

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* KG9'a AİT
 β -GALAKTOSİDAZ GENİNİN *Escherichia coli*'ye
AKTARILMASI ve ENZİMİN KARAKTERİZASYONU

Fatma MATPAN BEKLER

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Haziran-2012

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Fatma MATPAN BEKLER tarafından yapılan “**Termofilik *Bacillus licheniformis* KG9’a ait β -Galaktosidaz Geninin *Escherichia coli*’ye Aktarılması ve Enzimin Karakterizasyonu**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hülya SİVAS



Üye : Prof. Dr. Kemal GÜVEN



Üye : Prof. Dr. Birol OTLUDİL



Üye : Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL



Üye : Doç. Dr. Veysel TOLAN



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 11/06/2012

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../.../.....

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Hayatımın her alanında olduğu gibi, çalışmamda her türlü desteğini, bilgisini esirgemeyen, yanımda olan hayat arkadaşım, sevgili eşim **Ecevit BEKLER**'e ve her zaman yanımda olan ve beni destekleyen annem, babam ve kardeşlerime;

Akademik çalışmalarımda bana büyük emeği geçen, beni her konuda yönlendiren ve hiçbir yardımı esirgemeyen danışman hocam ve Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın **Prof.Dr. Kemal GÜVEN**'e;

Bu çalışmayı gerçekleştirebilmem için izole ettiği *Bacillus licheniformis* KG9 suşunu temin eden **Yrd.Doç.Dr. Reyhan GÜL GÜVEN**'e;

Danimarka'da Kopenhag Üniversitesi Yaşam Bilimleri Fakültesi, Ekoloji Bölümünde (Copenhagen University, Faculty of Life Sciences, Department of Agriculture and Ecology/Section of Genetics and Microbiology) gen aktarımı ile ilgili çalışmayı gerçekleştirmem için gerekli imkanı sağlayan, çalışmalar esnasında bilgi ve tecrübesinden yaralandığım **Prof.Dr. Peter STOUGAARD**'a;

Kopenhag Üniversitesi'nde laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan **Dr. Mariane Schmidt, Dr. Charlotte Frydenlund Michelsen, Kirsten Henriksen** ve **Ulla Rasmussen**'e;

Ayrıca tez süresince çalışmalarımın katkılarında dolayı Tez İzleme Komitesi'nde bulunan değerli hocalarım **Prof.Dr. Birol OTLUDİL** ve **Prof.Dr. Zübeyde BAYSAL**'a;

Laboratuvar çalışmalarını sırasında katkı sağlayan Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi doktora öğrencilerinden **Ömer ACER**'e ve **Ersin KILIÇ**'a, ayrıca tez çalışmalarım süresince bana manevi desteklerinden dolayı Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencilerinden **Özlem DEMİRCİ** ve **Nesrin HAŞİMİ**'ye;

Bu tez çalışmasını 12 FF 10 nolu projeyi maddi yönden destekleyen **Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**'ne de ayrıca teşekkür ederim.

Arş Gör. Fatma MATPAN BEKLER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
EK LİSTESİ.....	XII
KISALTMA VE SİMGELER.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Biyoteknoloji.....	5
2.2. Gen Mühendisliği ve Rekombinant DNA Teknolojisi.....	7
2.3. Enzimler ve Enzim Teknolojisi.....	17
2.4. Rekombinant Enzimler.....	23
2.5. <i>Bacillus ve Bacillus licheniformis</i>	23
2.6. β -Galaktosidaz.....	28
2.7. β -Galaktosidaz Kullanım Alanları.....	32
2.8. β -Galaktosidaz ile İlgili Kapsam.....	35
3. MATERYAL ve METOT.....	45
3.1. Materyal.....	45
3.1.1. Bakteri, Plazmit ve Büyüme Ortamları.....	45
3.1.2. Kimyasallar.....	45
3.1.3. Aletler.....	46
3.2. Metot.....	46
3.2.1. β -Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti.....	46
3.2.1.1. β -Galaktosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	46
3.2.2. <i>B. licheniformis</i> KG9'dan Kromozomal DNA İzolasyonu ve RNA'dan Arındırılması.....	47
3.2.2.1 Kromozomal DNA İzolasyonu.....	47

3.2.2.2.	DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	49
3.2.2.3.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	49
3.2.3.	<i>B. licheniformis</i> KG9 Bakterisine ait β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) <i>E. coli</i> 'ye Aktarılması	49
3.2.3.1.	Fonksiyona Dayalı Gen İzolasyonu.....	50
3.2.3.1.(1)	Kromozomal DNA'nın Restrüksiyon Enzimleriyle Kısmi olarak Kesilmesi.....	50
3.2.3.1.(2)	pUC18 Klonlama Vektörünün Ligasyona Hazırlanması.....	51
3.2.3.1.(3)	Kromozomal DNA ve Vektör DNA'sının Jelden Saflaştırılması.....	52
3.2.3.1.(4)	β -Galaktosidaz Geni (β -gal) ile pUC18 Plazmit DNA'sının Ligasyonu.....	53
3.2.3.1.(5)	Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon.....	54
3.2.3.1.(6)	pUC18 [pUC18+ β -Galaktosidaz Geni (β -gal)] Plazmitini Taşıyan <i>E. coli</i> Kolonilerinin Belirlenmesi.....	55
3.2.3.2.	Sekansa Dayalı Gen İzolasyonu.....	56
3.2.3.2.1.	β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) PCR ile Amplifikasyonu.....	56
3.2.3.2.1.(1)	β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) Amplifikasyonu için Primer Dizayını.....	56
3.2.3.2.1.(2)	PCR Programlama.....	57
3.2.3.2.1.(3)	PCR Reaksiyonun Hazırlanması	59
3.2.3.2.1.(4)	PCR Ürününün Elektroforezi ve Agaroz Jelden Arıtılması.....	59
3.2.3.3.	β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) <i>E. coli</i> 'ye Aktarılması.....	59
3.2.3.3.(1)	PCR Ürünlerinin ve pUC18 Δ lacZ Klonlama Vektörünün Ligasyona Hazırlanması ve Ligasyon.....	59
3.2.3.3.(2)	pUC18 Δ lacZ [pUC18 Δ lacZ+ β -Galaktosidaz Geni (β -gal)] Plazmitini Taşıyan <i>E. coli</i> Kolonilerinin Belirlenmesi.....	62
3.2.3.4.	Rekombinant <i>B. licheniformis</i> KG9 β -Galaktosidazının Ekspresyonu.....	62
3.2.4.	DNA Dizi Analizi.....	63
3.2.5.	Biyoinformatik incelemeler.....	64
3.2.6.	β -Galaktosidaz Saflaştırılması.....	64
3.2.6.1.	<i>B. licheniformis</i> KG9'a Ait Doğal Ekstraselüler β -Galaktosidazın Saflaştırılması.....	65

3.2.6.1.(1)	Bakterinin Kültüre Alınması ve Enzim Ekstraksiyonu.....	65
3.2.6.1.(2)	Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz.....	65
3.2.6.1.(3)	İyon-Değişim Kromatografisi.....	65
3.2.6.1.(4)	Jel Geçirgenlik Kromatografisi.....	66
3.2.6.1.(5)	Affinite Kromatografisi.....	67
3.2.6.2.	Rekombinant <i>E. coli</i> 'ye ait β -Galaktosidazın Saflaştırılması.....	68
3.2.6.2.(1)	Bakterinin Kültüre Alınması ve Enzim Ekstraksiyonu.....	68
3.2.6.2.(2)	Rekombinant <i>E. coli</i> 'ye ait β -Galaktosidazın Saflaştırma Aşamaları.....	68
3.2.6.3	Elektroforez.....	68
3.2.6.3.(1)	Jelin Hazırlanması.....	68
3.2.6.3.(2)	Elektroforez İşlemi.....	69
3.2.7.	Enzim Karakterizasyonu.....	70
3.2.7.1.	Optimum Sıcaklık Tayini.....	70
3.2.7.2.	Optimum pH Tayini.....	70
3.2.7.3.	Substrat Özgünlüğü.....	70
3.2.7.4.	Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	71
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	73
4.1.	Bakteri, Plazmit ve Büyüme Ortamları.....	73
4.2.	β -Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti.....	74
4.3.	<i>B. licheniformis</i> KG9'dan Kromozomal DNA İzolasyonu ve RNA'dan Arındırılması.....	75
4.3.1.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	76
4.4.	<i>B.licheniformis</i> KG9 Bakterisine ait β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) <i>E. coli</i> 'ye Aktarılması	77
4.4.1.	Fonksiyona Dayalı Gen İzolasyonu.....	77
4.4.1.1	Kromozomal DNA'nın Restrüksiyon Enzimleriyle Kısmi Olarak Kesilmesi.....	78
4.4.1.2.	pUC18 Klonlama Vektörünün Ligasyona Hazırlanması.....	78
4.4.1.3.	pUC18 + β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) Plazmidini Taşıyan <i>Escherichia coli</i> Kolonilerinin Belirlenmesi.....	79

4.4.2.	Sekansa Dayalı Gen İzolasyonu.....	82
4.4.2.1.	β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) PCR ile Amplifikasyonu	84
4.4.2.1.1.	β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) Amplifikasyonu için Primer Dizaynı	84
4.4.2.1.2.	β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) <i>E. coli</i> 'ye Aktarılması.....	87
4.4.2.1.3.	pUC18 Δ lacZ [pUC18 Δ lacZ+ β -Galaktosidaz Geni (β -gal)] Plazmidini Taşıyan <i>E. coli</i> Kolonilerinin Belirlenmesi	87
4.5.	Rekombinant β -Galaktosidaz Ekspresyonu.....	90
4.6.	Biyoinformatik İncelemeler.....	91
4.6.1.	<i>B. licheniformis</i> KG9'un β -gal Kütüphanesinin İncelenmesi.....	91
4.7.	<i>B. licheniformis</i> KG9'a ait Doğal Ekstraselüler β -Galaktosidaz ve Rekombinant <i>Echerichia coli</i> 'ye ait β -Galaktosidazın Saflaştırılması.....	96
4.7.1.	İyon-Değişim Kromatografisi.....	96
4.7.2.	Jel Geçirgenlik Kromatografisi.....	97
4.7.3.	Affinite Kromatografisi.....	99
4.7.4.	Elektroforez.....	100
4.8.	Enzim Karakterizasyonu.....	104
4.8.1.	Optimum Sıcaklık Tayini.....	104
4.8.2.	Optimum pH Tayini.....	105
4.8.3.	Substrat Özgünlüğü.....	105
4.8.4.	Metal iyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	107
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	109
6.	KAYNAKLAR	117
EKLER.....		129
ÖZGEÇMİŞ.....		145

ÖZET

TERMOFİLİK *Bacillus licheniformis* KG9'a AİT β-GALAKTOSİDAZ GENİNİN *Escherichia coli*'ye AKTARILMASI ve ENZİMİN KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Fatma MATPAN BEKLER

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2012

Bu çalışmada sıcak su kaynağından izole edilen termofilik *Bacillus licheniformis* KG9 suşu; β-galaktosidazının stabil olması, enzimin bol miktarda üretilmesi ve bu bakterinin 16S rRNA dizi analizi karşılaştırıldığında tüm genomu bilinen *B. licheniformis* DSM 13'e %99.9 oranında benzerlik göstermesinden dolayı gen klonlaması ve saflaştırma için kullanılmıştır. *B. licheniformis* KG9'un kromozomal DNA'sı izole edildi. Termofilik bakterilere ait β-galaktosidaz geni, gen kütüphanesinden tarandı. PCR'a dayalı metodla izole edilen 4 farklı putatif β-galaktosidaz geni (*β-gal I*, *β-gal II*, *β-gal III*, *β-gal IV*) çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri pUC18ΔlacZ vektörüne klonlanarak *Escherichia coli*'ye aktarıldı ve eksprese olan koloniler seçilerek dizi analizi yapıldı. Dizi analiz sonuçlarına göre; 4 farklı putatif β-galaktosidaz geninin, gen kütüphanesinde bulunan diğer Gram pozitif *Bacillus* türlerinin genlerine benzerlik gösterdiği görüldü. En yakın homolojilerin: *β-gal I* %42.9 *Bacillus cereus*'tan tanımlanan *β-gal'*a; *β-gal II* %68.3 *Bacillus circulans*'tan tanımlanan *β-gal'*a; *β-gal III* %68.8 *Bacillus subtilis*'ten tanımlanan *β-gal'*a; *β-gal VI* %76.7 *B. subtilis*'ten tanımlanan *β-gal'*a yakınlık gösterdiği belirlendi.

Hem *B. licheniformis* KG9 hem de rekombinant *E. coli*'den elde edilen β-galaktosidaz, DEAE-selüloz, Sephadex G-75 ve *p*-aminobenzil-1-thio-β-D-galaktopiranosid (PABTG-agarose) kromatografi yöntemleriyle saflaştırıldı. Saflaştırma kat sayısı 9.4 ve verim %85 olarak belirlendi. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı non-denatüre PAGE ile yaklaşık 90 kDa olarak tespit edildi.

Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu çalışmalarında; substrat özgünlüğü için yapay (ONPG) ve doğal (laktöz) substratlar kullanılarak, metaller ve EDTA'nın etkisini belirlemek için farklı konsantrasyondaki (1, 2.5, 5, 10, 25 mM) CoCl₂, MgCl₂, NiCl₂, CaCl₂, MnCl₂, HgCl₂, AgCl₂, FeCl₂ ve EDTA kullanılarak test edildi. Ca⁺² (%147), Mn⁺² (%106) ve Mg⁺²'nin (%135) aktiviteyi artırdığı; Ag⁺², Fe⁺² ve Hg⁺²'nin ise enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edildi. ONPG konsantrasyonuna bağlı olarak enzimin Km ve Vmax değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre sırasıyla 2.0792 mM ve 2.037 μmol/dk olarak hesaplandı. Laktöz konsantrasyonuna bağlı olarak enzimin Km ve Vmax değerleri Lineweaver–Burk plot'a göre sırasıyla 9.068 mM ve 1.0476 μmol/dk olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: β-galaktosidaz, klonlama, termofilik, *Bacillus licheniformis* KG9, saflaştırma

ABSTRACT

CLONING of β -GALACTOSIDASE GENE of THERMOPHILIC *Bacillus licheniformis* KG9 to *Escherichia coli* and ITS CHARACTERIZATION

PhD THESIS

Fatma MATPAN BEKLER

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2012

In this study *Bacillus licheniformis* KG9, which was isolated from Taşlıdere hot water springs in Batman/Turkey, was used for gene cloning and purification due to its stable β -galactosidase, abundant production of the enzyme and since it displayed similarity at 99.9% to *B. licheniformis* DSM 13, whose all genomes were known when 16S rRNA sequence analysis of this bacterium was compared. Chromosomal DNA of *B. licheniformis* KG9 was isolated. β -Galactosidase gene of thermophilic bacteria was scanned at gene library. Four different putative β -galactosidase genes (β -gal I, β -gal II, β -gal III, β -gal IV) isolated with the method based on PCR were amplified. The PCR fragments were inserted into pUC18 Δ lacZ vector, transformed into *Escherichia coli*, and by selecting the expressed colonies they were sequenced. According to the sequence analysis results: PCR based isolation of putative β -galactosidase genes from *B. licheniformis* KG9 showed the presence of four β -galactosidase genes, which when translated, displayed similarity to genes from other Gram positive bacteria: β -gal I showed 42.9% identity to a β -gal from *Bacillus cereus*; β -gal II showed 68.3% identity to a β -gal from *Bacillus circulans*; β -gal III displayed 68.8% identity to a β -gal from *Bacillus subtilis*; and β -gal IV showed 76.7% identity to a β -gal from *B. subtilis*.

β -galactosidase, isolated from both *B. licheniformis* KG9 and recombinant *E. coli* was purified by DEAE-cellulose, Sephadex G-75 and *p*-aminobenzyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (PABTG-agarose) chromatography methods. Purification fold was determined to be 9.4, and yield as 85%. Molecular weight of the purified enzyme was found to be about 90 kDa by non-denatured PAGE.

In the studies of characterization of purified enzyme; Artificial (ONPG) and natural (lactose) substrates for substrate specificity and CoCl₂, MgCl₂, NiCl₂, CaCl₂, MnCl₂, HgCl₂, AgCl₂, FeCl₂ and EDTA of different concentrations (1, 2.5, 5, 10, 25 mM) for determining the effect of the metals and EDTA were used and tested. Enzyme activity was increased in presence of Ca⁺² (147%), Mn⁺² (106%) and Mg⁺² (135%) while activity of the enzyme was inhibited in presence of Ag⁺², Fe⁺² and Hg⁺². Km and Vmax values of the enzyme depending on ONPG concentration were calculated as 2.0792 mM and 2.037 μ mol/min respectively according to the Lineweaver-Burk plot. Km and Vmax values of the enzyme depending on lactose concentration were calculated as 9.068 mM and 1.0476 μ mol/min respectively according to the Lineweaver-Burk plot.

Key words: β -galactosidase, cloning, thermophilic, *Bacillus licheniformis* KG9, purification

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	Tip II restriksiyon enzimleri	12
Çizelge 2.2.	Klonlamada kullanılan vektörler	13
Çizelge 2.3.	Farklı endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulama alanları	22
Çizelge 2.4.	<i>Bacillus</i> ssp. enzimlerinin endüstriyel uygulamaları	25
Çizelge 3.1.	β -Galaktosidaz (<i>β-gal</i>) geninin amplifikasyonu için hazırlanan Thermal Cycler programı	58
Çizelge 4.1.	<i>B. licheniformis</i> KG9'a ait saflaştırma basamakları	100
Çizelge 4.2.	<i>E. coli</i> 'ye ait saflaştırma basamakları	100
Çizelge 4.3.	Metal iyonları ve EDTA'nın enzim aktivitesine etkisi	107

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	Biyoteknolojinin uygulama alanları	6
Şekil 2.2.	Rekombinant DNA teknolojisinde izlenen olaylar	10
Şekil 2.3.	pUC18 Plazmitinin yapısı	15
Şekil 2.4.	PCR çoğalmasının basamakları	16
Şekil 2.5.	<i>B. licheniformis</i> 'in dairesel kromozom haritası	28
Şekil 2.6.	β -Galaktosidaz ile laktozun hidrolizi	29
Şekil 2.7.	<i>E.coli</i> 'ye ait β -galaktosidazın tetramer görüntüsü	30
Şekil 3.1.	pUC18 Plazmitinin yapısı (2686 bç)	51
Şekil 3.2.	β -Galaktosidaz (<i>β-gal</i>) geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri ve T_m değerleri	58
Şekil 4.1.	<i>B. licheniformis</i> KG9'un 16S rRNA genlerine göre çizilen diğer <i>Bacillus</i> türleriyle yakınlığını gösteren filogenetik ağaç	73
Şekil 4.2.	Zamana bağlı <i>B. licheniformis</i> KG9'un üreme grafiği ve spesifik β -galaktosidaz aktivitesi	75
Şekil 4.3.	Kromozomal DNA'nın miktarı ve saflığının spektrofotometrik ölçümü	76
Şekil 4.4a.	Agaroz jel elektroforezinde kullanılan standart DNA markır (New England Biolabs)	77
Şekil 4.4b.	Agaroz jel elektroforezinde kromozomal DNA'nın saflığının kontrolü	77
Şekil 4.5.	DNA'nın kısmi olarak kesilmesi	78
Şekil 4.6.	pUC18 plazmit DNA'sı <i>BamHI</i> endonükleaz enzimi ile kesilmesi	79
Şekil 4.7.	pUC18 + β -galaktosidaz genini (<i>β-gal</i>) taşıyan <i>E. coli</i> kolonilerinin belirlenmesi	80
Şekil 4.8.	Plazmit DNA miktarının ve saflığının Nano-Drop sonucu	81
Şekil 4.9.	Plazmit DNA'nın saflığının agaroz jelde kontrolü	81
Şekil 4.10.	<i>B. licheniformis</i> 'e ait putatif β -galaktosidaz gen sekansları (<i>β-gal 1, β-gal 2, β-gal 3, β-gal 4</i>)	83
Şekil 4.11a.	β -gal 2 PCR ürünü	84
Şekil 4.11b.	β -gal 3 PCR ürünü	85

