinde, orijinal kaynağında oldukça düşük seviyede ekspres edilen bu enzim daha düşük sıcaklıklarda ve bol miktarda üretilebilir hale gelmiştir. Kullanılan üretim tekniği yardımıyla klonlanan gen bir promotörün altında indüklenebilmekte ve daha kısa sürede bol ürün elde edilebilmektedir. Ayrıca proteinin baş kısmına yerleştirilen Histidin kuyruğu sayesinde tek adımda Ni-kolonu yardımıyla kolaylıkla saflaştırılabilmektedir.

Termofilik canlılarda, MA'nın ekspresyon seviyesinin düşük olması sebebiyle, litratürde, orijinal kaynağından kromatografik yöntemler kullanılarak bu enzimin saflaştırılması işlemine rastlanmamıştır. Zaten bugüne kadar MA'la ilgili yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır ve yapılan bu çalışmaların tamamı rekombinant DNA teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak, enzim, baş kısmında Histidin kuyruğu olmadan ekspres ettirilerek ve farklı saflaştırma yöntemleri kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilebilir. Bunun yanında, elde edilen bu genin korunmuş bölgeleri üzerinde çeşitli mutasyon işlemleri gerçekleştirilerek, hem histidin kuyruğu içermeyen hem de mutasyon yapılmış enzimin ileri derecede karakterizasyonu yapılarak enzimin davranışında meydana gelebilecek olumlu veya olumsuz özellikler incelenebilir. Bu işlemlerin yanında çalışmada eksik kalan, HPLC veya jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak, *G. caldoxylolyticus* TK4 suşundan elde edilen rekombinant MA'nın moleküler ağırlığı ve dördüncül yapısı hakkında bilgiler edinilebilir.



MA'ların katalizlediği bilinen transglikozilasyon reaksiyonları da, elde edilen bu enzim yardımıyla, reaksiyon ortamına çeşitli alıcı moleküller (akseptör) konularak incelenebilir. Bu sayede, günümüzde gıda ve tıp sektöründe ihtiyaç duyulan tatlılık özelliği yüksek, ancak insan sağlığı açısından herhangi bir tehlikesi olmayan farklı şekerlerin tasarlanmasında ve üretilmesindeki etkinliği de incelenebilir. Aynı zamanda böyle bir çalışma ile enzimin bir organik sentez reaksiyonunda da kullanılması sağlanmış olacaktır.

Enzimlerin sürekli kullanılabilirliklerini ve kararlılıklarını arttırmanın diğer bir yolu da immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntem sayesinde, immobilize enzimin özelliklerinin ve dolayısıyla kararlılıklarının nasıl değiştirdiği araştırılabilir. Ayrıca, enzim reaksiyonlarda defalarca kullanılacak hale getirileceğinden endüstri açısından da oldukça cazip hale gelecektir. Bu nedenle, ileri bir çalışma ile yapılan bu çalışma sonucu elde edilen rekombinant enzimin immobilizasyonu incelenebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Adams, M.W.W., Perler, F.B. ve Kelly, R.M. 1995. Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. Bio/Technology 13, 662–668.
- Aguilar, A., 1996, Extremophile Research in the European Union: from Fundamental Aspects to Industrial Expectations, FEMS Microbiol. Rev., 18, 89-92.
- Antranikian, G., Herzberg, C. Ve Gottschalk, G., 1987. Production of thermostable  $\alpha$ -amylase, pullulanase and  $\alpha$ -glucosidase in continuous culture by a new *Clostridium* isolate, Appl. Environ. Microbiol. 53, 1668–1673.
- Bahrami, A., Shojaosadati, S. ve Mahbeli, G., 2001. Biodegradation of dibenzothiophene by thermophilic bacteria, Biotechnol. Lett. 23, 899–901.
- Bauer, M., Driskil, L., Callen, W., Snead, M., Mathur, E. ve Kelly, R., 1999. An endoglucanase EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes  $\alpha$ -1,4 bonds in mixed linkage (1→3), (1→4)- $\beta$ -D-glucans and cellulose, J. Bacteriol. 181, 284–290.
- Becker, P., 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil, Appl. Microb. Biotechnol. 48, 184–190.
- Bender H., 1994. Studies of the degradation of pullulan by the decycling maltodextrinase of *Flavobacterium* sp., Carbohydr. Res. 260, 119-130.
- Bender, H., 1993. Purification and characterization of a cyclodextrin-degrading enzyme from *Flavobacterium* sp., Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 714-719.
- Bharat, B. ve Hoondal, G., 1998. Isolation, purification and properties of thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11, Biotechnol. Lett. 20, 157–159.
- Brock, T.D., 1985. Life at High Temperatures, Science, 230, 132-138.
- Brock, T.D., 1986, Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T. D., Ed., John Wiley and Sons, New York. s-1-16
- Brown, C., 1987. Enzyme technology. In: Wilkinson, J. (Ed.), Introduction to Biotechnology. Blackwell Scientific, Oxford.
- Bruins, M.E., Janssen, A.E.M. ve Boom, R.M., 2000. Thermozyms and Their Applications, A Review of Recent Literature and Patents, Appl Biochem Biotech, 90, 155-186.