Şekil 4.11c.	β -gal 4 PCR ürünü	85
Şekil 4.12a.	PrA ve PrC'nin PCR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü	86
Şekil 4.12b.	PrA ve PrC'nin PCR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü	86
Şekil 4.13.	LB+Amp ₁₀₀ +X-gal+IPTG içeren ortamda gelişen PrA: primer_B.lich_ β -gal2 rekombinant koloniler	87
Şekil 4.14.	LB+Amp ₁₀₀ +X-gal+IPTG içeren ortamda gelişen PrB: primer_B.lich_ β -gal3 rekombinant koloniler	88
Şekil 4.15.	LB+Amp ₁₀₀ +X-gal+IPTG içeren ortamda gelişen PrC: primer_B.lich_ β -gal4 rekombinant koloniler	88
Şekil 4.16.	LB+Amp ₁₀₀ +X-gal+IPTG içeren ortamda gelişen self-ligasyon koloniler	89
Şekil 4.17.	Mini prep ile izole edilen rekombinant bakterilerin plazmid DNA'ları	89
Şekil 4.18.	Rekombinant β -galaktosidazın ekspresyonu	90
Şekil 4.19a.	β -galaktosidaz 1 geninin nükleotid sekanslarının diğer bakterilerde karşılaştırılması	92
Şekil 4.19b.	β -galaktosidaz 2 geninin nükleotid sekanslarının diğer bakterilerde karşılaştırılması	93
Şekil 4.19c.	β -galaktosidaz 3 geninin nükleotid sekanslarının diğer bakterilerde karşılaştırılması	94
Şekil 4.19d.	β -galaktosidaz 4 geninin nükleotid sekanslarının diğer bakterilerde karşılaştırılması	95
Şekil 4.20.	<i>B. licheniformis</i> KG9'un DEAE-selüloz iyon-değişim kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar	96
Şekil 4.21.	<i>E.coli</i> 'nin DEAE-selüloz iyon-değişim kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar	97
Şekil 4.22.	<i>B. licheniformis</i> KG9'un Sephadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar	98
Şekil 4.23.	<i>E.coli</i> 'nin Sephadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar	99
Şekil 4.24.	<i>B. licheniformis</i> KG9'a ait saflaştırılmış doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant <i>E. coli</i> 'ye ait saflaştırılmış β -galaktosidazının non-denatüre PAGE elektroforezi	101
Şekil 4.25.	Standart proteinlerin MA değerlerinin Rf değerlerine göre değişimi	102
Şekil 4.26.	<i>B. licheniformis</i> KG9'a ait saflaştırılmış doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant <i>E. coli</i> 'ye ait saflaştırılmış β -galaktosidazın BNG boyamalı elektroforezi	103

Şekil 4.27.	<i>B. licheniformis</i> KG9'a ait saflaştırma öncesi ve sonrası elde edilen enzim optimum sıcaklığı	104
Şekil 4.28.	<i>B. licheniformis</i> KG9'a ait saflaştırma öncesi ve sonrası elde edilen enzim optimum pH'sı	105
Şekil 4.29.	ONPG konsantrasyonuna bağlı Linewear-Burk grafiği	106
Şekil 4.30.	Laktoz konsantrasyonuna bağlı Linewear-Burk grafiği	106

EK LİSTESİ

<u>Cizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Ek 1.	Alkalin Çözeltisi	129
Ek 2.	Kromozomal DNA İzolasyonu Çözeltileri	131
Ek 2.1.	Lizozim	131
Ek 2.2.	Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol (25:24:1)	131
Ek 2.3.	Kloroform/İzoamil Alkol (24:1)	131
Ek 2.4.	TE Tamponu (pH 8.0)	131
Ek 2.5.	STET Tamponu	131
Ek 2.6.	%10 SDS (Sodyum Dosesil Sülfat)	132
Ek 2.7.	5 M NaCl	132
Ek 2.8.	Rnaz R Hazırlanması (10 mg/ml)	132
Ek 3.	Agaroz Jel Elektroforezi	133
Ek 3.1.	50X TAE Tamponu (pH 8.0)	133
Ek 3.2.	Etidiyum Bromid (EtBr) (10 mg/ml)	133
Ek 3.3.	DNA Standardı	133
Ek 4.	<i>E. coli</i> DH5 α Bakterisinin Kompetent Hale Getirilmesi	135
Ek 5.	S.O.C Besi Ortamı (Süper Optimal Katabolit Represyon Besi Ortamı)	137
Ek 6.	LB+ Amp+IPTG+X-gal Besi Yeri Hazırlanışı	139
Ek 7.	Saflaştırma Tamponları	141
Ek 8.	Elektroforez Çözeltileri	143

KISALTMA VE SİMGELER

A, G, C, T	: Adenin, Guanin, Sitozin, Timin
α	: Alfa
AgCl ₂	: Gümüş klorür
Ala	: Alanin
Amp/Amp ^r	: Ampisilin/Ampisilin direnç geni
APS	: Amonyum persülfat
Arg	: Arjinin
Asp	: Aspartik asit
ATP	: Adenozin 5'-trifosfat
β	: Beta
BAC	: Bakteri yapay kromozomları
bç	: Baz çifti
BFB	: Brom-fenol-Blue
BNG	: 6-Bromo-2 naftil- β -D-galaktopiranosid
BSA	: Bovin Serum Albümin
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CoCl ₂	: Kobalt klorür
°C	: Santigrad derece
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
Da	: Dalton
Δ	: Delta
DEAE	: Dietilaminoetil
DNA	: Deoksiribonükleikasit
dNTP	: Deoksibonükleozid trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum Bromid
Φ	: Fi
FCR	: Folin reaktifi (Folin–Ciocalteu reagent)
FeCl ₂	: Demir klorür
g/L	: gram/litre

Glu	: Glutamik asit
Gly	: Glisin
HCl	: Hidroklorik asit
HgCl ₂	: Civa klorür
H ₂ O	: Su
IPTG	: İzopropil β-D-1-thio-galaktopiranosid
Kb	: Kilobaz
kbç	: Kilobaz çifti
kDa	: Kilodalton
K _m	: Michaelis sabiti
L	: Litre
LB	: Luria Bertani
Lys	: Lizin
M	: Molarite
MAC	: Memeli yapay kromozomları
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi (Multiple cloning site)
mA	: Miliamper
mb	: Megabaz
mg	: Miligram
mg/mL	: Miligram/mililitre
Milli Q (MQ)	: Distile su
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MnCl ₂	: Mangan klorür
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
mL/dk	: Mililitre/dakika
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
ng/μL	: Nonogram/mikrolitre
nm	: Nanometre
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaCl	: Sodyum klorür
NaAc	: Sodyum asetat
NEB	: New England Biolab

NiCl ₂	: Nikel klorür
OD	: Optical Density
ONP	: <i>ortho</i> -Nitrofenil
ONPG	: <i>ortho</i> -Nitrofenil- β -galaktosid
PABTG	: <i>p</i> -aminobenzil-1-thio- β -D-galaktopiranosid
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pH	: Hidrojenin gücü (Power of Hydrogene)
ppm	: Milyonda bir birim (Parts per million)
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Rotation per minute)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Ser	: Serin
sn	: Saniye
S.O.C	: Süper optimal katabolit represyon besi ortamı
STET	: Sükroz-Triton X100-EDTA-Tris
TAE	: Tris-EDTA-Asetik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tetrametiletilediamine
Thr	: Treonin
T _m	: Erime sıcaklığı (Melting Temperature)
U	: Ünite
U/ μ L	: Ünite/mikrolitre
UV	: Ultra Viyole
V	: Volt
V _{max}	: En yüksek reaksiyon hızı
v/v	: Hacim/Hacim (volume/volume)
YAC	: Maya yapay kromozomları
w/v	: Ağırlık/Hacim (weight/volume)
X-gal	: 5-Bromo-4-kloro-3-indolil β -D-galaktopiranosid
μ g	: Mikrogram
μ g/mL	: Mikrogram/mililitre

μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
%	: Yüzde
>	: Büyük
<	: Küçük

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, yaşayan organizmalara ticari veya endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere kimyasal yöntemlerin uygulanmasıdır. Bununla birlikte, biyoteknoloji kelimesi, genetik teknikler kullanılarak üretilen organizmanın *in vitro* koşullarda manipüle edilmesi anlamına da gelmektedir (Madigan ve Martinko 2010).

Biyoteknoloji alanındaki araştırma ve eğitim çalışmaları ulusal ve uluslararası örgütlerce desteklenmekte; bazı ülkelerde bu alanda yapılan büyük yatırımlarla bu ülkeler dünya liderliğine soyunmaktadır. Son yirmi yılda, dünyadaki uygulama ve araştırma konularına göz atıldığında, biyoteknolojinin özellikle sağlık, tarım, gıda sektörleri ile kimyasalların çevreye verdiği zararın giderilmesi için de kullanıldığı görülmektedir (Telefoncu 1996, Kıymaz ve Tarakçıoğlu 2003).

Biyoteknoloji ürünlerinin çoğu “rekombinant proteinlerdir”. Proteinler yaşam için gerekli olan önemli yapısal ve düzenleyici moleküllerdir. Rekombinant DNA teknolojisi ya da genetik mühendisliği olarak adlandırılan biyoteknolojinin alt dalı olan klasik zenginleştirme yönteminin dezavantajlarını yenebilmek için moleküler metotlar 1971-73'lü yıllarda araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Gen klonlama olarak da adlandırılan bu yöntemler genetiğin üçüncü büyük çağını başlatmıştır.

Moleküler biyoloji teknolojilerinin birçoğunun köşetaşı gendir. Genlerin çalışmasını kolaylaştırmak için, bunlar izole edilebilir ve amplifiye edilebilirler. İlgilenilen bir genin izolasyon ve amplifikasyon yöntemlerinden biri, canlı hücreler içinde çoğaltılabilen bir araç ya da vektör olarak hizmet veren bir başka DNA molekülüne takarak geni klonlamaktır. Farklı kökenli bu iki DNA birleştiğinde rekombinant DNA molekülü oluşur. Krosing-over gibi genetik süreçlerin teknik olarak rekombinant DNA üretmelerine rağmen, bu terim genellikle farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen kısımların katılmasıyla üretilen DNA molekülleri için kullanılmıştır. Rekombinant DNA molekülü genellikle prokaryotik nadiren de ökaryotik konak hücreye yerleştirilir. Daha sonra konak hücre çoğalır ve yabancı parçalı DNA vektörü de çoğalır. Yabancı DNA böylece sayıca artar ve bunu takiben daha fazla analiz yapmak üzere saflaştırılabilir (Mullis 1990).

Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; insanlık için gerekli proteinlerin eldesi, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve

fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşularının oluşturulması ve rekombinant proteinlerin ekspresyonu gibi amaçlarla yapılmaktadır (Kuk ve Erensoy 2008).

Klonlama birçok biyolojik araştırmada belirli genlerin seçilip saflaştırılıp diğer genlerden arındırılmış biçimde elde edilmesini sağlar. Belli bir geni içeren DNA parçasının elde edilmesinin yegane yolu klonlamadır. Bu nedenle birçok durumda genlerin yapısı ve gen ekspresyonunun kontrolü ile ilgili doğrudan çalışma yapmakla ilgili materyalin elde edilmesinde tek yol gen klonlamadır. Gen klonlandıktan sonra genlerin yapı ve görevi hakkında elde edilebilecek bilgilerde hemen hemen sınır yoktur. Klonlanmış materyalin elde edilebilirliği DNA dizi analizi ve *in vitro* mutagenesis gibi genler hakkında çalışmalarla ilgili analitik metotların gelişmesine ve birçok teknikler oluşmasına vesile olmaktadır. Genleri klonlama kabiliyeti genlerin yapılarının ve gen aktivitelerinin kontrolünün anlaşılması ile ilgili hızlı ilerlemelere yol açmaktadır.

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Endüstriyel üretimde mikrobiyal kaynaklı enzimlerin ekonomik oluşları, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmayışları açısından avantajları uzun zamandır savunulmaktadır (Topal 2000).

Enzimler gıda, yem, tarım, kağıt, deri ve tekstil endüstrileri gibi çok sayıda yeni uygulamada kullanılmaktadır ve bu da maliyeti önemli derecede düşürmektedir. Aynı zamanda hızlı teknolojik gelişmeler; sağlık, enerji, hammadde ve çevre ile ilgili konularda güçlenen bir trend olan enzim teknolojisini içeren kimya ve ilaç sanayisini canlandırmaktadır (Beilen ve Lie 2002).

Biyoteknolojinin ilerlemesiyle ve enzimlerin saflaştırılmasıyla enzim uygulamalarının sayısı kat kat artmıştır ve termostabil enzimlerin elde edilebilirliğiyle endüstriyel işlemler için bir çok yeni imkan ortaya çıkmıştır. Esas olarak termofilik organizmalardan izole edilen termostabil enzimler, genel iç stabilitelelerinden dolayı birçok ticari uygulama alanı bulmuştur (Haki ve Rakshit 2003). Parçalanması zor maddelerin, parçalanabilir hale dönüştürülmesi mikrobiyolojik olarak hücre dışı

enzimlerle gerçekleştirilmektedir. Hem üretim koşullarının hem de izolasyon işlemlerinin daha kolay ve ucuz olması nedeniyle biyoteknolojik işlemlerde hücre dışı enzimler ile ilgili çalışmalar önem arz etmektedir.

β -Galaktosidazlar, β -galaktosidlerdeki glikozidik bağı parçalayan enzim grubudur. β -Galaktosidazların laktozu parçalayarak daha tatlı ve suda çözünürlüğü yüksek glikoz ve galaktoza indirgeme özelliği bu enzime ticari bir önem katmaktadır (Mazı ve ark. 2008).

β -Galaktosidaz, doğada çeşitli mikroorganizma, bitki ve hayvan dokularında bulunur. Üretimlerinin kolaylıkla kontrol edilebilmesi ve yüksek verimliliğe sahip olmalarından dolayı diğer kaynaklar ile karşılaştırıldığında mikrobiyal β -galaktosidazların ticari önemi daha fazladır. Mikrobiyal β -galaktosidazlar biyoteknolojik uygulamalar için önemli ölçüde ilgi çekmektedir ve bununla ilgili çeşitli organizmalardan elde edilen bu enzimlerin karakterizasyonu hakkında pek çok rapor ve derlemeler yayınlanmıştır (Juajun ve ark. 2010).

Biyoproses teknolojide β -galaktosidazın uygulamaları, sütün sindirilebilirliğini artırmak veya süt ürününün fonksiyonel özelliklerini geliştirmek amacıyla, uzun süredir laktoz hidrolizi için kullanılan özellikle mikrobiyal enzimler ile başarılmıştır. Son on yıl boyunca, enzimin başka potansiyel uygulamaları da geliştirilmiştir; β -galaktosidazın katalizlediği transgalaktosilasyonun gıda maddeleri, ilaç ve diğer biyolojik olarak aktif bileşiklerin yapısal ve fonksiyonel modifikasyonları için faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Nakayama ve Amachi 2002, Karasová-Lipovová ve ark. 2003).

Süt endüstrisinde, laktozun glikoz ve galaktoza hidrolizlenme yeteneği, tatlılığı artıran ve laktoz kristalizasyonunu azaltan süt toleransını geliştirmenin bir yoludur (Sørensen ve ark. 2006). Ayrıca peynir altı suyunun geri kazanımında, fermente ve alkolsüz içkilerin üretiminde, fırıncılıkta, tıpta ELISA testinde, galaktooligosakkaritlerin (GOS) oluşturulmasında kullanılmaktadır.

Günümüzde, yüzden fazla putatif β -galaktosidaz dizileri çeşitli veritabanlarından çıkarılabilir ve bunlar fonksiyonel benzerliğe dayalı dört farklı glikozit hidrolaz (GH) ailesi olan GH-1, GH-2, GH-35, ve GH-42 ile sınıflandırılabilir (Cantarel ve ark. 2009).

Bacillus licheniformis; termostabil amilaz, proteazlar, β -laktamaz ve α -asetolaktat dekarboksilazı içeren önemli enzimlerin endüstriyel ölçekte üretiminin yanı sıra, protein yapılı basitrasin antibiyotiği ve çeşitli organik metabolitler (örneğin; 2,3-bütandiol ve gliserol) gibi daha küçük bileşiklerin üretiminde yaygın olarak kullanılan toprakta yaşayan ve endospor oluşturan bir mikroorganizmadır (De Clerck ve De Vos 2004, Juajun ve ark. 2010).

Ülkemizin çeşitli bölgelerinde çok sayıda doğal sıcak su kaynağı bulunmaktadır. Sıcak su kaynakları gibi ekstrem çevrelerden elde edilen mikroorganizmaların enzimleri, taşıdıkları özgün özelliklerden dolayı atıkların arıtımı, gıda, tekstil, ilaç sanayine kadar çok sayıda alanda uygulama alanı bulmaktadır. Bu çalışmada, Batman/Türkiye'deki Taşlıdere sıcak su kaynaklarından izole edilen *B. licheniformis* KG9 kullanılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Biyoteknoloji

Bu gün biyoteknoloji denildiğinde, ilk akla gelen, embriyonik ve genetik manipulasyonların da içinde bulunduğu moleküler genetik ve rekombinant DNA teknolojisidir. Bu teknolojiler yardımı ile, organizmaların genomlarında (DNA veya RNA) bulunan bütün bilgileri ve şifreleri değiştirmek; aynı veya farklı cinsten organizmalara DNA sekansları veya genleri aktarmak; istenilen DNA sekanslarını veya baz sıralarını çıkarmak, genlerin birbirlerine olan konumlarını ve ilişkilerini saptamak; transgenik hayvanlar, mikroorganizmalar elde etmek, yeni genotipte ve fenotipte organizmalar ile hibrid hücreler oluşturmak; hücre füzyonları yapmak, antikorların bakteriler tarafından üretilmesini sağlamak, insan ve hayvanların sağlığında çok önemli rolleri olan biyoteknolojik aşular, proteinler, enzimler, antibiyotikler, hormonlar, sitokinler, monoklonal antikorlar, teşhis, tedavi, koruma ve araştırma amacı ile kullanılan diagnostik maddeler, kimyasallar, vs. elde etmek konularında biyoteknolojik yöntemlerden çok fazla yararlanılmaktadır (Arda 2000).

Tarihsel evrime göre biyoteknoloji iki temel döneme ayrılmaktadır:

1) Geleneksel Biyoteknoloji: Geleneksel biyoteknoloji kapsamında bakteriler, virüsler ve mantarlar çeşitli ürünlerin sentezlenmesi için fabrika olarak kullanılmaktadır (Güven 2011). Yaklaşık 20 yıl kadar devam eden bu dönemde biyolojik sistemler, ekmek, peynir, alkol, çeşitli alkollü içkiler, sirke, yoğurt gibi maddelerin üretilmesinde fazlaca kullanılmıştır. Bu nedenle de bu periyot, '**Fermantasyon teknolojisi**' ağırlıklı olup buna yönelik üretimi kapsamaktadır.

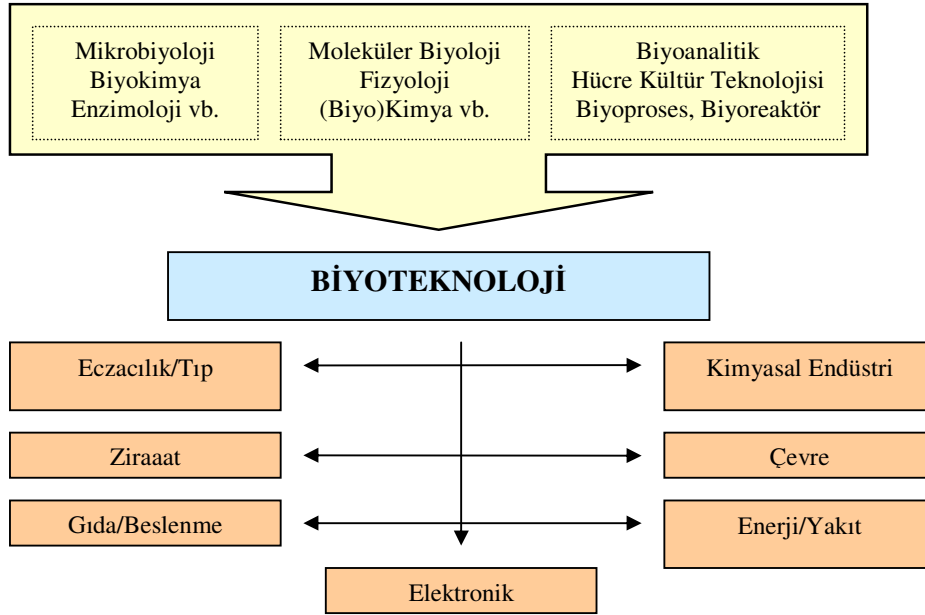
2) Modern Biyoteknoloji: Yenilikçiliğe (inovasyon) açık ve çok hızlı büyümesine karşın potansiyeli sınırsız, ancak moleküler biyolojide yapılan temel bilim araştırmalarına ve altyapısına sıkı sıkıya bağımlı bir teknolojidir. Genetik mühendisliği tekniklerinin kullanılarak biyolojik sistemlerin modifikasyona uğratıldığı (mutasyon ve rekombinant DNA teknolojisi) ve kan proteinleri, insan kanı serumu, insan hormonları, insülin, biyoteknolojik aşular gibi yararlı ürünlerin elde edilmesine olanak veren bir alandır (Tosun 2011). Mutasyonlar veya rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla

2. KAYNAK ÖZETLERİ

oluşturulan transgenik organizmalar, endüstride ve diğer alanlarda (mikrobiyoloji, biyoloji, biyokimya, insan ve hayvan sağlığı, hayvan ıslahı, ziraat, çevre vb.) çok fazla kullanılmaya başlanmıştır (DPT: 2515 - ÖİK: 533 2000).