- Burhan, A., Ünalı, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A. ve Gülnaz, O., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. İsolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38,1397-1403.
- Cha, H.J., Yoon, H.G., Kim, Y.W., Lee, H.S., Kim, J.W., Kweon, K.S., Oh, B.H. ve Park, K.H., 1998. Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose, *Eur. J. Biochem.* 253, 251-262.
- Cheong, K. A., Tang, S.Y., Cheong, T.K., Cha, H., Kim, J.W. ve Park, K.H., 2005. Thermostable and alkalophilic maltogenic amylase of *Bacillus thermoalkalophilus* ET2 in monomer-dimer equilibrium. *Biocatal Biotransfor*, 2005; 23, 79-87.
- Chitradon, L., Mahakhan, P. ve Bucke, C., 2000. Oligosaccharide synthesis by reversed catalysis using alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10, 273–280.
- Cho, H.Y., Kim, Y.W., Kim, T.J., Kim, J.W. ve Park, K.H., 1999. Molecular characterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH4-2, *Biochim Biophys Acta*, 1478, 333–40.
- Diane, W., Stephan, R. ve Wolfgang, Z., 1997. Application of thermostable enzymes for carbohydrate modification. In: Contribution of the Fourth International Workshop on Carbohydrate as Organic Raw Materials, March 20–21, 1997. WUV-Universitatverlag, Vienna.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I.J. ve Wishart, 2004. D.S., PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps, *Nucleic Acids Research*, 32 (Web Server issue), 660-664.
- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakteri İzolasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Everly, C. ve Alberto, J., 2000. Stressors, stress and survival: overview, *Front. Biosci.* 5, 780–786.
- Fitter, J., Herrmann, R., Hauss, T., Lechner, R.E. ve Dencher, N.A., 2001. Dynamical properties of alpha-amylase in the folded and unfolded state: the role of thermal equilibrium fluctuations for conformational entropy and protein stabilization. *Physica B: Condens. Matter*. 301, 1–7.
- Fredrich, A. ve Antrakian, G., 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2875–2882.
- Fritzsche, H.B., Schwede, T. ve Schulz, G.E., 2003. Covalent and three-dimensional structure of the cyclodextrinase from *Flavobacterium* sp. no. 92, *Eur. J. Biochem.* 270, 2332–2341.

- Gomes, J. ve Steiner, W. 2004. Extremophiles and extremozymes. Food Technol. Biotechnol. 42, 223–235.
- Haki, G.D. ve Rakshit S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, Bioresource Technology, 89, 17–34.
- Hashida, M. ve Bisgaard-Frantzen, H., 2000. Protein engineering of new industrial amylases, Trends Glycosci. Glycotechnol. 12, 389–401.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, Biochem. J. 280, 309–316.
- Herbert, R. ve Sharp, R., 1992. Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles. Chapman and Hall, NY.
- Hondoh, H., Kuriki, T. ve Matsuura, Y., 2003. Three-dimensional Structure and Substrate Binding of *Bacillus stearothermophilus* Neopullulanase, J. Mol. Biol. 326, 177–188.
- Igarashi, K., Ara, K., Saeki, K., Ozaki, K., Kawai, S. ve Ito S., 1992. Nucleotide sequence of the gene that encodes a neopullulanase from an alkalophilic *Bacillus*, Biosci. Biotech. Biochem. 56, 514–516.
- Ikeda, M. ve Clark, D., 1998. Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. 57, 624–629.
- James, A., 1995. Is thermophily a transferable property in bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 21, 165–174.
- Jiang, Y.M., 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. Food Chem. 66, 77–79.
- Kamitori, S., Kondo, S., Okuyama, K., Yokota, T., Shimura, Y., Tonozuka, T. ve Sakano, Y., 1999. Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47  $\alpha$ -amylase II (TVAII) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution, J. Mol. Biol. 287, 907–921.
- Kang, G.J., Kim, M.J., Kim, J.W. ve Park, K.H., 1997. Immobilization of thermostable maltogenic amylase, from *Bacillus stearothermophilus* for continuous production of branched oligosaccharides, J. Agric. Food Chem. 45, 4168–4172.
- Kaulpiboon, J. ve Pongsawasdi, P., 2005. Purification and characterization of cyclodextrinase from *Paenibacillus* sp. A11, Enzyme Microb. Tech. 36, 168–175.
- Kim, I.C., Yoo, S.H., Lee, S.J., Oh, B.H., Kim, J.W. ve Park, K.H., 1994. Synthesis of branched oligosaccharides from starch by two amylases cloned from *Bacillus licheniformis*, Biosci. Biotech. Biochem. 58, 416–418.