Bu gelişmelere paralel olarak, biyoteknolojinin tanımında da değişiklikler yapılmıştır. 2009 yılında Türkiye'nin de üyesi olduğu OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development)'nin raporunda biyoteknoloji "Bilgi, mal ve hizmetin üretimi için yaşayan ve yaşamayan materyalleri değiştirmek amacıyla bilim ve teknolojinin yaşayan organizmalara, parçalarına, ürünlerine ve modellerine uygulanması" şeklinde tanımlanmıştır (Beuzekom ve Arundel 2009).

Teorik olarak tüm canlı grupları arasında gen aktarımını mümkün kılabilen biyoteknolojinin tıp, endüstri, madencilik, çevre, balıkçılık, ormancılık, tarım ve hayvancılık gibi çeşitli sektörlerde uygulamaları bulunmaktadır ve bu alanlar Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Akman 2007).



Şekil 2.1. Biyoteknolojinin uygulama alanları

Günümüzde biyoteknolojinin etkin olduğu dört temel sektörel alan bulunmaktadır. Bunlar:

- ★ Tıp alanındaki biyoteknolojik uygulamalar,
- ★ Tarımsal alandaki biyoteknolojik uygulamalar,

- ★ Çevresel alandaki biyoteknolojik uygulamalar,
- ★ Endüstriyel alandaki biyoteknolojik uygulamalardır (Sürmeli 2008).

Modern biyoteknoloji dört teknolojik sistemden oluşmaktadır. Bunlar; genetik mühendisliği, hücre mühendisliği, enzim mühendisliği ve fermantasyon mühendisliğidir. Genetik mühendisliği ve hücre mühendisliği biyoteknolojideki en yeni ilerlemelerdir (Akman 2007).

Modern biyoteknoloji teknikleri ile:

- ★ Organizmanın yaşamı için gerekli bütün bilgilerin toplandığı ve kodlandığı genom kitaplığının = bankalarının kurulması, oluşan bankalardan arzu edilen genin izolasyonunun ve nükleotid dizisinin saptanması ve bu dizilerde değişiklikler yapılması veya başka organizmalara aktarılması, gen regülasyonunun saptanması ve hibrid hücreler elde edilmesi,
- ★ Biyoteknolojik aşılarda, proteinler, enzimler, antibiyotikler, hormonlar, sitokinler, monoklonal antikorlar, teşhis koruma ve tedavi araştırmalarında kullanılan diagnostik maddelerin ve kimyasalların üretilmesi ve
- ★ Doğal koşullar altında ancak yüz binlerce yıl içinde meydana gelebilecek mutasyonları kısa sürede oluşturmak mümkün olmaktadır (http://www.deu.edu.tr/UploadedFiles/Birimler/16928/rekombinant_dna_tek_vektorler.pdf).

Genelde biyoteknoloji olarak adlandırılan ve klasik biyoteknolojiden modern biyoteknolojik yöntemlere kadar uzanan ve gittikçe karmaşıklık düzeyi artan bu teknolojiler ülkelerin bilim ve teknolojiye gelişmişlik durumlarına göre tarımda farklı düzeylerde kullanılmaktadır.

2.2. Gen Mühendisliği ve Rekombinant DNA Teknolojisi

Yaşayan organizmaların özelliklerinin genler tarafından belirlendiğinin anlaşılması, onları değiştirme şansının bitki ve hayvan ıslah programlarının çok ötesine geçmesinin yolunu açtı. Her organizmayı onu daha yararlı hale getirecek özelliklerle donatabilme mümkün oldu (Hart-Davis 2011). Genetik mühendisliği, organizmaların nükleik asit manipülasyonunu vurgulayan geniş bir terimdir. İstenen bir etki için genleri yapay

olarak değişikliğe uğratılmış organizmalar genellikle genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) olarak adlandırılır. Rekombinant DNA teknolojisi (rDNA), bir organizmadan bilinen bir DNA dizisinin kesilmesi, başka bir organizmaya aktarılması ve böylece alıcının genotipinin (dolayısıyla fenotipi) değiştirilmesi teknolojisidir. Yabancı genin bir vektör DNA aracılığıyla başka bir organizmaya aktarılıp çoğaltılmasına klonlama da denir (Sridhar 2006).

Genetik mühendisliği için, rekombinant DNA teknolojisi, gen klonlaması, DNA klonlaması, genetik manüplasyon/modifikasyon veya gen ekleme (splays) birçok bilim insanınca eş anlamlı olarak kullanılabilir. 1970'li yılların başlarına kadar DNA, biyokimyacılar için incelenmesi en güç hücresel moleküldü. Organizmalarda genetik materyali oluşturan, son derece uzun, kimyasal açıdan değişiklik göstermeyen bu nükleotid dizisi sadece dolaylı olarak, protein ve RNA dizisinin belirlenmesi ya da genetik analiz yoluyla incelenebilmekteydi (Alberts ve ark. 2003). Rekombinant DNA teknolojisi özellikle 1960'lı yılların sonlarına doğru DNA ile ilgili bazı enzimlerin etki mekanizmalarının anlaşılması sayesinde gerçekleştirilen bir dizi yöntemleri kapsamaktadır. Bununla birlikte 1940'lardan 70'lere kadar moleküler biyolojinin gelişmesini sağlayan bilgi birikimi de rekombinant DNA teknolojisinin temelini oluşturmuştur (Soysal 2012). 1970 yılında restriksiyon enzimlerinin keşfi ile birlikte rekombinant DNA teorisi gerçek oldu. DNA'yı kuşatan virüslerden kesmek için bakteri bu enzimleri üretir, ama konvansiyonel sindirim enzimlerinin tersine bunlar DNA'yı belirli pozisyonlardan keser. Bu özellikleri genetik mühendisliğinde kullanılmalarının en önemli nedeni olmuştur (Hart-Davis 2011).

Rekombinant DNA teknolojisi kimi yeni, kimi mikrobiyoloji genetiği gibi başka alanlardan alınan çok sayıda yöntemi kapsar. Bu teknolojinin temelini aşağıda belirtilen anahtar yöntemler oluşturur:

1. DNA'nın restriksiyon nükleazları (RE) yardımıyla belirli bölgelerden kesilmesi, genlerin ayrıştırılmasını ve üzerinde değişiklikler yapılmasını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır,
2. Klonlama taşıtları ya da tek bir DNA molekülünün birbirinin aynı milyonlarca molekül oluşturacak şekilde kopyalanmasına olanak veren polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla yapılan DNA klonlama,

3. Tamamlayıcı nükleik asit dizisine bağlanma özelliğinden dolayı belirli bir DNA veya RNA dizisini büyük duyarlıkla saptamaya olanak veren nükleik asit melezleme,
4. Saflaştırılan bir DNA parçasındaki tüm nükleotid dizisinin hızlı bir şekilde belirlenmesi sayesinde genleri ve bunların kodladığı proteinlerin aminoasit dizisini belirleme,
5. Onbinlerce melezleme reaksiyonunun aynı anda gerçekleştirilmesine olanak veren nükleik asit mikrodizinler sayesinde hücredeki bütün genlerin ifadesinin aynı anda izlenebilmesidir (Alberts ve ark. 2003).

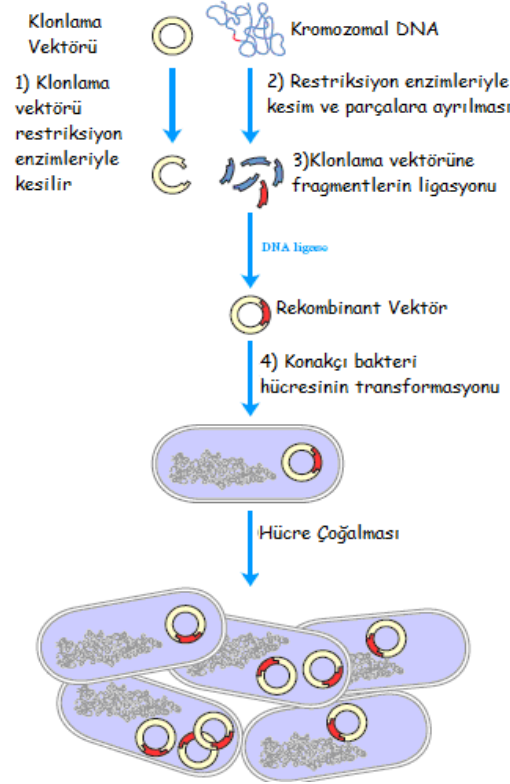
Transgenik teknolojilerin uygulanması sırasında, bir veya daha çok gen ve gen parçasının aktarımı söz konusudur. Gen aktarımında aynı türden bir başka canlıdan alınan ve istenen bir özelliği taşıyan yeni bir gen aktarılabilmektedir (Sürmeli 2008).

DNA ile ilgili işlemler onun izolasyonu, çoğaltılması, diziliş sırasının analizi, belli yabancı DNA'nın plazmit ya da faj gibi taşıyıcı (=vektör) aracılığı ile prokaryot ya da ökaryot konak hücreye sokulması ve faaliyetinin temini (yani transkripsiyon ve translasyon sürecinden sonra proteine dönüşme şeklinde) olarak gruplanabilir. Yabancı DNA çoğaltılıp saflaştırılır ve DNA diziliş sırası belirlenir. Yabancı DNA'nın gen ürünü büyük ölçülerde protein olarak üretilmek suretiyle sağlandığında işlem tamamlanmış olur (Soysal 2012).

Rekombinant DNA teknolojisinde izlenen olayların sırası Şekil 2.2'de özetlenmiştir;

1. Doku ya da hücrelerden DNA izole edilmesi
2. Bu DNA moleküllerinin RE ile tanıma bölgelerinden kesilmesi
3. RE ile işlem görmüş DNA moleküllerinin vektör adı verilen taşıyıcı moleküllere yüklenmesi
4. Vektör ve taşıdığı molekülün (bu birliktelik rDNA molekülüdür) faaliyet göstereceği konakçı hücreye nakli
5. Konakçı hücre ve kendi genomu çoğalırken bu arada aktarılan DNA da çoğalacağından DNA molekülünün klonlanmasının sağlanması
6. Klonlanmış DNA'nın konakçı hücreden izole edilip incelenmesi

7. Klonlanmış DNA'nın gen ürününün elde edilmesi. Klonlanmış DNA transkripsiyona uğrayabilir ve mRNA'sı translasyona yönlendirilebilir. Böylece gen ürünü izole edilebilir ve araştırma ya da ticari amaçlar için kullanılır.



Şekil 2.2. Rekombinant DNA teknolojisinde izlenen olaylar (Nelson ve Cox 2005)

Biyoteknolojide genetik mühendisliği ticari amaçlar için kullanılmaktadır. Örneğin, yararlı bir proteini fazla miktarda üretmek, yeni aşular geliştirmek, ya da istenen bir geni bitki ya da hayvana aktarmak amaçlanabilir. Bu durumda kullanılacak konak seçimi oldukça önemlidir, bu aynı zamanda vektör seçimini de etkilemektedir. Yüksek miktarlarda klonlanmış DNA elde etmek için, ideal bir konak pahalı olmayan bir kültür ortamında hızlı bir şekilde büyüebilmelidir. Ayrıca, konak patojen olmamalı, DNA'yı içine alabilmeli, kültürü esnasında genetik olarak kararlı olmalı ve vektörün replikasyonunu yürütebilecek uygun enzimlere sahip olmalıdır (Madigan ve Martinko 2010).

Klonlama çalışmalarında yaygın kullanılan konakçı hücre *Escherichia coli*'dir. *E.coli*'de ekspresyon hızlıdır, ucuzdur, ölçeklenebilirdir ve minimal post-translasyonel modifikasyonlar *E. coli*'den saflaştırılan proteinleri yapısal çalışmalar için nispeten

homojen ve çok arzu edilen hale getirir (Hartley 2006). *E.coli*'nin ortalama bir geni 1-2 kbç, genomu ise 4600 kbç büyüklüğündedir. Bundan dolayı *E.coli*'deki ortalama bir gen, hücrenin toplam DNA'sının %0.05'inden daha küçük bir kısmını kapsar. İlgilenilen gen, replikasyon araştırmacıları tarafından kontrol edilebilirse, parçanın bütününe kopyalamak mümkündür. Dolayısıyla, moleküler klonlama çalışmalarında istenilen geni büyük ve kompleks bir genomdan basit ve küçük bir genoma aktarmaktır. *E.coli* kromozomu dizisi saptanan ilk prokaryot kromozomları arasında yer almamasına rağmen, bu organizma en iyi karakterize edilen organizma olarak kalmaya devam etmektedir (Madigan ve Martinko 2010). Ayrıca iyi karakterize edilmiş çok sayıda mutantlarının var olması ve gen regülasyonunun anlaşılabilir olması klonlama çalışmalarında tercih edilme sebeplerindedir (Cooper ve Hausman 2006, Primrose ve ark. 2001).

Rekombinant DNA teknolojisinin ve klonlamanın gelişmesinde önemli adımlardan birisi restriksiyon enzimlerinin bulunması ve özelliklerinin ortaya konulmasıdır. Konak kontrollü kesim (host-controlled restriction) olarak anılan bazı bakteri soylarının bakteriyofaj enfeksiyonuna bağışık olduğunun gösterimi 1950'lerin başlarında yapılmıştır. Kesim mekanizması çok karmaşık olmasına rağmen yine de tam olarak açıklanması 20 yıl sürmüştür (Brown 2009). 1972'de Stanford Üniversitesinde bu enzimler kullanılarak ilk rekombinant DNA molekülü elde edilmiştir.

Restriksiyon enzimleriyle yapılan kesimin tam doğası bir gen klonlama deneyinin tasarlanmasında oldukça önemlidir. Restriksiyon enzimleri virüs istilasına cevap olarak bakterilerce sentezlenir ve bilinen 1200'ün üzerinde enzim tanımlanmıştır (Brown 2009).

Rekombinant DNA teknolojisinde veya diğer genetik manipulasyonlarla ve biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmak üzere bakterilerden elde edilmiş çok sayıda Tip II restriksiyon enzimi bulunmaktadır. Çizelge 2.1'de klonlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Tip II restriksiyon endonükleazlar elde edildikleri mikroorganizmalar ve tanıma dizileri belirtilmiştir.

Farklı bakteri türleri farklı virüs istilalarına cevap olarak farklı restriksiyon nükleazları üretirler. DNA'yı kesen bu enzimler izole edildikleri bakterilere göre isimlendirilirler. Her nükleaz dört ile sekiz nükleotidlik özel bir DNA dizisini tanır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bakteri genomunda bulunan benzer nükleotidlerden oluşan dizilerdeki A veya C birimlerinin metillenmesi bakteri genomunu kesilmekten korur. Yabancı DNA'lardaki diziler genelde metillenmediğinden restriksiyon nükleazları kesilir. Bazı restriksiyon nükleazları DNA'nın iki ipliğini farklı noktalardan keserek parçacıkların uçlarında tek iplikten oluşan uzantılar kalmasına neden olur. Her uzantı aynı enzim ile kesilen diğer uçlardan birindeki tamamlayıcı uzantılar ile birleşebildiğinden bu türden uçlara "yapışkan uçlar" adı verilir. Bu yapışkan uçlar başka enzim tarafından kesilmiş olmak koşuluyla, herhangi iki DNA parçasığının birbiri ile kolayca birleşmesine olanak verir (Alberts ve ark. 2003).

Çizelge 2.1. Tip II restriksiyon enzimleri

Enzim	Organizma	Tanma Dizisi	Küt veya Yapışkan Uç
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Yapışkan
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	Yapışkan
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	Yapışkan
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	Yapışkan
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	Küt
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	AAGCTT	Yapışkan
<i>HinI</i>	<i>Haemophilus influenzae Rf</i>	GANTC	Yapışkan
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	Yapışkan
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGTC	Küt
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	Yapışkan
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	Küt
<i>NorI</i>	<i>Nocardia otitis-cavarium</i>	GCGGCCGC	Yapışkan
<i>SfiI</i>	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	GGCCNNNNNGGCC	Yapışkan

Gösterilen dizi 5' ile 3' yönünde verilen bir ipliğindir. Hemen hemen tüm tanıma dizileri tersinden de aynı şekilde okunabilir (palindrom) (Weaver 2004, Nelson ve Cox 2005, Cooper ve Hausman 2006, Kuk ve Erensoy 2008, Brown 2009, Lodish ve ark. 2011).

Kopyalanacak olan DNA parçaları konak hücresine doğrudan giremezler. Ancak, restriksiyon enzimiyle kesilmiş bir DNA parçası "vektör" adı verilen başka bir DNA molekülü ile birleşirse konak hücreye girebilir. Vektörler, konakçı organizma, konakçı organizmadan bağımsız olarak replikasyon (çoğalma) gösterirler. Çizelge 2.2'de klonlama çalışmalarında en yaygın kullanılan vektörler ve kullanım alanları belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Klonlamada kullanılan vektörler (Mullis 1990)			
Vektör	Açıklama	İnsertin büyüklük sınırı	Kullanım alanı
Plazmit	Doğal olarak oluşan çoklu kopyalı plazmitler	< 10 kb	cDNA klonlama ve ekspresyon deneyleri
Faj	Bakteriyofaj λ	5-20 kb	Genomik DNA klonlama, cDNA klonlama ve ekspresyon kütüphaneleri
Cosmid	λ <i>cos</i> bölgesi içeren bakteriyofaj içeren plazmit	35-45 kb	Genomik kütüphane oluşturma
BAC	<i>E.coli</i> F faktör plazmit	75-300 kb	Büyük genomların analizi
YAC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sentromer, telomer ve kendiliğinden replike olan diziler	100-1000 kb	Büyük genomların analizi
MAC	Memeli sentromer, telomer ve replikasyon orjini	100 kb'den >1 mb	Gen terapisinde ve hayvan biyoteknolojisinde kullanım için geliştirilmekte

En basit klonlama vektörleri ve gen klonlanmasında en yaygın kullanılanları, küçük bakteri plazmitlerine dayalı olanlardır. Plazmitler konak kromozomundan bağımsız olarak replikasyon yaparlar. Rekombinant enzim üretiminde ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan birçok bakteriyel plazmit bulunmaktadır. Çoğu ticari firmalardan elde edilebilen çok sayıda farklı plazmit vektörleri *E.coli*'de kullanıma uygundur. Bu plazmitler yüksek transformasyon etkinliği, transformantları kolayca seçilebilen belirteçler ve makul büyüklükte DNA parçalarını (8 kb kadar büyük) klonlayabilme gibi arzu edilen özelliklerde kolay saflaştırmayı bir arada taşırlar (Brown 2009).

Bir DNA molekülünün vektör olarak kullanılabilmesi için birtakım özelliklere sahip olması gerekir;

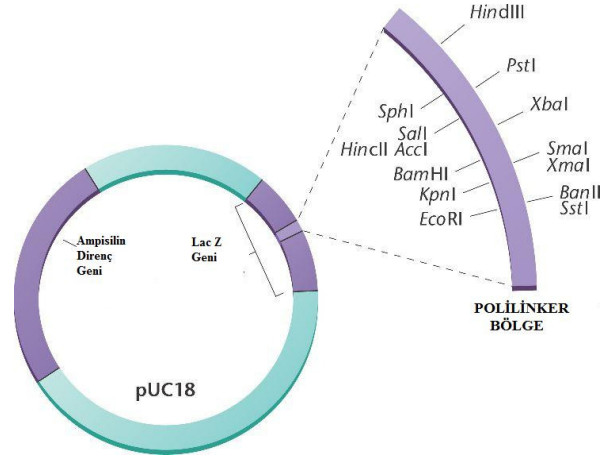
- ★ Kendini ve taşıdığı herhangi bir DNA parçasını bağımsız olarak replike edebilmelidir.
- ★ Klonlanacak DNA parçasının insersiyonuna olanak tanıyan birçok RE tanıma dizisi içermelidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

- ★ Vektörde seçicilik sağlayan “marker genler” bulunmalıdır. Bunlar, vektör taşıyan ve taşımayan konak hücreleri ayırmak için gereklidir.
- ★ Vektör ve vektörün taşıdığı DNA parçası konaktan kolaylıkla ayrıştırılabilmelidir.
- ★ Çoklu kopya halinde bulunabilmelidir.
- ★ Plazmit içeren klonların saptanmasını ve seçilmesini kolaylaştırmak için antibiyotik direnç genleri gibi seçilebilir işaretlerinin bulunması gereklidir.