- Kim, J.W., Kim, Y.H., Lee, H.S., Yang, S.J., Kim, Y.W., Lee, M.H., Kim, J.W., Seo, N.S., Park, C.S. ve Park, K.H., 2007. Molecular cloning and biochemical characterization of the first archaeal maltogenic amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermoplasma volcanium* GSS1 Biochimica Biophysica Acta. 1774, 661–669
- Kim, J.S., Cha, S.S., Kim, H.J., Kim, T.J., Ha, N.C., Oh, S.T., Cho, H.S., Cho, M.J., Kim, M.J., Lee, H.S., Kim, J.W., Choi, K.Y., Park, K.H. ve Oh, B.H., 1999. Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility, J. Biol. Chem. 274, 26279-26286.
- Kim, M.J., Park, W.S., Lee, H.S., Kim, T.J., Shin, J.H., Yoo, S.H., Cheong, T.K., Ryu, S.R., Kim, J.C., Kim, J.W., Moon, T.W., Robyt, J.F. ve Park, K.H., 1999. Kinetics and inhibition of cyclomaltodextrinase from Alkalophilic *Bacillus* sp. I-5, Arch. Biochem. Biophys. 373, 110-115.
- Kim, T.J., Nguyen, V.D., Lee, H.S., Kim, M.J., Cho, H.Y., Kim, Y.W., Moon, T.W., Park, C.S., Kim, J.W., Oh, B.H., Lee, S.B., Svensson, B. ve Park, K.H. 2001. Modulation of the multisubstrate specificity of *Thermus* maltogenic amylase by truncation of the N-terminal domain and by a salt-induced shift of the monomer/dimer equilibrium. Biochemistry 40, 14182–14190.
- Kim, T.J., Shin, J.H., Oh, J.H., Kim, M.J., Lee, S.B., Ryu, S.R., Kwon, K.S., Kim, J.W., Choi, E.H., Robyt, J.F. ve Park, K.H., 1998. Analysis of the gene encoding cyclomaltodextrinase from alkalophilic *Bacillus* sp. I-5 and characterization of enzymatic properties, Arch. Biochem. Biophys. 353, 221-227.
- Kim, Y.W., Choi, J.H., Kim, J.W., Park, C., Kim, J.W. ve Cha, H., 2003. Directed evolution of *Thermus* maltogenic amylase toward enhanced thermal resistance, Appl Environ Microbiol, 69,4866–74.
- Kohilu, U., Nigam, P., Singh, D. ve Chaudhary, K., 2001. Thermostable, alkaliphilic and cellulase free xylanases production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C, Enzyme Microb. Technol. 28, 606–610.
- Kolcuoğlu, Y., 2005. Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Macrolepiota mastoidea*'da Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Krahe, M., Antranikian, G. ve Markel, H., 1996. Fermentation of extremophilic microorganisms, FEMS Microbiol. Rev. 18, 271–285.
- Kumar, S. ve Nussinov, R., 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? A review, Cell. Mol. Life Sci. 58, 1216–1233.
- Kuriki, T., Okada, S. ve Imanaka, T., 1988. New type of pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol. 170, 1554-1559.
- Kuriki, T., Takata, H., Okada, S. ve Imanaka, T., 1991. Analysis of active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase, J. Bacteriol. 173, 6147-6152.