Vektör olarak en yaygın olarak kullanılan plazmitler pBR322, pUC18, pUC19 ve pUB110'dur. pBR322 plazmiti kısmen genetik mühendisliği ürünü olan ilk nesil klonlama vektörlerini temsil eder. Günümüzde yeni nesil plazmit vektörleri klonlama özellikleri ve kullanım kolaylığı açısından daha üstündürler (Madigan ve Martinko 2010). pUC18 ve pUC19 plazmitleri *E. coli*'de klonlama işlemleri için geliştirilmiştir (Çerçi ve ark. 2011). Gen klonlaması çalışmalarında göz önünde bulundurulması gereken en önemli konulardan birisi de maliyet hesaplarıdır. pUC tabanlı veya pCI-neo gibi mini-prep yapılarak plazmit DNA'sı elde edilmesine olanak sağlayan vektörler düşük maliyetleri ile özellikle yeni kurulan laboratuvarlar için önemli olmaktadır (Kuk ve Erensoy 2008).

pUC18 ve pUC19 plazmitleri küçüktür (2686bp) ve bu nedenle daha büyük insert DNA parçalarını taşıyabilir. İnsert DNA'nın hücre başına 500 kadar kopyasını oluşturabilir. pUC18 ve pUC19 plazmitlerine kazandırılan yeni özellikler arasında çoklu klonlama bölgesi (polilinker) içermesidir (Şekil 2.3). Bu kısa DNA bölgesinde çeşitli restriksiyon enzimleri için çok sayıda kesme bölgesi içerir ama vektörün polilinker kısmında bu enzimlerin her biri için sadece bir tanıma bölgesi vardır. Bu polilinker, bir genin insersiyon ile inaktivasyon takibinin kolay olduğu kodlama bölgesinde bulunur (Madigan ve Martinko 2010). Polilinker bölge, *E.coli*'nin lacZ geni içerisinde yer almaktadır. Polilinker bölgeye sokulan DNA, lacZ geninin bozulmasına sebep olarak beyaz bakteri kolonilerinin oluşmasını ve dolayısıyla rekombinant DNA'yı taşıyan hücrelerin kolaylıkla tanınmasını sağlamaktadır (Kuk ve Erensoy 2008). Bu tür plazmitler, bakteri konak hücresine bir kere girince, kopya sayılarını binlerce kopya olacak şekilde artırırlar (Madigan ve Martinko 2010).



Şekil 2.3. pUC18 Plazmitinin yapısı (Klug ve Cummings 2000)

Gen klonlaması çalışmalarında plazmitler kullanıldığında, klasik olarak genler genomik DNA veya mRNA'dan izole edilerek Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmakta, gen ve genin yerleştirileceği plazmit bir veya daha fazla enzim ile kesilerek *in vitro* şartlarda genin plazmite yerleştirilmesi sağlanmaktadır (Kuk ve Erensoy 2008).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir DNA molekülünün seçilen bir bölgesinin seçici çoğaltımına denir. PCR, 1985'de Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Bu buluşundan dolayı Kary Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülüne hak kazanmıştır. Bu yöntem bilim dünyasına sunulduğundan itibaren hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir çığır açmıştır. Biyolojik ve tıbbi araştırmaların gelişimine PCR'ın etkisi oldukça fazladır. Yöntem, gen ve genom çalışmalarında önemli bir artışa neden olmuştur. PCR kullanarak herhangi bir organizmadan herhangi bir gen izole etmek mümkündür (Atasoy Ulusoy ve Görgül 2006).

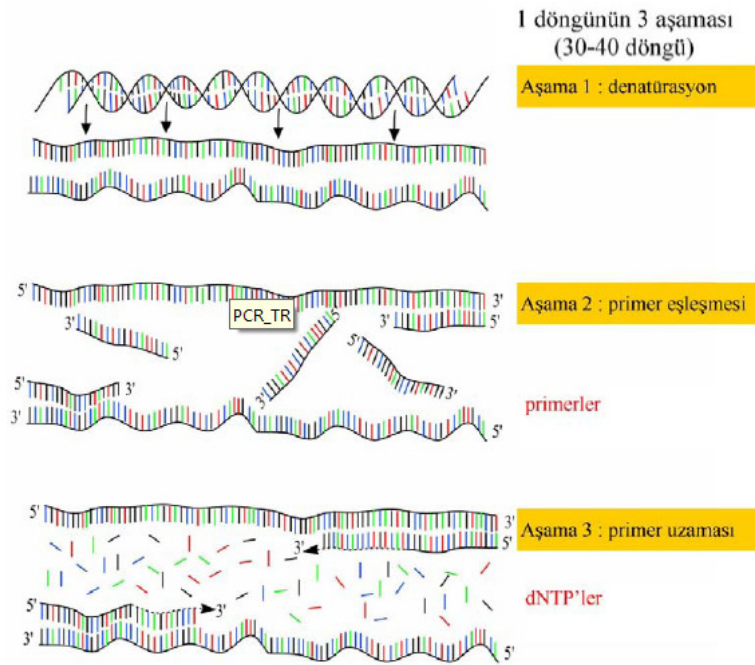
PCR bir çeşit "*in vitro* klonlama"dır. PCR başlıca üç adımdan oluşur (Şekil 2.4):

1. Denatürasyon: DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasına (94°C-98°C)
2. Primer eşleşmesi: Sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasına (37°C-65°C)
3. Primer uzaması: Çift iplikçikli DNA'ların sentezi (72°C) ve bu döngünün

belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır.

Üç basamaktan (denatürasyon, primer eşleşmesi, primer uzaması) oluşan işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır (Yılmaz ve Devran 2003).

PCR tekniği tek veya çift iplikçikli DNA'yı ve RNA'yı hedef olarak kullanabilir. Çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağladığı için laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanmıştır. Birçok durumda radyoaktivite kullanımını gereksiz hale gelmiştir.



Şekil 2.4. PCR çoğalmasının basamakları (Vierstraete 1999)

PCR teknolojisi için:

- ★ DNA örneği, genelde genomik DNA (bölgenin sınırlarındaki diziler bilindiği sürece herhangi bir DNA molekülünün herhangi bir bölgesi seçilebilir),
- ★ Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer (çoğaltılacak bölgeyi sınırlayan oligonükleotidlerdir),
- ★ dNTP'ler (A, T, C, G),

- ★ Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi (genellikle *Thermus aquaticus*'un DNA polimeraz I enzimi ile yapılır) ve
- ★ Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı gereklidir.

PCR sonucunda reaksiyon karışımının bir örneği, çoğaltılan DNA'nın etidyum bromür ile floresan olarak boyanmasından sonra belirgin bir bant olarak görünebilmesi için genellikle agaroz jel elektroforezi ile analiz edilir.

Primer dizaynı yapacağımız uygulamaya bağlı olup PCR ve hibridizasyonu yapılacak hedef dizinin bilinmesi gereklidir. Primer seçiminde dikkat edilmesi gereken genel kurallar aşağıdaki gibidir:

- ★ Uzunluğu 18-22 bp arasında olmalıdır.
- ★ Erime ısıları (Melting temperatures: T_m) birbirine olabildiğince yakın olmalıdır. 52-58°C en iyi erime ısıdır.

T_m değeri basit bir formülle hesaplanmaktadır:

$$T_m = (4X[G+C]) + (2X[A+T])^\circ C$$

- ★ GC içeriği %40 ile %60 arasında olmalıdır.
- ★ Guanin-Sitozin (G-C) tekrarı dört bç'den fazla olmamalıdır.
- ★ Kendi içerisinde homoloji göstermemeli; özellikle 3' ucunun primer-dimer formasyonundan kaçınılmalıdır.
- ★ Toka (loop), kendinden dimer ve çapraz dimer oluşturmamalıdır (Primer Biosoft 2010)

Tasarlanan primer dizisinin özgünlüğü www.ncbi.nlm.nih.gov veya www.embl-heidelberg.de. internet adreslerinden ulaşılabilen BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı ile GenBank veya EMBL'de bilinen DNA dizileriyle karşılaştırılarak hangi dizilerle homolojisinin olduğu kontrol edilerek test edilmelidir.

2.3. Enzimler ve Enzim Teknolojisi

Enzimler, çoğu protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir ve bu nedenle yaşamı olası kılan etmenlerin başında gelmektedir. Bu nedenle enzim teknolojisi, biyoteknoloji ve moleküler biyolojinin en önemli alt çalışma alanlarından birisini oluşturmaktadır.

Yüksek katalitik aktivite göstermeleri, yüksek derecede substrat özgünlüğüne sahip olmaları, büyük miktarlarda üretilibilmeleri ve ekonomik değere sahip olmaları açısından geleneksel kimyasal katalizörlerden üstün avantajlara sahiptirler. Enzimlerin yapı fonksiyonlarını, kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen, enzimolojinin başlangıcı 19. y.y'dan daha önceki tarihlere dayanır. Fakat önemli bilimsel gelişmeler son 40 yılda gerçekleşmiştir (Çelik 2006). Biyoteknolojide ve endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler yeni değildir. Enzimlerin ilk kullanımı antik dönemlere dayanmakta olup, yoğurt, peynir, ekmek, bira, şarap gibi gıdaların üretiminde kullanılmaktaydı (Primose ve ark. 2001). Modern üretim tekniklerinin devreye girmesiyle enzim endüstrisi son yarım yüzyılda büyük bir gelişim göstermiştir.

OECD tarafından 2002 yılında yayınlanan raporda, biyoteknolojik işlemler sürdürülebilirliği ve maliyeti bakımından sanayideki kullanımı açısından değerlendirilmiştir. Yapılan ve incelenen çalışmalarda, enzime dayalı süreçlerin enerji ve ham madde kaybını %9-90 oranında azalttığı belirtilmiştir (Beilen ve Li 2002). Buna paralel olarak enzim biyoteknolojisi de önemli aşamalar kaydederek, endüstriyel öneme sahip enzimlerin daha saf, ucuz ve bol miktarda üretilmelerine olanak tanımıştır (Özcan 2005).

Enzimlerin bu şekilde endüstriyel süreçlerde kullanılmaları topluca enzim teknolojisi olarak adlandırılır. Enzim teknolojisi, mikrobiyal işlemler (üretici suşların seçimi, geliştirilmesi vb.), enzimlerin fermentasyon yoluyla üretimleri (büyük ölçekte üretimi için yapılan besiyeri, ortam koşulları vb. düzeylerdeki optimizasyonlar), katalitik etkinliğin artırılması için enzimlerin üç boyutlu yapılarının değiştirilmesi (protein mühendisliği), izolasyonları ve immobilizasyonları (enzimlerin çözünmeyen destek materyaller yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmesi) çalışmalarını kapsar (Çelik 2006).

Enzimler, enzimatik süreçlerin çevre kirliliğine daha az yol açmaları, kimyasal süreçleri daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirebilmeleri sebebi ile günümüzde her geçen gün daha da artarak birçok endüstri alanında kimyasal süreçlerin yerini almaktadır (Öztürk 2007). Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte, ağırlıklı olarak

mikroorganizmalardan izole edilmektedirler (Kıran 2003, Kıran ve ark. 2006).

Enzimler *in vitro* koşullarda da katalitik aktivite gösterdiklerinden, mikroorganizmaların bu proteinleri bol miktarda üretmeleri sonucu izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilirler (Çelik 2006). Enzimlerin teknoloji ve sanayide kullanımı için saflaştırılması gerekmektedir. Bu süreçte de gerek kolay üreyebilmeleri gerekse ürettikleri enzimlerin diğer organizmalara oranla daha kolay saflaştırılmaları nedeni ile biyoteknolojik süreçlerde mikroorganizmalar temel enzim kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır (Öztürk 2003).

Bugüne kadar tanımlanan enzimlerin büyük çoğunluğu düşük sıcaklıkta ve dar bir pH aralığında çalışmaktadır ve bu nedenle endüstrinin tercih ettiği geniş pH aralığı ve yüksek sıcaklık koşullarında kullanılamamaktadır. Bu durum da endüstriyel talebi karşılayabilecek nitelikte yeni enzimlerin ve bu enzimleri üretebilecek mikroorganizmaların bulunmasını teşvik etmektedir (Öztürk 2003). Mezofilik enzimlerin endüstride kullanımının en büyük dezavantajı olarak termostabilitenin olmaması ile çalışmalar bu enzimlerin sadece mezofilik enzimlerin protein ve genetik mühendisliği veya kimyasal anlamda stabilize edilmesi değil, aynı zamanda tamamen insan yapımı katalistlerin geliştirilmesi yönünde de olmuştur (Sarıgül 2007).

Termofilik ve hipertermofilik enzimler (termozimler) ekstreozimlerin bir üyesidirler. Ekstreozim grubu enzimler; yüksek sıcaklık, yüksek tuz seviyelerinde, yüksek alkali koşullarında ve basınç, yüksek asidite gibi diğer ekstrem koşullar altında işlev gösterebilirler (Nielsen 2000, Vieille 2001, Corderio 2002, Arıkan 2008). Termostabil proteinler değişik denatüre şartlara yüksek tolerans göstermektedirler. Bu proteinler mezofilik proteinlere nazaran daha yüksek α -heliks ve β -tabakası içeriğine sahiptirler. Ayrıca bu proteinler çok yavaş katlanma hızı göstermektedirler. Bu özelliğin değişik denatüre şartlarda doğal yapıyı korumada önemli olduğu sanılmaktadır (Fujiwara 2002, Haki ve Rakshit 2003, Van Den Burg 2003).

Termofilik mikroorganizmalarda yüksek sıcaklıklarda proteinlerin stabilitesini sağlayan mekanizmalar mevcuttur:

1. Yapıdaki tek bir aminoasidin değiştirilmesi ile: *E. coli*'nin triptofan sentetaz enziminin termostabilitesi glutamatın metioninle yer değiştirmesi ile artar.

2. Büyüme sıcaklığı: *Bacillus flavothermus*'da alanin dehidrogenazın ısıl stabilitesi büyüme sıcaklığına bağlı olarak artar.
3. İnternal iyonik bağların artması yüksek sıcaklıklarda proteinlerin stabilitesinin artmasını sağlar.
4. Yüksek sıcaklıklarda sentezlenen enzimler birkaç saat için aktiftirler. Oysa termotoleransı yüksek olmayan türlerde termotoleransı oldukça yüksek olan enzimler bulunabilir. *Bacillus licheniformis*'in maksimum büyüme sıcaklığı 55°C iken bu bakteriden izole edilen ve nişasta endüstrisinde kullanılan α -amilaz 90-95°C'de aktiftir.
5. Bazı enzimler substrat ya da efektör moleküllerle stabil edilebilir. *Bacillus stearothermophilus*'tan izole edilen glutamat sentetaz normal şartlarda 65°C'de inaktif iken, amonyak, glutamat ve ATP varlığında bu sıcaklık derecesinde aktiftir.
6. Metaller genellikle yüksek sıcaklıklarda proteinleri stabilize eder ve pek çok durumda da aktivite için gereklidir.
7. Pek çok fungusta polihidrik alkoller proteinlerin termostabilitesini artırır.
8. Polimerik materyallerle kovalent bağlanma ya da kimyasal ajanlarla protein yüzeyinin kimyasal modifikasyona uğratılması ile termostabilite sağlanabilir.
9. Düşük su aktivitesi, yüksek substrat spesifitesi ve yüksek K_m değerlerine sahip olan termofilik bazı enzimler bu özellikleri ile mezofilik olanlardan ayrılırlar (Coolbear ve ark. 1992).

Termal stabilite için ön görülen mekanizmalarda amino asit içeriği de önemli rol oynamaktadır. Termofilik ve mezofilik ferrodoksin, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz moleküllerinin amino asit dizileri karşılaştırıldığında; mezofilik olanlarda bulunan Gly, Ser, Lys, ve Asp yerine termofilik olanlarda sırası ile Ala, Ala, Thr, Arg ve Glu'nun bulunduğu saptanmıştır. Bu yer değiştirme, iç kısımlarda hidrofobik etkileşimlerin artışına, dış kısımlarda azalışına ve helikslerdeki heliks-stabilize eden kalıntılarda artışa neden olmaktadır. Bu durum aynı zamanda DNA'nın yapısındaki toplam guanin ve sitozin oranındaki artışa da neden olmaktadır. Glisin amino asitinde diğer amino asitlerle kıyaslandığında bir β -karbon atomu eksiktir ve

daha yüksek konformasyonel esnekliğe sahiptir. Bu nedenle glisin ile herhangi bir başka aminoasitin yer değiştirmesi katlanma sırasındaki serbest enerji değişimini dūřürür. Benzer şekilde prolin kalıntıları katlanma sırasında, prolin halkası diğer aminoasit kalıntularından daha az konformasyona izin verdiği için, serbest enerji değişimlerinde artışa neden olur (Williams ve Sharp 1995).

Mezofilik ve termofilik enzimlerle yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, termal stabilite ile yüksek arginin miktarı arasında doğru orantı olduğunu göstermiştir. Termofillerde arginin/lisin oranı genellikle “1”den yüksektir. Protein yüzeyindeki arginin molekülleri suyu çekerek sabit bir su ceketini oluştururlar ve bu ceket bir solvent içinde yapıyı destekler ve bu şekilde denatürasyondan korunmaya yardımcı olur. Termofilik proteinlerin yapısında S-S bağları içeren sistein, mezofilik proteinlerden daha yüksek oranda bulunmaktadır (Williams ve Sharp 1995).

Enzimlerin birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanmasından dolayı, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır (Alagöz 2007). Enzimlerin etkili katalitik özellikleri, çeşitli sanayi ürünleri ve süreçlerine girmesini sağlamıştır. Biyoteknolojideki son gelişmeler, özellikle protein mühendisliği ve yönlendirilmiş evrim gibi alanlarda, yeni ve verimli enzimlerin gelişmesi için önemli araçları sağlamaktadır. Bu enzimlerin geliştirilmesi teknik uygulamalarda ve tamamen yeni alanlar için özel olarak yeni enzimlerin üretimiyle sonuçlanmaktadır (Kirk 2002).

Termofilik enzimler kimyasal, gıda, ilaç, kağıt, tekstil ve diğer endüstrilerde kullanılmaktadır (Corderio 2002, Turner 2007). Çizelge 2.3'te farklı endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulama alanları gösterilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.3. Farklı endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler ve uygulama alanları (Madigan ve Martinko 2010)

Enzim	Uygulama alanı	Endüstri
Amilaz	Ekmek Nişasta kaplama Şurup ve glukoz üretimi Soğukta şişen çamaşır kolası Sindirime destek Haşıl sökme Kir giderimi, deterjanlar	Ekmek yapımı Kağıt Besin Nişasta İlaç Tekstil Çamaşır
Proteaz	Ekmek Leke giderimi Et yumuşatma Yara temizleme Haşıl giderme Ev deterjanları	Ekmek yapımı Kuru temizleme Et Tıp Tekstil Çamaşır
β -Galaktosidaz	Laktozun glukoz ve galaktoza yıkımı Mayanın geliştirilmesi Peynir altı suyunda yüksek oranda bulunan laktozun geri kazanılmasıyla ELISA testi Peynir suyundaki laktozun hidrolizi	Süthane, sağlığa yararlı besinler Fırıncılık Gıda Tıp Çevre
Pektinaz	Presleme, bulanıklığı giderme	Şarap, meyve suyu
Lipaz	Yağ yıkımı	Süthane, çamaşır
Selülaz	Kumaş yumuşatma, parlatma, deterjan	Çamaşır
Glukoz İzomeraz	Yüksek fruktoz-mısır şurubu	Alkolsüz içecekler

Enzim üretiminde mikroorganizmaların diğer organizmalara göre daha çok tercih edilmesinden dolayı, üretimi artırmak için modifiye edilmiş suşların kullanılması zorunlu hale gelmiştir ve genetik mühendisliği teknikleri ile rekombinant suşlar geliştirilerek enzim üretiminde kullanılmaya başlanmıştır (Glazer ve Nikaido 1995). Günümüzde gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerin çoğu rekombinant mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir ve enzim üreticileri yeni genetik tekniklerin avantajlarından yararlanmaktadırlar (Olempska-Beer ve ark. 2006).

2.4. Rekombinant Enzimler

Genetik mühendisliği birkaç yıldan beri umut veren bir teknolojiden milyarlarca dolarlık bir endüstriye dönüşmüştür. Bu büyüme özellikle enzim ve ilaç endüstrisinde yoğunluk kazanmaktadır (Nelson ve Cox 2005). Geleneksel olarak kültürleştirilebilir mikroorganizmalardan, bitkilerden ve memeli dokulardan elde edilen enzimler genellikle modern gıda üretimi yöntemlerinde kullanılan şartlara iyi uyarlanmış değildir. Rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı belirli gıda işleme koşullarına uygun yeni enzimlerin üretimini mümkün kılmıştır. Bu tür enzimler, çeşitli ortamlardan örneklenen mikroorganizmaların taranması suretiyle keşfedilebilir veya protein mühendisliği ya da moleküler evrimin modern yöntemlerini kullanarak bilinen enzimlerin modifikasyonu yoluyla geliştirilebilir. Rekombinant enzimler mikroorganizmalar, bitkiler veya hayvan dokusu dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan elde edilebilir (Olempska-Beer ve ark. 2006).

Enzimleri kodlayan genlerin klonlanması ve yüksek hacimde endüstriyel fermantasyon ortamlarına kolaylıkla uyum sağlayan konak mikroorganizmalarda bu enzimlerin ifade edilmesi sonucunda yüksek miktarda enzim elde edilebilmektedir. Mikrobiyal enzimler, doğal ya da rekombinant olsalar da kontrol altında tutulan koşullardaki fermantasyon işlemi ile üretilirler (Çerçi ve ark. 2011).

Çoğu durumda, biyoteknolojik uygulamalar sadece bir genin klonlanması ve tanımlanmasına bağlı değildir, aynı zamanda ifade edilecek genin ekspresyonunun manipülasyonuna ve kodladığı proteinin tanımlanmasına ve saflaştırılmasına da bağlıdır (Madigan ve Martinko 2010). Günümüzde üretilen rekombinant enzimlerin çoğu ekstraselülerdir ve rekombinant olarak üretilen enzimlerin saflaştırılması ile ilgili çalışmalar önem taşımaktadır.

2.5. *Bacillus* ve *Bacillus licheniformis*

Yaşam koşullarımızdan oldukça farklı şartlarda yaşayan ekstrem canlı gruplarından biri olan termofilik bakteriler son yıllarda yoğun ilgi duyulan araştırma odaklarından biri olmuştur. Pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkânsız olduğu sıcaklıklarda bile enzimlerini kullanabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri, araştırmacıları bu

konuda çalışmalar yapmaya yönelmiştir. *Bacillus* suşları, *Bacillaceae* familyasında aerob veya fakültatif anaerob koşullarda bölünebilir özelliğe sahip, endospor oluşturan çomak şekilli bakterilerdir (Veith 2004, Rey ve ark. 2004). *Bacillus* suşları ürettikleri enzimleri hücre dışına salgılama yeteneğinde olduklarından endüstriyel enzim üretiminde en çok kullanılan bakteri konumundadırlar. Patojen olmamaları ve endospor oluşturmaları bu bakterilerin tercih edilmesinin diğer önemli sebepleridir (Özcan 1996, Özcan ve Özcan 2001). Hemen hemen bütün doğal habitatlardan ve diğer pek çok kaynaktan izole edilebilirler. Yaygın olarak toprakta saprofit olarak ve bitki döküntülerinin olduğu yerlerde bulunurlar, fakat kutup bölgeleri, sıcak su kaynakları, kaplıcalar, tatlı su, deniz suyu, çöl toprakları da bu cinslerin yaşam alanlarındandır (Maugeri ve ark. 2001).

Bacillus cinsleri pek çok alanda kullanılmaktadır. Taşıdıkları fizyolojik özelliklerinden ve metabolitlerinden dolayı spesifik işlemlerde kullanılmaktadır. *Bacillus* türleri mikrobiyal fermantasyon işlemlerinde en çok kullanılan bakteriyel araç olmaya devam etmektedir. Farklı *Bacillus* türleriyle (termofillerin varlığıyla birlikte) asidik, nötral ve alkali pH aralıklarında, istenen sıcaklık, pH aktivitesi ve stabilite özelliklerine sahip yeni ticari enzimlerin geliştirilmesine yol açmıştır (Schallmey ve ark. 2004).

Enzimler, gıda proseslerinde, biyodönüşüm ve sentez, ekstraksiyonların geliştirilmesi, viskozitenin azaltılması ve tattaki değişimler gibi pek çok işlem için kullanılmaktadır. Gıda uygulamalarında kullanılacak olan enzimler GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak değerlendirilmiş kaynaklardan elde edilmelidir. Çünkü elde edilecek rekombinant enzimin üretiminde kullanılan konak organizmaların patojenik ve toksijenik potansiyelleri oldukça önemlidir (Çerçi 2011).

Çizelge 2.4. <i>Bacillus</i> spp. enzimlerinin endüstriyel uygulamaları (Schallmey ve ark. 2004)				
Endüstri (%)	<i>Bacillus</i> spp. enzimleri	<i>Bacillus</i> spp. suşları	Açıklama	Diğer enzimler
Deterjan (37)	Alkalın proteaz Alkalın amilaz	<i>B. clausii</i> , <i>B. myloliquefaciens</i> <i>B. halodurans</i> <i>B. licheniformis</i> , <i>B. halmपालus</i>	<i>Bacillus</i> proteazları baskın piyasadır, özellikle <i>B.clausii</i> 'den elde edilen yüksek alkali stabil proteazlar	Fungal lipaz ve proteazlar
Nişasta (13)	α -Amilaz Pullanaz Glukoz izomeraz	<i>B. licheniformis</i> <i>G. stearothermophilus</i> <i>B. acidipullulyticus</i> <i>B. deramificans</i>	Nişasta kalıntılarını uzaklaştırır	<i>Streptomyces</i> 'ta n glukoizomeraz ve glokoamilazlar
Tekstil (6)	Amilaz Pektat lizas, Mannanaz, Alkalın amilaz	<i>B. halodurans</i> <i>Bacillus</i> sp.	Haşıl uzaklaştırma Deri yumuşatma Kalıntıları uzaklaştırma	Fungal selülaz oksidaz
Sütçülük (14)	Belirtilmemiş	Dana veya fungal rennetler		
Fırıncılık (9)	Amilaz	<i>B. licheniformis</i>		
İçecek (6)	Amilaz	<i>B. licheniformis</i> , <i>G. stearothermophilus</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>		Çoğu enzim fungal

Yapılan çalışmalarda, enzim piyasasının yaklaşık %50'sini *Bacillus* spp.'den elde edilen enzimlerin oluşturduğu tahmin edilmektedir (Çizelge 2.4). Enzim piyasasını, bu enzimleri sağlayan üç öncül firmadan; %41-44 Novo Nordisk, %21 Genencor International ve %8 DSN N.V'nin oluşturduğu ve geriye kalan %27-30'unu Kuzey Amerika, Avrupa, Japonya ve Çin'deki küçük üreticilerin paylaştığı bildirilmektedir (Schallmey ve ark. 2004).

Bacillus spp.'den elde edilen metabolitlerden tıbbi, tarımsal ve eczacılık alanlarında kullanılan basitrasın, polimiksin, gramisidin gibi antibiyotikler elde edilmektedir. Ayrıca biyolojik insektisit olarak *Bacillus thuringiensis*, dünyada tahıl ürünlerindeki

haşerelerin kontrolünde kullanılmaktadır. Belirli böcek larvalarına karşı spesifik olduklarından, böceklerin güçlenmesini engeller ve toprakta aktif olarak kalarak diğer yaşam türlerine ve çevreye zarar vermezler (Yavuz 2003).

Endüstride kullanılan en yaygın basiller *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus subtilis*'tir (Sani ve ark. 1999). *B. licheniformis* büyük ölçekli endüstriyel uygulamalarda enzim üretiminde kullanımda ilgi çekmektedir (De Clerck ve De Vos 2004). *B. licheniformis* endospor oluşturan, genellikle toprakta yaşayan ve endüstriyel biyoteknolojide thermostabil amilaz, proteaz, β -laktamaz ve α -asetolaktat dekarboksilaz gibi önemli enzimlerin endüstriyel ölçekli üretimi, antibiyotik üretimi ve çeşitli organik metabolitlerin üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Schallmey ve ark 2004). Filogenisi şöyledir:

Domain: *Bacteria*

Şube: *Firmicutes*

Sınıf: *Bacilli*

Takım: *Bacillales*

Familya: *Bacillaceae*

Cins: *Bacillus*

Tür: *Bacillus licheniformis*

B. licheniformis, agardaki kolonileri düzensiz, yüzeyleri donuk olup ışığı geçirmezler. Saç benzeri dış gelişme yaygındır. Koloniler genellikle kuvvetli bir şekilde agara bağlıdır. Yeterli demir içeren karbonhidratlı besiyerinde birçok *B.licheniformis* suşu kırmızı pigment (tahminen pulcherrimin) oluşturur. Eski kültürlerin rengi kahverengiye dönük olabilmektedir. Taze olarak izole edilen suşlar gelişme faktörleri yokluğunda nitrojen kaynağı olarak amonyak varlığında gelişir. Sporları toprak içinde meydana gelir. Şiddetli ısı muamelesine rağmen uzun ömürlüdürler (Yılmaz 2002).

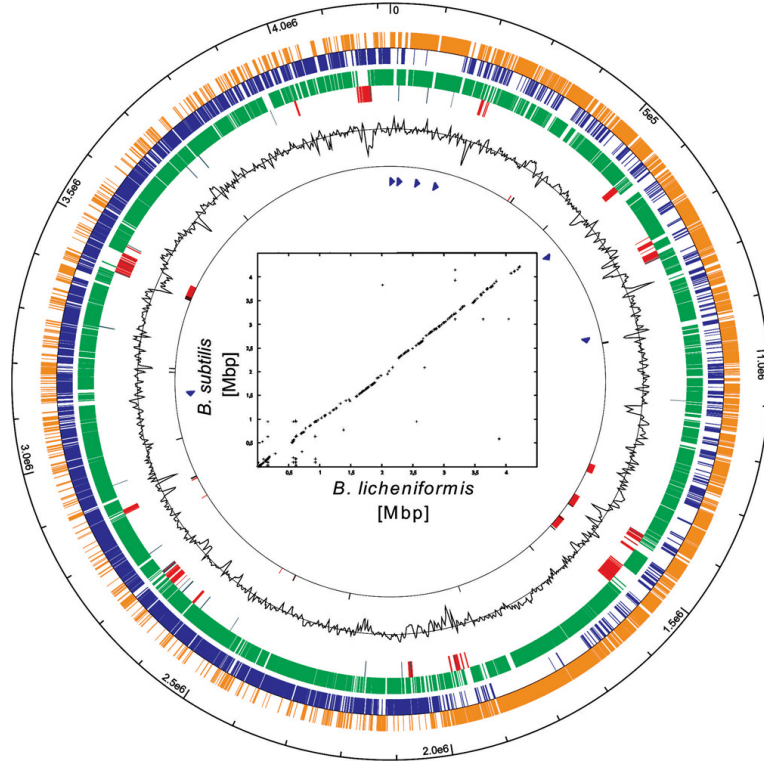
Son on yılda, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* rekombinant enzimlerin ekspresyonunda kolaylıkla kullanılmışlardır. İki endüstriyel *B. licheniformis* suşunun tüm genomunun sekansı çıkartılmış ve *B. subtilis*'in sekansına büyük oranda benzer olduğu, fakat insanlarda patojen olan *Bacillus cereus* ve *Bacillus anthracis*'ten farklılık

gösterdiği belirlenmiştir. *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* ve *Bacillus stearothermophilus*'un güvenilirliği birçok çalışmada belirtilmiştir (Çerçi 2011).

B.licheniformis DSM 13 suşunun tüm genomu açıklanmıştır ve genomun, biyoteknolojik uygulamalar için önemli enzimleri kodlayan genleri içerdiği bildirilmiştir (Veith ve ark. 2004). Böylece ilgili endüstriyel enzimler ile ilgili araştırmalar için kapı açılmıştır. Örneğin; rekombinant *B. licheniformis* kitinaz, endo- β -mannanaz, arabinoz isomeraz ve α -amilaz ile ilgili genlerin klonlama ve ekspresyon çalışmaları yapılmıştır (Juajun ve ark. 2010).

B.licheniformis DSM 13 suşunun genomu 4.222.728 bp uzunluğundadır. G+C oranı %46.2, 4.286 açık okuma çerçevesi (ORF), 72 rRNA operonları ve 20 transpozon geni içermektedir. Genomu *B. subtilis* ile eş-doğrusallık göstermektedir (Rey ve ark. 2004, Veith ve ark. 2004). Şekil 2.5'te *B. licheniformis*'in dairesel kromozom haritası gösterilmektedir.

B. subtilis ve *B. licheniformis*'in güvenilirliği ABD Çevre Koruma Ajansı tarafından değerlendirilmiştir. Her iki mikroorganizma da Toksik Maddeler Kontrol Kanunu ile (TSCA) EPA (U.S. Environmental Protection Agency)'nın incelemesinden muaf tutulmuşlardır (USEPA 1997). *B. subtilis* ve *B. licheniformis* gıda ve ilaç endüstrisinde GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak kabul edilmektedir (Schallmey ve ark. 2004).



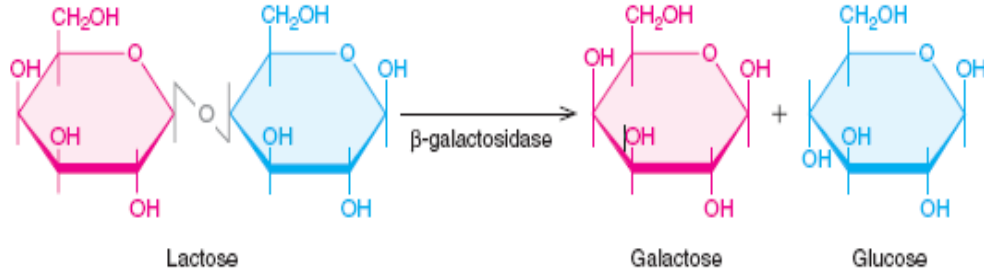
Şekil 2.5. *B. licheniformis*'in dairesel kromozom haritası

Kodlanan kromozom sekansları turuncu veya mavi ile gösterilmiştir. *B. subtilis*'te homolog proteinlere sahip *B. licheniformis*'in ORF dizileri yeşil ile gösterilmiştir. Farklılaşan kodon kullanımına sahip (yabancı genler) *B. licheniformis* genleri kırmızıyla gösterilmiştir. G+C içeriğinin değişimi siyah grafik ile belirtilmiştir. Dairesel haritanın merkezindeki grafik, nükleotid sekansa dayalı olarak *B. subtilis*'e karşı *B. licheniformis*'in MUMmer plot'unu göstermektedir (Veith ve ark. 2004).

2.6. β -Galaktosidaz

β -Galaktosidaz (β -D-galaktohidrolaz, EC 3.2.1.23), polimerlerden, oligosakkaritlerden ya da sekonder metabolitlerden D-galaktosil gruplarını hidrolize eden bir enzimdir. Polisakkarit özgünlüğü olan β -galaktosidazlar, pektik polimerlere saldıran β -galaktanazları ve ksiloglukanlara saldıran β -galaktosidazları kapsamaktadır.

Şekil 2.6'da görüldüğü gibi β -galaktosidaz, laktozdaki β -glikozidik bağın enzimatik hidrolizini katalizleyerek, laktozdan daha tatlı ve çözünürlüğü laktoza göre daha fazla olan glukoz ve galaktozun oluşmasını sağlamaktadır (Domingues ve ark. 2005, Dağbağlı 2009).

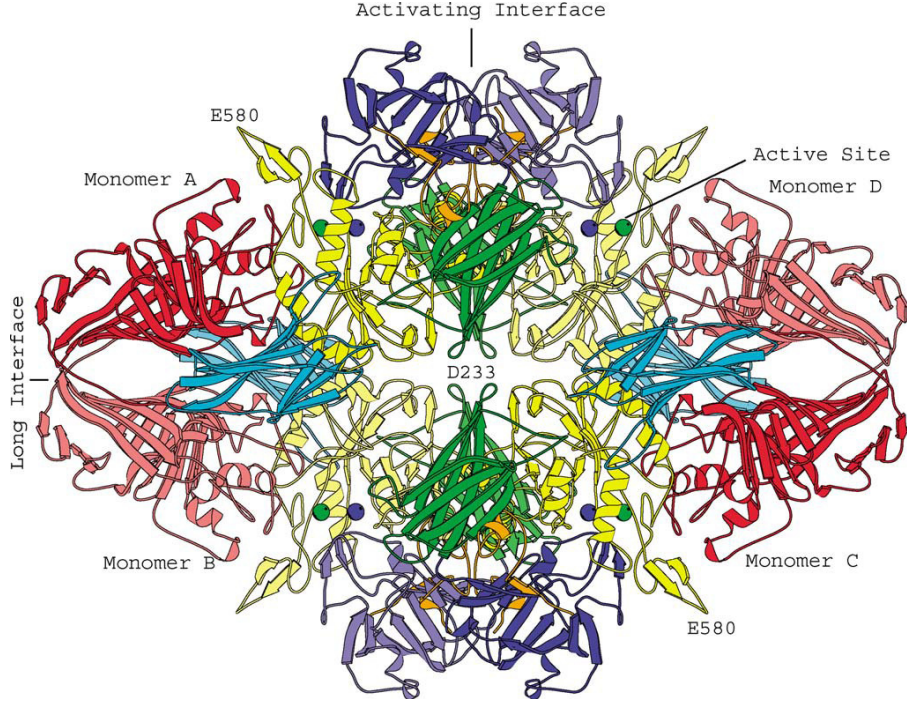


Şekil 2.6. β -Galaktozidaz ile laktozun hidrolizi (Weaver 2004)

E. coli'den elde edilen β -galaktozidaz, operon modelinin gelişiminde aracı olan ve günümüzde moleküler biyolojide en yaygın olarak kullanılan enzimlerden biridir (Jacobson ve ark. 1994). Ayrıca özellikleri, reaksiyon mekanizması ve yapısı bilinen ve en çok çalışılan enzimdir (Shaikh ve ark. 1999). Bu protein 222 simetri noktasına sahip bir tetramerdir (Şekil 2.7). Amino ucunda genişletilmiş bir bölümü ile birlikte 1023-amino-asit polipeptid zincirinin, beş sıralı domainde katlanmasından oluşmuştur (Jacobson ve ark. 1994). Her domainde farklı iki alt ünite bulunmaktadır. Enzimin maksimum etkinliği için tek ve iki değerlikli katyon gereklidir. Ancak bu enzim mekanizmalarında metal aktivatörlerinin rolü henüz ayrıntılı olarak bilinmemektedir (Matthews 2005).

β -galaktozidazlar kofaktör içermezler. Metal ile aktive olabilen enzimlerdendir. Metal ile aktive olan enzimler, çözültedeki alkali ya da toprak alkali iyonları zayıfça bağlayan enzimlerdir. Bu iyonlar substrat ile birlikte çözültiden ve enzimin aktif merkezindeki enzimin maksimum aktivite göstereceği pH değerini değiştirerek enzimin aktivitesini artırır. β -galaktozidazlar metalloenzim olduklarından Na^+ ve Mg^{++} iyonlarıyla aktive olurlar (Tunç 2006).

β -Galaktozidaz enzimi dört eşit amino asit zincirinden oluşan bir homotetramerdir. Her zincirin laktoz molekülü ile etkileşen bir aktif bölgesi vardır. Son zamanlarda β -galaktozidaz için yeni bir aktif bölgenin olduğu ileri sürülmüştür. Bu aktif bölgede glutamik asit artığı bulunmaktadır. Mikrobiyal kökenli bazı β -galaktozidazlarda iki tane glutamik asit artığı bulunmaktadır (Glu482 ve Glu551 gibi). Bunlardan birisi proton alıcı ve diğeri ise proton verici olarak görev yapmaktadır (Uyanık 2008).



Şekil 2.7. *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın tetramer görüntüsü

Domainlerin reklendirilmesi: tamamlayıcı peptid, turuncu; Domain 1, mavi; Domain 2, yeşil; Domain 3, sarı; Domain 4, turkuaz; Domain 5, kırmızı. Açık ve koyu gölgeler aynı domainin farklı alt ünitelerini göstermek için kullanılmıştır. Herbir dört aktif bölgedeki metal katyonlar küre şeklinde gösterilmiştir. Na^+ , yeşil; Mg^{++} , mavi. (Matthews 2005)

Şimdiye kadar, farklı kökenden β -galaktosidaz genine ait açıklanan tüm nükleotid sekansları pek çok çalışmada bildirilmiştir. Bunlar; *E. coli*'den lacZ ve ebgA, *Klebsiella pneumoniae*'den lacZ, *B. stearothermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'tan bgaB, *Sulfolobus solfataricus*'tan LacS, *Clostridium acetobutyicum*'dan cbgA-R, *Clostridium thermosulfurogenes* EM1'den lacZ, *Kluyveromyces lactis*'ten LAC4, *Leuconostoc lactis*'ten lacL-M, *Thermatoga maritima*'dan lacZ'dir (Phan Trân ve ark. 1998).