- Lee, H.Y., Kim, M.J., Baek, J.S., Lee, H.S., Cha, H.J., Lee, S.B., Moon, T.W., Seo, E.S., Kim, D., Park, C.S. ve Park, H.K., 2003. Preparation and characterization of maltosyl-sucrose isomers produced by transglycosylation of maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus*, J Mol Catal B-Enzym 26 ,293–305.
- Lee, S.J., Yoo, S.H., Kim, M.J., Kim, J.W., Seok, H.M. ve Park, K.H., 1995. Production and characterization of branched oligosaccharides from liquefied starch by the action of *B. licheniformis* amylase, Starch 47, 127-134.
- Leuschner, C. ve Antranikian, G., 1995. Heat stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic organisms, World J. Microbiol. Biotechnol. 11, 95–114.
- Li, W.F., Zhou, X.X. ve Lu, P., 2005. Structural features of thermozyms, Biotechnol Adv, 23, 271–281.
- Liu, B., Wang, Y. ve Zhang X., 2006. Characterization of a recombinant maltogenic amylase from deep sea thermophilic *Bacillus* sp. *WPD616*, Enzyme Microb Tech, 39, 805–810.
- Lopez, G., 1999. DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life, J. Mol. Evol. 46, 439–452.
- Lowe, S.E., Jain, M.K. ve Zeikus, J.G., 1993. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. Microbiol. Rev. 57, 451–509.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W. ve Kakudo, M., 1984. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A, J. Biochem. 95, 697-702.
- McCarter, J.D. ve Withers, S.G., 1996. Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-glucosidase using 5-fluoroglycosyl fluorides, J. Biol. Chem. 271, 6889-6894.
- Miller, C.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426–428.
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization, Trends Biotechnol. 11, 88–95.
- Muralikrishna, G. ve Nirmal, M., 2005. Cereal a-amylases—an overview, Carbohydrate Polymers 60 (2005) 163–173.

- Ochman, H., Gerber, A.S. ve Hart, D.L., 1988. Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction, Genetics, 120, 621-623.
- Oh, K.W., Kim, M.J., Kim, H.Y., Byung-Yong Kim, B.Y., Baik, M.Y., Auh, J.H. ve Park, C.S., 2005. Enzymatic characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 expressed in *Escherichia coli*, FEMS Microbiol Lett., 252, 175–181.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. ve Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases, Biotech. and Appl. Biochem. 31, 135-152.
- Park, K.H., Kim, T.J., Cheong, T.K., Kim, J.W., Oh, B.H. ve Svensson, B., 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the  $\alpha$ -amylase family, Biochimica et Biophysica Acta. 1478, 165-185.
- Park, K.H., Kim, M.J., Lee, H.S., Han, N.S., Kim, D.M. ve Robyt, J.F., 1998. Transglycosylation reactions of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase with acarbose and various acceptors, Carbohydr. Res. 313, 235-246.
- Peter, W., Alexandra, T. ve Klaus, D., 2001. Conversions of glycerol to 1,3-propanediol by a newly isolated thermophilic strain, Biotechnol. Lett. 23, 463–466.
- Podkovyrov, S.M. ve Zeikus, J.G., 1992. Structure of the gene encoding cyclomaltodextrinase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E and characterization of the enzyme purified from *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 174, 5400-5405.
- Poonam, N. ve Dalel, S., 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing, Enzyme Microb. Technol. 17, 770–778.
- Saboto, D., Nucci, R., Rossi, M., Gryczynski, I., Gryczynski, Z. ve Lakowicz, J., 1999. The  $\beta$ -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 °C. Biophys. Chem. 81, 23–31.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989. Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes. In N. Ford, C. F. M. Nolan, and M. Ockler (ed.), Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. s. 19-75
- Satosi, H., Seigo, O., Kenji, T., Kazuhisa, K., Tetsuo, K., Toshiaki, K. ve Hitosi, K., 2001. Chemo-enzymatic synthesis of 3-(2-naphthyl)- L-alanine by an amino transferase from the extreme thermophiles *Thermococcus profundus*, Biotechnol. Lett. 23, 589–591.
- Smith, K.A. ve Salyers A.A., 1991. Characterization of a neopullulanase and an  $\alpha$ -glucosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* 95-1, J. Bacteriol. 173, 2962-2968.