E. coli β -galaktosidaz (β -gal) geni (lacZ), markır gen ekspresyonu gerektiren analizde, özellikle de bir markır gen olarak son derece yararlı olmaktadır. β -gal eksprese eden hücreler, histolojik işlemlerde bir belirteç substrat olan 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid (X-gal) yardımıyla X-gal-boyama ile lacivert renge boyanarak kolaylıkla saptanabilir (Anson ve Limberis 2003).

Glikozid hidrolazlar (GHS; AK 3.2.1.x) enzimlerin belirgin biçimde farklı bir grubudur ve doğal olarak oluşan karbonhidrat ve gliko-konjugatların büyük bir kısmının yıkımını katalize eder. Glikozid hidrolaz (GH) enzimlerine dair bilgiyi organize etmek ve daha fazla araştırma yapmak amacıyla Carbohydrate-Active Enzymes databank (CAZY) adında bir veritabanı geliştirilmiştir ve bu da internette herkesin ulaşımına açıktır. CAZY veritabanı her biri farklı katalitik faaliyetler içerebilecek evrimsel GH aileleri halinde sınıflandırılmıştır (Rigden ve ark. 2003).

β -galaktosidazlar glikozid hidrolaz olup, amino asit dizisi ve hidrofobik küme analizine göre GH aileleri 1, 2, 35, 42 içinde sınıflandırılır. GH-1 ve GH-2 β -galaktosidazlar ağırlıklı biçimde substrat olarak laktoz kullanır ve sık sık laktik asit bakterilerinde ve bifidobakterilerde ve süt, süt ürünleri ve bebeklerin bağırsaklarıyla alakalı olarak karakterize edilmiştir. Yüksek laktoz konsantrasyonu varlığında, GH-2 β -galaktosidazlar galaktooligosakkarit (GOS) üretirler. (Shaikh ve ark. 1999, Karasová-Lipovová ve ark. 2003, Soydan 2006, Li ve ark. 2009, Schwab ve ark. 2010, Gül Güven 2011). Bunlardan GH-2 en iyi çalışılanı olup, *E. coli*, *Aspergillus*, *Bacillus megatherium* ve *S. solfataricus* β -galaktozidazları içine alır, oysa termofilik basiller dahil termofilik bakteriler, psikrofilik ve halofilik mikroorganizmalar GH-42'ye aittir (Gül Güven 2011). Termostabil β -galaktosidazlar termolabil enzimleri ile karşılaştırıldığında, düşük laktozlu süt ürünleri üretiminde ya da gliko-konjugat sentezinde önemli avantajlara sahiptirler (Li ve ark. 2009).

β -Galaktosidaz enzimi Kalifornia deniz aslanı hariç tüm memelilerde bulunur. İnsan ince barsağında üç farklı β -galaktosidaz vardır:

1. Laktaz: İnce barsak epitelinin kenar membranında bulunur. Gıdalarla birlikte alınan laktozu glukoz ve galaktoza hidrolizler. Bu hidroliz ürünleri Na^+ bağımlı ve aktif olarak barsak epitel hücresi içine taşınırlar.
2. Asit β -galaktosidaz: İnce barsak epitel hücre lizozomlarında bulunur.
3. Hetero- β -galaktosidaz: İnce barsak epitel hücre sitoplazmasında bulunur.

Asit ve hetero- β -galaktosidaz'ın gıdalarla alınan laktozun hidrolizinde rolü görülmemektedir (Tunç 2006).

2.7. β -Galaktosidazın Kullanım Alanları

β -Galaktosidaz enzimi, son yıllarda uygulama alanı artan ve ticari olarak önemli olan enzimlerden birisidir. Bu enzimin çeşitli kullanım alanları vardır.

Süt ürünlerinin tatlılığını, çözünebilirliğini, tadını ve sindirilebilirliğini artırmak için β -galaktosidaz gıda endüstrisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Richmond ve Stine, 1981, Grosova ve ark. 2008).

Laktoz sütün başlıca karbonhidratı olup yaklaşık %3-8 (w/v)'ini oluşturmaktadır. Laktoz konsantrasyonu sütün kaynağına göre 50-100 g/L arasında değişmektedir (Alagöz 2007).

Laktoz higroskopik bir şekerdir, tatları ve kokuları absorbe etme özelliği gösterir ve süt ürünlerindeki kristalizasyonlar gibi dondurulmuş ürünlerde, kumlu yapının veya tortu oluşumunun gelişiminde aksaklıklar gösterir (Panesar ve ark. 2006, 2007). Laktozun hidrolizi asitlerle veya enzimatik olarak sağlanabilmektedir. Asit kullanılan işlemlerde sütteki laktoz hidroliz edildiğinde süt ve sütün türevlerinin tadında, kokusunda ve renginde bozulma görülmektedir. Laktoz hidrolizi enzimatik olarak gerçekleştiğinde ise sütün sadece tatlılığında bir değişiklik oluşmakta, sütün tatlılık oranı 4 kat artmaktadır (Uyanık 2008). Laktozun enzimatik olarak hidrolizlenmesi sonucu sakkaroz kullanılan aromalı süt ürünlerinde sakkaroz kullanım ihtiyacı %20-40 oranında düşürülebilir (Tekinşen 1997, Göğüş ve Fadıloğlu 2006).

Dünya nüfusunun %70'inden fazlasında laktoz tahammülsüzlüğü bulunmaktadır. Bu kişilerin laktoz içeren süt ve süt ürünlerini tüketmeleri sonucunda ince bağırsakta β -galaktosidaz aktivitesinin yetersizliğinden dolayı rahatsızlıklar oluşmaktadır. Bundan dolayı süt endüstrisinde laktoz hidrolizi önem kazanmıştır (Lee ve Krasinski 1998, Nogales ve Lopez 2006).

Laktozu β -galaktosidaz ile hidroliz etmek suretiyle peynir altı suyunun kullanımı, donmuş konsantre tatlılardaki laktoz kristalizasyonu ve laktoz intolerant insanlar tarafından sütün tüketilmesiyle alakalı sorunlar ortadan kaldırılabilir (Kim ve Rajagopal 2000, Karasová-Lipovová ve ark. 2003, Bayramoğlu ve ark. 2007).

Laktozu hidrolizlenmiş süttten yapılan yoğurt sadece tatlılık oranının artmasından dolayı geleneksel yoğurda tercih edilmekle kalmaz aynı zamanda yoğurt

yapımında bu sütün kullanılması yoğurt oluşum pH'sına ulaşılması için gereken süreyi kısaltmaktadır (Uyanık 2008, Dağbağlı 2009).

Gıda endüstrisinde β -galaktosidaz enziminin kullanımı ve önemi, laktoz tahammülsüzlüğü olan insanların tüketebileceği ürünler hazırlamakla sınırlı değildir. Ayrıca fermente ve alkolsüz içkilerin üretiminde ve fırıncılıkta mayanın gelişmesi için β -galaktosidaz enziminden faydalanılmaktadır (Uyanık 2008).

Ayrıca, peynir suyu gibi çevre kirlenmesine (BOD, 40,000-60,000 ppm) neden olan sütün artığının değerlendirilmesinde β -galaktosidaz enziminin kullanımı önemlidir. Peynir suyundaki laktozun β -galaktosidaz ile hidroliz edilmesiyle hem çevresel kirlenmenin önüne geçilmesi hem de değerli hidroliz ürünlerinin gıda endüstrisinde alternatif bir tatlandırıcı olarak kullanılmak üzere geri kazanılması sağlanabilir (Dağbağlı 2009). Peynir altı suyunda yüksek oranda bulunan laktozun geri kazanılmasıyla bisküvi, çikolata, dondurma, hazır çorba ve şarküteri ürünlerinin imalatında belirli oranlarda kullanıldığında süt tozunun yerine kullanılabilen bir ürün elde edilmekte ve aynı zamanda ekonomiye katkı sağlanmaktadır (Kara 2004, Uyanık 2008).

β -Galaktosidaz enzimi ayrıca tıpta ELISA tekniğinde kullanılır. Enzimlerin antikor moleküllerine bağlanmaları hem yüksek spesifiteye hem de yüksek duyarlılığa sahip bir immünojenik araç oluşturur. ELISA denilen teknik, enzimin katalitik özelliklerinin ve antikorun spesifitesinin değişmeyeceği şekilde, enzimlerin kovalent olarak bağlandığı antikorları kullanır. Tipik olarak bağlanan enzimler, hepsi bir spektrofotometre ile çok küçük miktarları dahi tayin edebilen renkli ürünler oluşturan reaksiyonları katalizleyen peroksidaz, alkalın fosfataz ve β -galaktosidazları içerir (Madigan ve Martinko 2010).

β -Galaktosidazlar, galakto-oligosakkarit olarak adlandırılan (GOS), bağırsakta yararlı bakterilerin büyümesini teşvik eden prebiyotiklerin sentezi için mükemmel bir biyokatalizördür (Ladero ve ark. 2006). Probiyotik bakteriler ve prebiyotik oligosakkaritler süt ve süt ürünlerinin üretilmesinde kombinasyonlu bir şekilde kullanılırlar. Bu ürünler fazla miktarda laktoz içerdiğinden, laktozun bakteriyel metabolizmasına katılan β -galaktosidazlar büyük önem taşır.

β -Galaktozidaz, bütanol ve antibiotik (chlorphenisin ve chloromphenical) içeren akseptör bileşiklerin üzerine laktozun galaktoz ünitelerini transfer ederek galaktooligosakkaritlerin (GOS) oluşmasını sağlamaktadır (Alagöz 2007). β -Galaktosidaz galaktozu hidroksil grup içeren nükleofilik akseptöre transfer etmektedir. Transfer suya olursa galaktoz, eğer başka bir karbonhidrata olursa di, tri ve daha büyük galaktosil sakkaritler yani GOS'lar oluşmaktadır. Çoğu koşullarda ortamdaki yüksek su varlığından dolayı hidrolitik yön daha baskındır ve bundan dolayı GOS üretimi ve verimi düşüktür. Verimi artırmak için su içeriği azaltılmalı ve/veya şeker konsantrasyonu artırılmalıdır. GOS'lar glikoz ve galaktoz ünitelerinden meydana gelmiş şekerler olup, kimyasal/enzimatik hidrolizle ya da sentezle ve mikroorganizmalar tarafından üretilebilmektedirler. Oligosakkaritlerin enzimatik sentezi için glikosiltransferazlar ya da glikosidazlar kullanılır. Pahalı olmaları, stabil olmamaları ve az bulunmaları, mükemmel seçiciliğe sahip glikosiltransferazların kullanılmasına engel olmaktadır. Son zamanlarda GOS sentezleme yeteneğine sahip β -galaktosidazların transgalaktosilasyon aktivitesine büyük önem verildiği, enzimatik GOS sentezi üzerine yoğun çalışmaların olduğu dikkati çekmektedir (Karasová-Lipovová ve ark. 2003, Aykut ve ark. 2008).

β -Galaktosidazlar mantarlar, bakteriler ve mayalar gibi mikroorganizmalardan, bitkilerden, hayvan hücrelerinden ve rekombinant kaynaklardan elde edilmiştir. Farklı mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin farklı özellikleri bulunmaktadır. Bu yüzden pek çok farklı uygulama alanında kullanılmaktadırlar (Ustok ve ark. 2010). Yüksek termal dayanıklılık birçok endüstriyel enzimde fazla istenen bir özelliktir, çünkü enzimlerin kullanıldığı işlemler genelde yüksek sıcaklıklarda ($>50^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirilir. Bu nedenle, ekstremofilik organizmalardan yeni enzimlerin keşfinde artış olmuştur. Özellikle termofillerden elde edilen enzimler sahip oldukları dayanıklılıktan dolayı günümüzde en fazla pratik ticari kullanım alanı bulmuştur (Saito ve ark. 1989, Gül Güven 2011).

Özellikle termofil bakterilerden elde edilen β -galaktosidazların ısıya ve diğer inaktivasyon maddelerine karşı doğal yerleşik stabilitesi vardır (Ladero ve ark. 2003, Kara 2004, Ladero ve ark. 2006). Termofilik β -galaktosidazlar mezofilik enzimler ile karşılaştırıldığında, düşük laktozlu süt üretiminde ve ısı uygulamasıyla birlikte süt

ürünlerinin endüstriyel işleminde kullanılmak üzere avantajlara sahiptir. Bu türden materyallerin yüksek ısılarda enzimatik uygulaması, yüksek reaksiyon hızı, enzimin yarı ömrünün uzunluğu, mikrobiyal kontaminasyonun azaltılması gibi endüstride genel olarak bilinen birtakım avantajları bulunmaktadır (Katrolia ve ark. 2011). İdeal olarak, β -galaktosidazlar sütün pastörizasyonunda laktoz hidrolizini yüksek sıcaklıklarda (65-85°C) gerçekleştirebilmektedir (Yuan ve ark. 2008).

2.8. β -Galaktosidaz ile İlgili Kapsam

Ülkemizde ve dünyada çok sayıda biyo-çeşitlilik üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Belirlenen her yeni organizma suşu insanlık yararına kullanılabilecek ürünler için potansiyel gen kaynaklarıdır. Günümüzde pek çok biyoteknoloji ve gen teknolojisi ile ilgilenen firmalar ekstrem çevrelerdeki biyo-çeşitlilik ve olası enzim farklılıkları ile ilgilenmektedir.

Ülkemiz sınırları içinde sıcaklığı 40°C'nin üzerinde olan 133 adet sıcak su kaynağı bulunmaktadır. Sıcak su kaynakları üzerinde gelişen termofiller ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu yüksek sıcaklığa direnç gösteren termofil enzimlerin araştırılması üzerinedir. Son yıllarda bakteriyel kaynaklardan 2400'ün üzerinde endonükleaz enzimi tanımlanmış, bu enzimlerin 220'sinin farklı özellik gösterdiği ve çoğunlukla *Thermus* ve *B. stearothermophilus* türlerinden izole edildiği bildirilmiştir (Ercan-Akkaya 2009).

Bu çalışmanın amacı; genetik mühendisliği ve biyoteknolojik yöntemleri kullanarak ekstrem koşullarda yaşayan termofilik bakterilerden biyoteknolojik öneme sahip sıcaklığa dirençli β -galaktosidaz enzimlerini üreten rekombinant bakteriler geliştirmek ve bu enzimlerin bol ve ucuz bir şekilde üretilmelerine olanak sağlamaktır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, *B. licheniformis* DSM 13 suşunun tüm genomu rapor edilmiştir ve bu genomun biyoteknolojik uygulamalar için önemli enzimleri kodlayan bazı genleri içerdiğini göstermektedir (Veith ve ark 2004). Böylece, endüstriyel enzimler ile ilgili sonraki çalışmaların aydınlatılmasında daha fazla bilgi için bir kapı açmıştır (Juajun ve ark. 2010). Bu çalışmada, sıcak su kaynağından elde edilen *B. licheniformis* KG9 ekstraselüler β -galaktosidazı fazla miktarda üretmesinden ve daha önce yapılan (Gül Güven 2007) 16S rRNA analizlerine göre tüm genomu bilinen *B.*

licheniformis DSM 13 suşuna %99.9 benzerlik gösterdiğinden dolayı klonlama çalışmaları için kullanılmıştır. Bunların yanı sıra *B. licheniformis*'e ait ekstraselüler β -galaktosidaz'ın klonlanması ile ilgili daha önceden çalışma olmaması da bu çalışmanın rekombinant enzim teknolojisi bakımından önemli olduğunu göstermektedir.

Ayrıca tanımlanan *B. licheniformis* KG9 suşunun özellikle süt ve süt ürünleri endüstrisinde kullanım alanı bulan ve biyoteknolojik olarak önemli enzimler arasında yer alan termostabil β -galaktosidaz enziminin saflaştırılmasında kullanılması da amaçlanmıştır.

Gül Güven (2007), Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yer alan ve daha önce bakteri tanımlamaya yönelik çalışmaların yapılmadığı Kös-Bingöl ve Taşlıdere-Batman sıcak su kaynaklarından termofilik karaktere sahip bakterilerin izolasyonu ve tanımlamasını yapmıştır. Sıcak su kaplıcalarından izole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri, lipit ve yağ asidi içerikleri, kinon tipleri ve 16S rRNA dizi analizleri yapılarak identifikasyonları yapılmıştır. Bu izolatlardan KG9'un 16S rRNA dizisinin %99.9 oranında *B. licheniformis* DSM 13'e benzediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda, tüm genomu bilinen *B. licheniformis* DSM 13'e benzerliğinden dolayı elde edilen bu suşun gen mühendisliği çalışmalarında kullanılabilir özellikte olduğu belirlenmiştir.

Bu özelliklerinden dolayı endüstriyel olarak iyi bilinen bir mikroorganizma tarafından β -galaktosidazın ekstraselüler olarak üretilmesi, yüksek termostabiliteye sahip ticari yönden önemli olan, düşük maliyetli substratlar kullanılarak üretilmesi, bu suşun kullanılarak endüstriyel çapta enzim üretimi sağlanması konusunda avantaj sağlamaktadır.

Vetere ve Paoletti (1998), *B. circulans*'tan üç farklı β -galaktosidaz saflaştırarak elde etmiştir ve elde edilen enzimi karakterize etmiştir. *B. circulans*'dan elde ettikleri β -galaktosidazının non-denatüre jel elektroforezi ile izoformların molekül ağırlıklarını 212, 145 ve 86 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Vasiljevic ve Jelen (2001), β -galaktosidaz enziminin çok geniş organizma grubu tarafından üretilse de, endüstriyel olarak en iyi üreticilerin bakteriler olduğunu belirterek, süt endüstrisi için oldukça önemli olan β -galaktosidaz enziminin üretimini

termofilik laktik asit bakterilerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Uygulama sırasındaki düşük kontaminasyon riski nedeni ile termofilik bakteriler β -galaktosidaz enziminin üretimi için ilgi çekmektedir. Termostabil β -galaktosidaz enzimi pastörizasyon esnasında laktoz hidrolizini gerçekleştirebilmesi nedeni ile dikkat çekmektedir.

Chakraborti ve ark. (2003) Hindistandaki Manikaran'dan izole edilen termofilik *Bacillus polymyxa*'dan β -galaktosidaz enzimi üzerine çalışmışlardır. Enzimin optimum pH'sını 7.0, sıcaklığını 60°C olarak belirtmişlerdir.

Kara (2004), β -galaktosidazın sonikasyon yöntemiyle salgılanmasında *Lactobacillus plantarum* NCIMB 1193, *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 ve *Lactobacillus plantarum* E08 suşları kullanmıştır. Sonike edilmiş *L. plantarum* NCIMB 1193'ün hücre içermeyen özütü, β -galaktosidazın karakterizasyonu için kullanılmıştır. β -galaktosidazın optimum pH değerini 7.2 olarak ve optimum sıcaklığını da 35°C-40°C arasında belirlemiştir.

Soydan (2006), düşük laktozlu süt üretimi veya olası diğer kullanım alanları için termofilik funguslarda termostabil β -galaktosidaz üretimi, optimizasyonu ve kısmi olarak saflaştırılması üzerinde çalışmıştır.

Sørensen ve ark. (2006), *Flavobacterium* sp. 4214'den soğuk-aktif β -galaktosidaz enzim genleri *E. coli*'ye aktararak, ekspresyonu hem *Flavobacterium* sp. 4214'ta hem de rekombinant *E. coli*'de incelemişlerdir.

Sarıgül (2007), Ege Bölgesi'ndeki çeşitli sıcak su kaynaklarından *Thermus* genusu bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle tanımlanmasını gerçekleştirerek bu suşlarda β -galaktosidaz aktivitesini saptamaya yönelik testler yapmıştır.

Dağbağlı (2009), *Kluyveromyces* türü mayalar ile β -galaktosidaz enzim üretiminde bazı proses değişkenleri incelemiş ve enzim üretimini optimize etme yöntemlerini geliştirmiştir. Enziminin saflaştırılmasını, Sephadex A50 iyon değiştirici jel kullanılarak gerçekleştirmiş ve enzim yaklaşık 3 kat saflaştırmış, saflaştırma verimini ise %74.41 olarak bulmuştur. *Kluyveromyces lactis* NRRL 8279'dan elde edilen saflaştırılmış β -galaktosidaz enzimine ait SDS PAGE görüntülerinde enzime ait dört adet alt birim (133.77, 58.07, 49.81, 24.71 kDa) tespit etmiştir. Üretilen β -

galaktosidaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 37°C ve pH 7.0 olarak bulmuştur.