- Svensson, B., 1994. Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability, Plant Mol. Biol. 25, 141-157.
- Svensson, B., Bak-Jensen, K.S., Jensen, M.T., Sauer, J., Gottschalk, T.E. ve Rodenburg, K.W., 1999. Studies on structure, function, and protein engineering of starch-degrading enzymes, J. Appl. Glycosci. 46, 49-63.
- Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N. ve Imanaka, T., 1992. Action of neopullulanase: neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)- and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosidic linkages, J. Biol. Chem. 267, 18447-18452.
- Tao, B.Y., Reilly, P.J. ve Robyt, J.F., 1989. Detection of a covalent intermediate in the mechanism of action of porcine pancreatic alpha-amylase by using  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance, Biochim. Biophys. Acta 995, 214-220.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitapevleri, Genişletilmiş 2. Baskı, İstanbul.
- Uitdehaag, J.C.M., Mosi, R., Kalk, K.H., VanderVeen, B.A., Dijkhuizen, L., Withers, S.G. ve Dijkstra, B.W., 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family, Nat. Struct. Biol. 6 , 432-436.
- URL-1, <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>, pUC18, pUC19: description & restriction map, Fermentas Life Sciences, 9 Eylül 2008.
- URL-2, <http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/index.html>, PlasMapper Version 2.0, 12 Eylül 2008.
- URL-3, <http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1517ma>, 7 Eylül 2008.
- URL-4, <http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=viewvecseq&vectorid=152>, Addgene, Vector Database, pGEM-T Easy Vector Sequence, 7 Eylül 2008.
- URL-5, <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>, pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Technical Manual, Promega, 7 Eylül 2008.
- URL-6, <http://www.addgene.org/pgvec1?f=d&cmd=viewvecseq&vectorid=270>, Addgene, Vector Database, pET-28a(+) Sequence, 7 Eylül 2008.
- URL-7, <http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB074.pdf>, pET-28a-c(+) Vectors, Novagen, 7 Eylül 2008.
- URL-8, <http://www.mikrobiyoloji.org/dokgoster.asp?dosya=110011300#01.01.>, Genler ve Fonksiyonları, 7 Eylül 2008.
- URL-9, <http://www.biocompare.com/protocols/protocol/318/Agarose-Gel-Electrophoresis.html>, Agarose Gel Electrophoresis, Biocompare Protocols, 6 Eylül 2008.



- URL-10, [http://www.ebioinfogen.com/dna\\_ext.htm](http://www.ebioinfogen.com/dna_ext.htm), Ethanol Precipitation of DNA, eBioinfogen, 9 Eylül 2008.
- URL-11, <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>, Translate Tool, Expasy, 7 Eylül 2008.
- URL-12, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Basic Local Alignment Search Tool, Blast, 7 Eylül 2008.
- URL-13, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>, ClustalW, EMBL-EBI, 10 Eylül 2008.
- URL-14, [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), Compute pI/Mw for Swiss-Prot/TrEMBL entries or a user-entered sequence, Expasy, 10 Eylül 2008.
- URL-15, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=AY684812.1>, 11 Eylül 2008.
- Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H. ve Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starchconverting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family, J. Biotechnol. 94, 137–155.
- Vieille, C., Burdette, D.S. ve Zeikus, J.G., 1996. Thermozyms. Biotechnol. Annu. Rev. 2:1–83.
- Vieille, C. ve Zeikus, J.G., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiol Mol Biol R, 65, 1-43.
- Vihinen, M. ve Mantsala, P., 1989. Microbial amylolytic enzymes, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 24, 329-418.
- Walsh, G., 2002. Proteins: Biochemistry and Biotechnology, John Wiley&Sons Baffins Lane, West Sussex, England.
- Woese, C.R., Kandler, O. ve Wheelis, M.L., 1990. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains *Archea*, *Bacteria* and *Eucarya*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 4576-4579.
- Yoo, S.H., Kweon, M.R., Kim, M.J., Auh, J.H., Jung, D.S., Kim, J.R., Yook, C., Kim, J.W. ve Park, K.H., 1995. Branched oligosaccharides concentrated by yeast fermentation and ejectiveness as a low sweetness humectant, J. Food Sci. 60, 516-519.
- Zbigniew, D., Mirosława, D., Marek B., Soren, C., Torben V.B., Lars, B., Keith S.W. ve Gideon J. D., 1999. X-ray Structure of Novamyl, the Five-Domain “Maltogenic”  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus stearothermophilus*: Maltose and Acarbose Complexes at 1.7 Å Resolution, Biochemistry , 38, 8385-8392.

## ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1996 yılında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı ve 2000 yılında bu programdan kimyager unvanı ile mezun oldu. 2001-2002 yılları arasında askerlik görevini ifa etti. 2003-2005 yılları arasında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimini tamamladı. 2005 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında doktora öğrenimine başladı. 2006 yılından beri KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.