Yapılan çalışmaların çoğunda üretici mikroorganizmadan β -galaktosidaz enzim genleri *E. coli*'ye aktarılarak enzim rekombinant olarak üretilmiştir. Üretici mikroorganizmadan gen aktarımı ile β -galaktosidaz enzim üretimi de oldukça yaygındır. Rekombinant β -galaktosidaz enzim üretimi, endüstriyel proseslerde üretim koşullarının daha iyi tanınan *E.coli* gibi mikroorganizmalar için dizayn edilmesinin kolaylığı ve yüksek verim sağlaması nedeni ile tercih edilmektedir.

Saito ve ark. (1989), termostabil β -galaktosidaz enzimi üzerinde çalışmıştır. Termofilik anaerob bakteriden β -galaktosidaz genini *E. coli*'ye aktararak ekspresyonunu incelemiştir.

Koyama ve ark. (1990), *Thermus* T2 suşundan termostabil α ve β -galaktozidazı *E. coli*'ye aktarmışlardır. *Thermus cryptic* pTT8 plasmidi aracılığıyla *Thermus thermophilus* HB27'ye β -galaktosidaz genini aktarmışlar ve eksprese olduğunu belirlemişlerdir.

Saito ve ark. (1992), termostabil galaktozidaz *LacN* genini termofilik anaerob NA10 suşundan *E. coli* MV1184'e klonlayarak fazla miktarda enzim üretimini gerçekleştirmişlerdir. Orijinal NA10 suşuyla karşılaştırıldığında *E. coli* MV1184'te enzimin 2.400 kat daha fazla üretildiğini belirlemişlerdir. Enzimin jel filtrasyon ile saflaştırarak, SDS-PAGE ile molekül yapısının tetramerik olduğunu belirlemişlerdir.

Torres ve Lee (1995), *B.subtilis* KL88'ten elde ettikleri β -galaktosidaz genini *E. coli*'ye aktararak ekspresyonunu incelemiştir. Klonlanan β -galaktosidazın katalitik özelliklerinin ve termal stabilitesinin doğal *B. subtilis* β -galaktosidaz ile benzer olduğunu belirlemişlerdir. β -galaktosidazın optimum pH değerini 6.0 olarak ve optimum sıcaklığını da 50°C olarak belirlemiştir. Molekül ağırlığını da 90 kDa olarak bildirmişlerdir.

Fokina ve Velikodvorskaia (1997), termofilik anaerob *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E (*Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E)'den termostabil β -galaktozidaz genini *E. coli*'ye klonlayarak gen kütüphanesi oluşturmuşlardır. *E. coli*'nin hücre ekstraksiyonuyla enzimi saflaştırmışlardır ve fizikokimyasal olarak karakterize

etmişlerdir. β -galaktosidazın optimum pH değerini 5.3-6.0 olarak ve optimum sıcaklığını da 75-80°C olarak belirlemişlerdir. Molekül ağırlığını da 83 kDa olarak bildirmişlerdir.

Phan Trân ve ark. (1998), *B. licheniformis*'ten intraselüler β -galaktosidaz kodlayan genleri *E. coli*'ye klonlamışlardır. Eksprese olan rekombinant β -galaktosidazı FPLC ile saflaştırmışlardır.

Hoyoux ve ark. (2001), Antartik psikrofil *Pseudoalteromonas haloplanktis*'ten elde edilen β -galaktosidaz genini *E. coli*'ye aktararak eksprese olan rekombinant β -galaktosidazı karakterize etmiştir.

Karasov -Lipovov  (2003), Antartik bakteri *Arthrobacter sp.* C2-2'den elde edilen soğuk-aktif β -galaktosidazı klonlamıştır ve rekombinant enzimi saflaştırarak karakterize etmiştir. Saflaştırdıkları β -galaktosidaz'ın GH-2 ailesine dahil olduğunu, homotetramerik yapıya sahip ve alt ünitelerinin 1023 aminoasitten oluştuğunu, laktozu substrat olarak kullandığını belirlemişlerdir.

Kim ve ark. (2004), *Thermotoga maritima*'dan putatif β -galaktozidaz genini *E. coli*'ye klonlayarak ekspresyonunu incelemişlerdir. His-tag kromatografisi ve gel filtrasyon kromatografisi ile enzimi saflaştırarak optimum sıcaklığını 80-85°C olarak belirlemişlerdir.

Söyler (2004), *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 α -galaktosidaz genlerinin moleküler klonlamasını gerçekleştirmiştir.

Kang ve ark. (2005), *Thermus flavus* AT-62 ile yaptıkları çalışmada β -galaktosidaz enzimini kodlayan genleri klonlayarak, *E.coli*'ye aktarmışlar ve genin ekspresyonunu sağlamışlardır. Böylece mezofilik koşullarda termostabil β -galaktosidaz enzim üretimini sağlamışlardır.

Kim ve ark. (2006), hipertermofilik bakteri olan *Sulfolobus solfataricus*'dan klonladıkları β -galaktosidaz enzimi genlerini, *E. coli*'ye aktararak termostabil enzim üretimini incelemişlerdir.

Lu ve ark. (2007), topraktan izole ettikleri *Enterobacter agglomerans* B1 suşunun β -galaktosidaz enziminin özelliklerini incelemiştir. Daha sonra ise β -galaktosidaz enzimini kodlayan genleri *E. coli*'ye aktarmışlardır.

Nguyen ve ark (2007), *Lactobacillus reuteri* L103 suşunun β -galaktosidaz enziminin genlerini *E. coli*'ye aktararak ekspresyonunu sağlamışlardır.

Chen ve ark. (2008), *B. stearothermophilus*'tan elde edilen termostabil β -galaktozidaz genini klonlayarak *B. subtilis* WB600'de ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Eksprese olan rekombinant enzimi saflaştırarak enzimin molekül ağırlığını 70 kDa, optimum sıcaklığını 70°C ve pH'sını 7.0 olarak belirlemiştir. Termostabil olan bu enzim üzerine değişik metallere ve kimyasalların etkisini incelemiştir. Ayrıca K_m ve V_{max} değerlerini belirlemiştir.

Yuan ve ark. (2008), *Alicyclobacillus acidocaldarius*'tan elde edilen termostabil β -galaktosidaz genini klonlayarak ekspresyonu üzerine çalışmalar yapmıştır.

Campuzano ve ark. (2009), *Streptococcus mitis*'ten β -galaktosidaz genini *E. coli*'ye aktararak ekspresyonunu incelemiştir ve enzimi karakterize etmiştir. Klonlanan genin tahmini 2.411 amino asit uzunluğunda olduğunu belirtmişlerdir. DEAE-selüloz ve affinite kromatografisi kullanarak enzimi saflaştırmışlardır ve molekül ağırlığının 268 kDa olduğunu çalışmalarında bildirmişlerdir.

Hildebrandt ve ark. (2009), Antartik bakteri *Arthrobacter sp.*'den elde edilen soğuk-aktif β -galaktosidaz genini (32c) klonlamıştır, eksprese olan rekombinant enzimi protein çöktürme ve affinite kromatografisi ile iki adımda, elektroforetik yöntemlerle tek adımda saflaştırma işlemini gerçekleştirmiştir.

Li ve ark. (2009), *Thermotoga maritima* MSB8'den elde edilen GH-42 ailesine dahil olan β -galaktosidaz genini (TM_0310) *E. coli*'ye aktararak eksprese olan rekombinant β -galaktosidazı affinite kromatografisi ile saflaştırmıştır ve molekül ağırlığını hesaplayarak enzimin optimum pH ve sıcaklığını belirlemiştir.

Juajun ve ark. (2010), *B. licheniformis* DSM 13'ten β -galaktosidazı *E.coli*'ye klonlayıp, saflaştırarak karakterize etmişlerdir.

Schmidt ve Stougaard (2010), yeni bir Arktik bakteri olan *Alkalilactibacillus ikkense*'de soğuk-aktif β -galaktosidaz genlerini *E. coli*'ye klonlayıp, ekspresyonunu çalışmışlardır. Sekans analizleri sonuçlarına göre glikozid hidrolaz ailesine ait 2 β -galaktosidazın *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus* ve *Geobacillus*'lara benzerlik gösterdiğini bulmuşlardır.

Çalışmamızda; *B. licheniformis* KG9'a ait ekstraselüler β -galaktosidaz genleri *E.coli*'ye aktarılmıştır. Bu yönüyle daha önceki pek çok çalışmada β -galaktosidaz gen aktarımı çalışılmış olmasına rağmen ekstraselüler olarak üretilen β -galaktosidaz ile ilgili gen aktarımı çalışmalarına rastlanmamasından dolayı da önemlilik arz etmektedir. Bu sayede hem gen aktarımında kullanılacak yöntemlerin geliştirilmesi, hem kullanacağımız termofilik suşun genetik ve rekombinant teknolojilerde kullanılabilirliğinin gösterilmesi, hem de termostabil β -galaktosidazın enzim üretimi, endüstriyel proseslerde üretim koşullarının daha iyi, uygun, kolay ve ekonomik olduğu ve genomu daha iyi bilinen *E.coli* gibi mikroorganizmalar için dizayn edilmesinin kolaylığı ve yüksek verim sağlaması nedeni ile *E.coli*'ye aktarılarak üretilmesi amaçlanmıştır. *B. licheniformis* KG9 suşun bol miktarda ve yüksek aktivitede β -galaktosidaz üretmesinden dolayı bu enzimin saflaştırılması ve karakterize edilmesi de önemlilik göstermektedir.

Chang ve Mahoney (1989), *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*'tan elde ettikleri termostabil β -galaktosidazı yaklaşık 109 kat saflaştırmışlardır. Saf enzimin spesifik aktivitesini 592 U/mg, verimini %46 olarak elde etmişlerdir.

Pisani ve ark. (1990), *Sulfolobus solfataricus*'tan termostabil β -galaktosidaz izoenzimini iyon-değişim ve jel filtrasyon kromatografilerini kullanarak saflaştırmışlardır. Saf enzimin spesifik aktivitesini 116.4 U/mg, optimum sıcaklığını 75°C olarak belirlemişlerdir. Saf enzimin tetramer yapıda olduğunu ve molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 240±8 kDa olarak belirlemişlerdir.

Berger ve ark. (1997), *Thermus aquaticus* YT-1'den β -galaktosidaz izoenzimini jel filtrasyon (Ultrogel AcA 34), iyon-değişim (Mono Q) ve jel filtrasyon (Superose-12) kromatografilerini kullanarak saflaştırmışlardır. Saf enzimin molekül ağırlığını jel filtrasyon ile >700 kDa olarak tahmin etmişler ve SDS-PAGE ile 59±1 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 5.5 ve optimum sıcaklığını 80°C olarak

belirlemişlerdir. Enzimin aktivitesinin CaCl_2 ile arttığını tespit etmişlerdir.

Leng ve ark. (1998), *Flavobacterium keratolyticus*'tan endo β -galaktosidazı *E.coli*'ye klonlayıp, *E.coli*'de eksprese olan bu enzimi saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesini 148 U/mg, SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığını 43 kDa olarak belirlemişlerdir.

Ohtsu ve ark. (1998), sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Thermus* sp. A4' ten termofilik β -galaktozidazı saflaştırıp karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzimin yeni GH42 ailesinden olduğunu ve SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığını 75 kDa olarak belirlemişlerdir.

Shaikh ve ark. (1999), termofilik mantar *Rhizomucor* sp.'den DEAE-selüloz kromatografisi ve Sephacryl S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile ekstraselüler β -galaktosidaz enzimini saflaştırmıştır. Enzim aktivitesi için optimum pH ve optimum sıcaklık belirlenmiştir.

Chakraborti ve ark. (2000), *Bacillus* sp. MTCC 3088'den ekstraselüler yeni β -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 8.0 ve optimum sıcaklığını 60°C olarak belirlemişlerdir.

Li ve ark. (2001), Hindistan, Endonezya ve Amerika'nın sıcak bölgelerinde yetişen mung bitkisi tohumlarından elde edilen β -galaktosidaz'ın beş izoformunu izole etmişlerdir. β -Galaktosidazları asit karışımı çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE kromatografisi, con-A-Sefaroz ve kromatofokuslama ile saflaştırmışlardır ve molekül ağırlığını belirlemişlerdir.

Ladero ve ark. (2006), *Thermus* sp. T2 suşunda termostabil β -galaktosidaz enzimi üzerinde çalışmıştır.

Gül Güven ve ark. (2007), *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. rittmannii'den termostabil β -galaktozidaz enziminin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum pH'sını 6.0 ve optimum sıcaklığını 65°C olarak belirlemişlerdir.

Di Laura ve ark. (2008), *Alicyclobacillus acidocaldarius*'de β -galaktozidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, genin klonlanması, ekspresyonunu ve rekombinant enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin yeni GH-42

ailesinden olduğu ve enzimin optimum sıcaklığını 65°C olarak belirlemişlerdir.

Uyanık (2008), β -galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücreslerden izolasyonu ve karakterizasyonunu çalışmıştır. Yapılan çalışmada, β -galaktosidaz enzimi *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 mayasından jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin aktivitesi ve moleköl ağırlığı belirlenmiştir.

Li ve ark. (2009) *Thermatoga maritima* MSB8' den elde ettikleri β -galaktozidazın genini *E. coli*'ye aktararak ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant β -galaktozidaz enzimini saflaştırarak enzimin moleköl ağırlığını 78 kDa olarak belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin optimum pH'sını 5.5 ve optimum sıcaklığını 80°C olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada termofilik *B. licheniformis* KG9'a ait termostabil β -galaktosidaz enzimine ait genin düşük sıcaklıkta ve ekonomik olarak üretilebilen ve *E. coli*'ye aktarılmasıyla yüksek sıcaklıktan kaynaklanan dezavantajın giderilmesine olanak sağlayacağı düşünölmüştür. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak termofilik özelliikte mikroorganizmaya ait termostabil özellikteki ekstraselöler β -galaktosidaz enziminin kısa sürede, bol miktarda ve enerji kazanımı sağlanarak üretilebileceği ve bu enzimin saflaştırılarak yüksek verimde ve saflıkta enzim elde etme yönteminin geliştirilmesi düşünölmektedir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri, Plazmit ve Üreme Ortamları

Bu çalışmada sıcak su kaynağından Yrd. Doç. Dr. Reyhan Gül Güven tarafından (Dicle Üniversitesi, Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Eğitimi) izole edilen termofilik *B. licheniformis* KG9 suşu kullanılmıştır. *E. coli*'den izole edilen pUC18 Δ lacZ vektörü ve β -galaktosidaz geninin aktarılması için *E. coli* TOP10 suşu (TOPO TA Cloning® Kits) Invitrogen'den satın alınmıştır.

B. licheniformis KG9, *E. coli* Top10 bakterileri %30 v/v gliserol içeren besi yerinde, -20°C'de muhafaza edilmiştir. *B. licheniformis* KG9 bakterisi, Luria Bertani Broth (LB) besi yerinde (Bacto Tripton 10 g/L, Bacto-Yeast Extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0), 55°C'de ve aerobik şartlarda üretildi. *E. coli* TOP10 suşu LB besi yerinde 37°C'de ve aerobik şartlarda üretilmiştir. Katı besi yeri için üreme ortamlarına %1.5 w/v agar ilave edilmiştir.

Plaklarda bakterilerin enzim aktivitelerini belirlemek amacıyla İzopropil β -D-1-thio-galaktopiranosid (IPTG), bromo-kloro-indolil-galaktopiranosid (X-gal) ve stok olarak hazırlanmış ampisilin antibiyotiğinden uygun konsantrasyonlarda alınarak besi yerlerine ilave edilmiştir.

Bütün rekombinant teknikler Schmidt ve Stougaard (2010)'a göre yapılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada DNA modifiye edici enzimler (DNA kesme enzimlerinden *Sau3AI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*), DNA kesim tamponları, Bovin Serum Albumin (BSA) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için MgCl₂ NEB'den (New England BioLabs), RNA uzaklaştırmak için RNaz, fenol, lizozim, PCR tamponu, Taq polimeraz, o-nitrofenil-beta-D-galaktosid (ONPG), IPTG ve X-gal Sigma'dan, T4 DNA ligaz, dNTP, DNA polimeraz ve ligasyon tamponları Invitrogen'den, SeaKem® GTG® agaroz Lonza'dan, Shrimp Alkalın fosfataz ve defosforilasyon tamponu Roche'den, jel

ekstraksiyon kiti, mini-prep kiti QIAGEN'den, PCR tüpleri Genuine Axygen Quality'den temin edilmiştir.

3.1.3. Aletler

Çalışmada kullanılan aletlerden santrifüj Sigma 2-15K ve 3-18K'dan, mikrosantrifüj Sigma 1-15P, PCR cihazı Eppendorf Mastercycler Personal'dan, DNA izolasyonu için Eppendorf AH Diagnostic Thermomixer Comfort'tan, DNA jel elektroforez cihazı Embi Run One Electrophoresis Cell Tech'den, güç kaynakları BioRad'dan, agaroz jelde DNA bantlarını gözlemek için translüminatör BioRad Gel Doc 2000'den, DNA miktarını ve saflığını ölçmek için spektrofotometre Nano-Drop ND-100'den, otoklavlar Hirayama'dan, inkübatörler Nüve'den, su banyosu Heto TBUS Hetomix'den, spektrofotometreler Shimadzu UV-160 ve Holm&Holby UV 1240'tan, hassas terazi Buch&HGC 2000'den, vorteks ve manyetik karıştırıcı Holm&Holby'den, steril kabin Danlaf'dan, sıcak su banyosu Buch& Holm'dan, çalkalayıcı Labnet'ten, pH metre ATI Orion PerPHeCT'den, otomatik pipetler Eppendorf'tan, Fast prep aleti Bio 101 Savant'tan temin edilerek kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. β -Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti

Termofilik *B. licheniformis* KG9 suşu LB besi yerinde, 55°C'de ve aerobik şartlarda üretildi. Enzim üretimi için optimum zamanı belirlemek için 250 ml erlen mayer içinde 50 ml LB ve LB+%1 laktoz ayrı ayrı eklenerek 121°C'de 30 dk otoklavlandı ve steril edilen LB ve LB+%1 laktoz ortamlarına *B. licheniformis* KG9 ayrı ayrı aktarılarak 55°C'de, 160 rpm'de çalkalamalı su banyosunda üretildi ve her 4 saatte bir örnek alınarak 4-96 saatler arası bakteri üremesi (OD_{600}) spektrofotometrede ölçüldü. Her iki ortamdan elde edilen bakteri kültürü 10 000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüjlendi ve elde edilen süpernatant hem β -galaktosidaz aktivitesi için hem de protein miktar tayininde kullanıldı.

3.2.1.1. β -Galaktosidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

β -Galaktosidaz aktivitesini belirlemede kullanılan ONPG testini uygulamak için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. 100 μ L 1 mM ONPG (50 mM sodyum fosfat (pH

6.0) tamponu içinde hazırlanmış) substrat olarak kullanıldı. Substrat ile 5 µL enzim kaynağı (*B. licheniformis* KG9'dan elde edilen) karıştırılarak 10 dk 60°C'de sıcak su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda reaksiyonu durdurmak için 2 M sodyum karbonat eklenerek β-galaktosidaz enzimin aktivitesi spektrofotometrede 420 nm'de okuma yapılarak ölçüldü.

Protein miktar tayini Lowry metoduna göre yapıldı. Öncelikle konsantrasyonunu bildiğimiz standart protein çözeltisi (1 mg/mL BSA) hazırlandı. Bu standart çözeltilerden faydalanarak konsantrasyonunu bilmediğimiz çözeltilerdeki protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplandı. Bunun için artan konsantrasyonlarda hazırlanan standart ve 50 µL enzim çözeltisi alınarak tüplerin hepsine 5 mL alkalın çözeltisi (Ek 1) eklendi ve 15 dk 40°C'de bekletildikten sonra tüplerin hepsine 1:1 oranında seyreltilmiş 500 µL Folin reaktifi (FCR) eklendi ve 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü.

Ünite enzim, belirli şartlar altında (60°C, 0.1 M sodyum fosfat tamponu pH 6.0) 1 µM ONPG substratından 1 dakikada o-nitrophenol salınmasına yol açan enzim miktarı olarak tanımlanır.

3.2.2. *B. licheniformis* KG9'dan Kromozomal DNA İzolasyonu ve RNA'dan Arındırılması

B. licheniformis KG9 bakterisi LB besi yerinde aerobik şartlarda 55°C'de üretilir. Üretilen bakteriden kromozomal DNA Ek 2'de belirtilen çözeltiler kullanılarak Marmur'a (1961) göre izole edildi. Spektrofotometrede DNA'nın miktarı ve saflık derecesi ölçülerek PCR reaksiyonu için hazır hale getirildi.

3.2.2.1. Kromozomal DNA izolasyonu

500 mL *B. licheniformis* KG9 kültürü hazırlandı.

1. 500 mL kültür 10 000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek pelettteki hücreler toplandı.



2. Pelet 10 mL TE tamponu (Ek 2.4) ile yıkandı, 50 mL FALCON tüplere süspansiyon hücreler transfer edilerek 10 000 rpm'de santrifüj edildi.

(Pelet dondurucuda -20°C'de saklanabilir.)



3. MATERYAL VE METOT

3. Pelete 3 mL STET tamponu (Ek 2.5) (Lizozim (Ek 2.1) içeren) eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.



4. 750 µL %10 SDS (Ek 2.6) eklendi, dikkatli bir şekilde karıştırılarak 30 dk 37°C'de ve ardından 65°C'de 30 dk inkübe edildi.



5. 10 mL steril saf su ilave edildi.



6. 5 mL fenol (Ek 2.2) eklenerek dikkatli bir şekilde karıştırılarak 10 dk 10 000 rpm'de 4°C'de santrifüj edildi.



7. 10 mL kloroform/izoamil alkol (Ek 2.3) eklenerek dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve 6. adım tekrar edildi.



8. Kloroform ekstraksiyonu 3 defa tekrar edildi ve su fazı yeni bir tüpe aktarıldı.



9. 1/10 hacim 5 M NaCl (Ek 2.7) eklenerek karıştırıldı ve 1 hacim izopropanol eklenerek tüp birkaç defa ters düz edilerek karıştırıldı ve beyaz ip şeklinde DNA'nın çökeldiği görüldü.



10. DNA plastik öze etrafında döndürülerek toplandı.



11. %70 EtOH ile 3 defa yıkandı.



12. Öze yaklaşık 10-15 dk havayla kurutuldu. Özedeki DNA 500 µL TE tamponuyla çözüldü.



13. 1 µL RNAaz R (10mg/mL) (Ek 2.8) eklendi ve 1 gece buzdolabında bekletildi.



14. DNA miktarı Nano Drop ND-100 spektrofotometrede ölçülerek hesaplandı.

3.2.2.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA konsantrasyonunu hesaplamak ve saflığının kontrolü için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bunun için, DNA örneği 100X seyreltilerek (990 µL Milli Q su ve 10 µL DNA örneği) kullanıldı, spektrofotometrede kör olarak 10 mL TE tamponu ve 990 mL Milli Q su karışımı kullanıldı. 260 nm ve 280 nm’de kör ve DNA örneğinin absorbansları ayrı ayrı ölçüldü.

DNA’nın saflığının kontrolü için %1 agaroz jel elektroforezinde yürütülerek Ek 3’deki çözeltiler kullanılarak analiz edildi.

3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Belirlenen hacim için gerekli miktarda SeaKem® GTG® saf agaroz tartılarak bir erlen mayer içerisine üzerine hesaplanan hacimde 1X TAE tamponu (Ek 3.1) eklendi ve alev üzerinde eriyinceye kadar tutuldu. Elle tutulacak sıcaklığa kadar (45-50°C) soğuduktan sonra son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde EtBr çözeltisi (Ek 3.2) ilave edildi. Jel kabına dikkatli bir şekilde dökülerek jel tarağı yerleştirildi ve donması için yaklaşık 40 dk beklendi. Jel elektroforez tankına alınarak üzeri örtülene kadar 1X TAE tamponu ilave edildi. Tarak çıkarılarak oluşan kuyulara DNA örneği (3 µL BFB ve 10 µL DNA) yerleştirildi. DNA büyüklüğünü hesaplayabilmek için kuyulardan birine DNA standardı (Ek 3.3) (4 µL) yüklendi. Jeldeki moleküllerin elektriksel alanda ilerlemesi sağlanarak ve yeterli ilerlemeden sonra akım kesilerek jel 10 dk saf suda bekletildi ve translüminatör aracılığıyla jeldeki bantlar gözlemlendi.

3.2.3. *B. licheniformis* KG9 Bakterisine ait β -Galaktosidaz Geninin

(β -gal) *E. coli*’ye Aktarılması

B. licheniformis KG9 bakterisine ait β -galaktosidaz geninin (β -gal) *E. coli*’ye aktarılması için iki farklı yöntem kullanıldı. Bunlar:

1. Fonksiyona dayalı gen izolasyonu,
2. Sekansa dayalı gen izolasyonudur.

3.2.3.1. Fonksiyona Dayalı Gen İzolasyonu

B. licheniformis KG9'den elde edilen kromozomal DNA ve klonlamada kullanılacak vektör (pUC18) DNA'sı restriksiyon enzimleri ile kısmi olarak kesildi ve Schmidt ve Stougaard (2010)'a göre klonlama gerçekleştirildi.

3.2.3.1.(1) Kromozomal DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kısmi

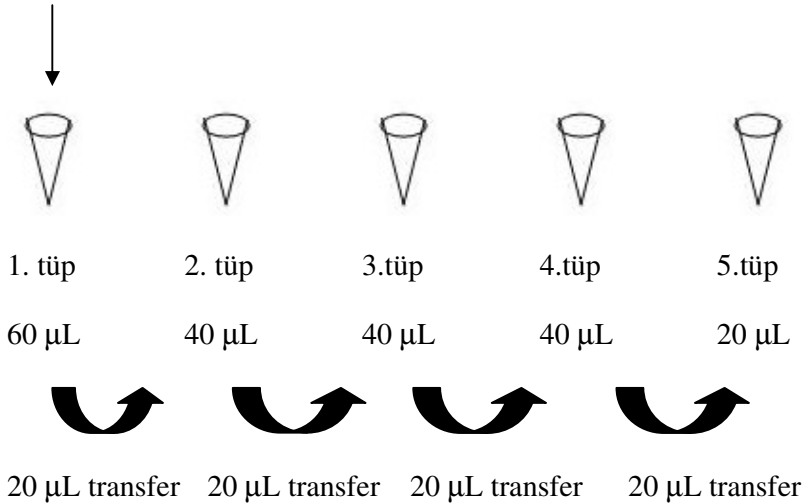
Olarak Kesilmesi

B. licheniformis KG9'a ait kromozomal DNA 3.2.2.1'de belirtildiği gibi hazırlandı ve *Sau3A* restriksiyon enzimi ile kısmi olarak kesildi. *Sau3A* endonükleazı genom üzerinde 5'-GATC-3' dizilerini tanıyan ve DNA'yı keserek yapışkan uç oluşturan bir enzimdir. *B. licheniformis* KG9'a ait kromozomal DNA'nın *Sau3A* restriksiyon enzimi ile kısmi kesim işlemi aşağıda belirtilmiştir.

	<u>Örnek 1</u>	<u>Örnek 2</u>
Kromozomal DNA (10 µg)	5 µL	20 µL
NEB Restriksiyon Tamponu (10X)	20 µL	20 µL
NEB BSA (100X)	2 µL	2 µL
Steril MQ su	173 µL	158 µL

Reaksiyon mikrosantrifüj tüplerinde ve buz üzerinde ayrı ayrı ve aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

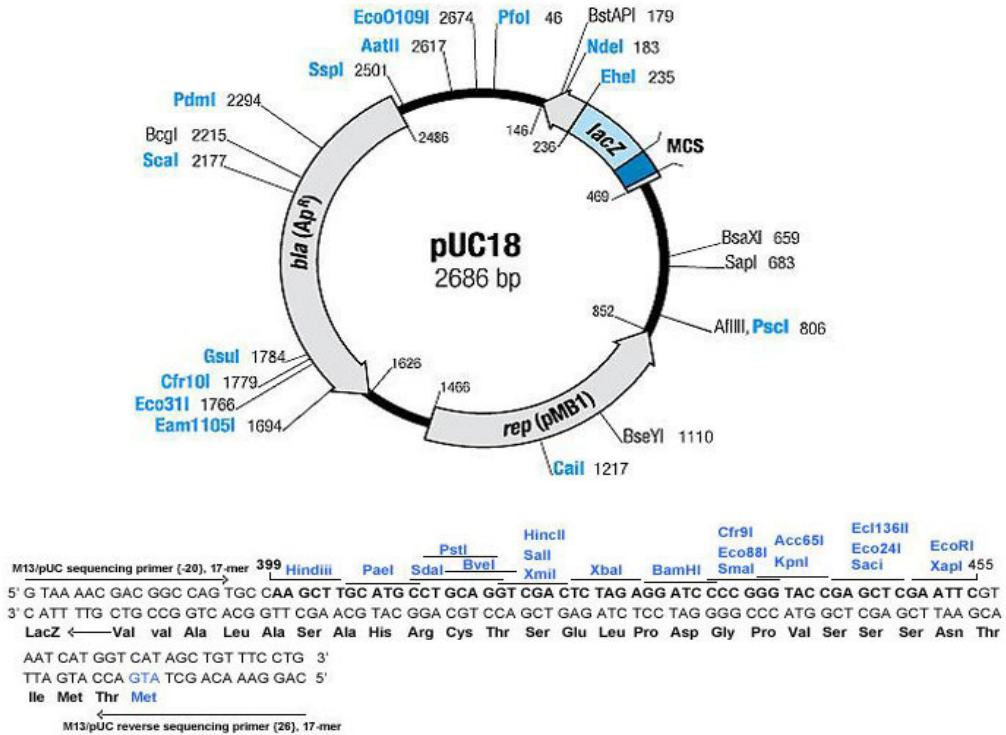
1. 4,5 µl *Sau3A* 1. tüpe eklendi, karıştırıldı ve seyreltme yapıldı.



2. Eppendorf Thermomixer 37°C ve 65°C'ye ayarlandı ve bütün tüpler önce 37°C'de 8 dk inkübe edildi.
3. Bütün tüpler hemen arkasından 65°C'de 8 dk inkübe edildi.
4. Bütün tüplerdeki örneklerden 5 µL yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 1 µL BFB eklendi ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.
5. Jel UV altında translüminatörde görüntülendi ve standarda göre 2-10 kb büyüklüğünde olan DNA fragmentleri kesildi, yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve -20°C'de saklandı.

3.2.3.1.(2) pUC18 Klonlama Vektörünün Ligasyona Hazırlanması

E. coli'den pUC18 plazmit DNA'sı klonlama için kullanılmıştır. pUC18 plazmitinin yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir. pUC18 plazmiti küçüktür (2686 bç) ve bu nedenle daha büyük insert DNA parçalarını taşıyabilir. Ayrıca pUC18 plazmitinin çoklu klonlama bölgesi (polilinker) *E. coli*'nin lac Z geni içerisinde yer almaktadır. Böylelikle polilinker bölgeye sokulan DNA, lacZ geninin bozulmasına sebep olarak rekombinant DNA'yı taşıyan hücrelerin kolaylıkla tanınmasını sağlamaktadır.



Şekil 3.1. pUC18 Plazmitinin yapısı (2686 bç)

pUC18 plazmit DNA'sı *BamHI* endonükleaz enzimi ile kesilerek düz zincir (doğrusal) haline getirilmiştir. *BamHI* endonükleazı genom üzerinde 5'-GGATCC-3' dizilerini tanıyan ve 3. pozisyonundaki Sitozin (C) ile 4. pozisyonundaki Guanin (G) bazları arasından DNA'yı keserek yapışkan uç oluşturan bir enzimdir. pUC18 plazmit DNA'sının *BamHI* endonükleaz ile kesim reaksiyonu bileşenleri aşağıda belirtilmiştir.

	<u>Örnek 1</u>	<u>Örnek 2</u>
Plazmit DNA (pUC18)	5 µL	20 µL
<i>BamHI</i> Tamponu (10X)	10 µL	10 µL
NEB BSA (100X)	1 µL	1 µL
Steril MQ su	80 µL	65 µL
<i>BamHI</i> enzim (20 U/ µL)	2 µL	2 µL
Shrimp alkalın fosfat (1 U/ µL)	5 µL	5 µL

Reaksiyon mikrosantrifüj tüpünde ve buz üzerinde hazırlandı ve 37°C'de 6 saat bekletildi. Süre sonunda 5 µL defosforilasyon tamponu ve 5 µL alkalın fosfat eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen örneklerin 5 µL'si alınarak DNA standardı ile %1 w/v'lik agaroz jelde incelendi. Doğrusal vektör bandı jelden kesilerek saflaştırıldı.

3.2.3.1.(3) Kromozomal DNA ve Vektör DNA'sının Jelden Saflaştırılması

B. licheniformis KG9'dan elde edilen ve kısmi olarak *Sau3A* restriksiyon enzimiyle kesilen kromozomal DNA'sı ile *BamHI* ile kesilen pUC18 plazmit DNA'sı agaroz jelde yürütüldükten sonra steril bistüri yardımıyla jeldeki uygun bantlar kesilerek steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve saflaştırma işlemi için QIAGEN jel ekstraksiyon kiti kullanıldı. Mikrosantrifüj tüplerine aktarılan jel ağırlığı hassas terazide ölçüldü ve üzerine 3 hacim olacak şekilde QC tamponu ile 1 hacim izopropanol eklenerek 50°C'de 10 dk inkübe edildi ve arada bir jelin tamamen çözünüp çözünmediği kontrol edilerek vortexlendi. Jel tamamen çözüldükten sonra reaksiyonun rengi kontrol edildi (Eğer karışımın rengi turuncu ise karışıma 10 µL 3 M sodyum asetat eklenmelidir).

Karışım QIAquick spin kolon tüplerine (2 mL toplama tüplerinin içinde bulunan) aktararak DNA'nın spin kolon tüplerinin filtresine tutunması sağlandı ve 1 dk 10 000 rpm'de santrifüj edildi ve toplama tüpünde santrifüj sonrası elde edilen sıvı atılarak spin kolon tüplerine 0.5 mL QC tamponu eklendi. Daha sonra tüpler 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek tekrar toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve spin kolon tüpleri 0.75 mL PE tamponuyla yıkanarak 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplanan sıvı atıldı ve aynı toplama tüpü kullanılarak 1 dk daha santrifüj edildi. QIAquick spin kolon tüpleri yeni steril toplama tüplerinin içine bırakıldı ve 40 µL steril saf su spin kolon tüplerinin merkezine doğru eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon süresinden sonra 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve toplama tüpünde elde edilen sıvı daha sonraki işlemlerde kullanıldı.

3.2.3.1.(4) β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) ile pUC18 Plazmit DNA'sının Ligasyonu

Yukarıdaki uygulamalar ile ligasyona hazır hale getirilen *B. licheniformis* KG9'dan elde edilen ve kısmi olarak *Sau3A* ile kesilen 500 ng kromozomal DNA ile *BamHI* ile kesilen 50 ng pUC18 plazmit DNA'sı aşağıda belirtilen şekilde ligasyona bırakılmıştır.

50 ng defosforile edilmiş *BamHI* ile kesilmiş plazmit DNA



500 ng *Sau3A* ile kısmi olarak kesilmiş kromozomal DNA



Ligasyon tamponu



T4 DNA ligaz



H₂O



15°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi.

Ayrıca ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne kromozomal DNA eklenmeyerek vektör DNA'sının kendi kendine (self) ligasyon yapması da sağlandı. Transformasyondan önce

ligasyon karışımı etanol çöktürmesine tabi tutuldu. Bunun için 2.5 µL 3 M sodyum asetat (pH 5.2 1/10 hacim) ve 60 µL %96'lık etanol (2-3 hacim) ligasyon karışımına eklendi ve 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant dikkatlice atıldı ve pelet %70'lik etanol ile yıkanarak 10 000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet kurutuldu. Kuruyan pelet 5 µL steril suda çözüldü.

3.2.3.1.(5). Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon

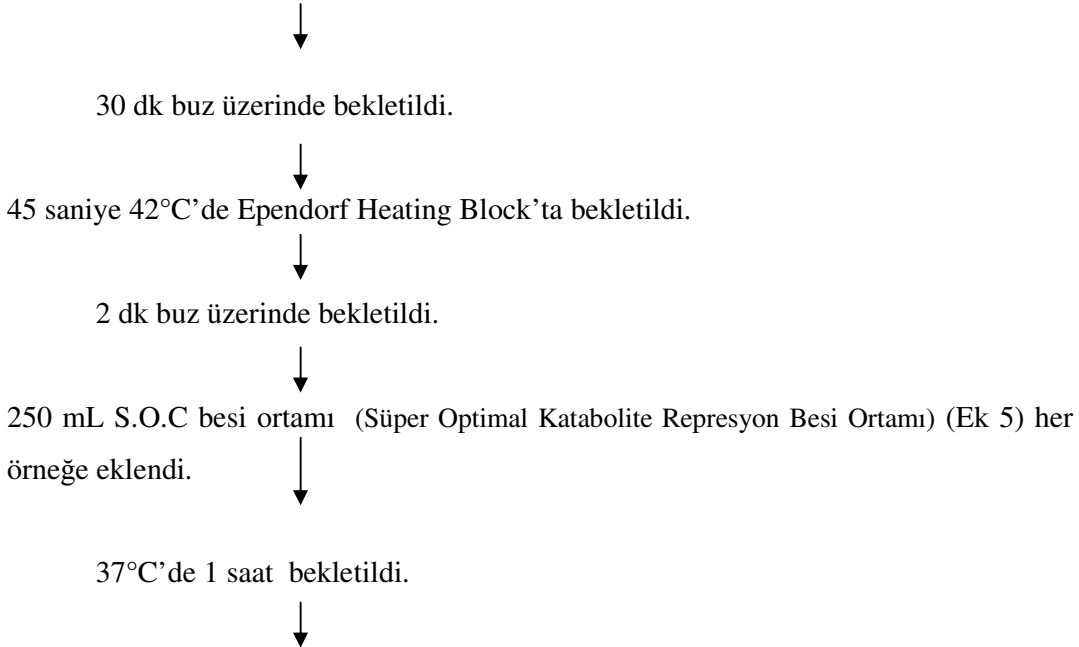
Kompetent bakteri oluşturmada kullanılan *E. coli* DH10B suşu, Ek 4'te verilen protokol uygulanarak kompetent hale getirilmiştir.

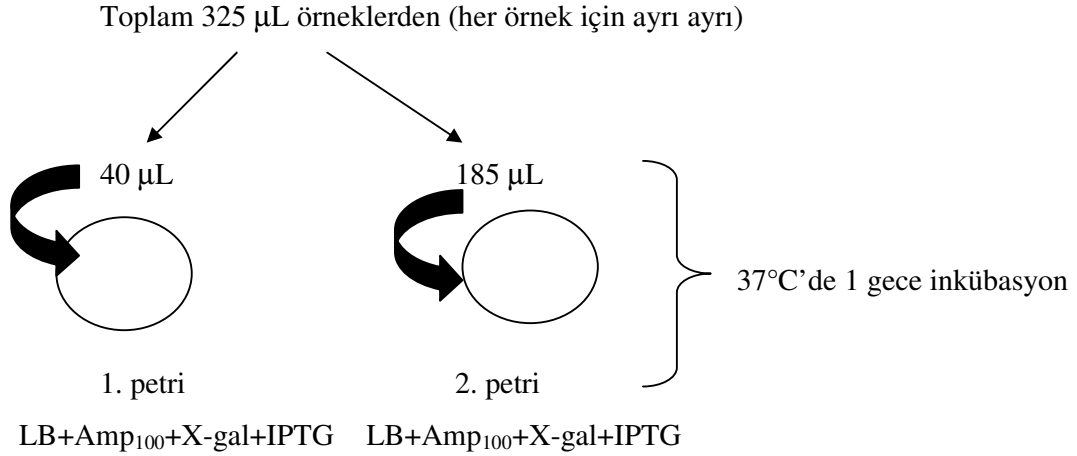
E. coli TOP 10 Kompetent bakterinin genotipi şöyledir: F-*mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*

Ligasyon örnekleri transformasyondan önce 65°C'de 15 dk bekletilerek inaktif hale getirildi. İnaktif hale getirilen self ligasyon ve ligasyon örnekleri hazırlanan kompetent bakterilerle transformasyona tabi tutuldu.

1 µL self ligasyon örneği + 75 µL TOP 10 kompetent hücre

1 µL ligasyon örneği + 75 µL TOP 10 kompetent hücre





3.2.3.1.(6) pUC18 [pUC18 + β -Galaktosidaz Geni (β -gal)]

Plazmitini Taşıyan *E. coli* Kolonilerinin Belirlenmesi

Transformasyon tüpündeki sıvıların tamamı önce ayrı ayrı S.O.C sıvı besi yerlerine boşaltılarak 37°C'de 1 saat süreyle üretildi. Bu uygulama ile, kompetent hale getirme işlemleriyle hassaslaşmış olan bakterilerin normal hale dönmeleri ve bakterinin bir saat sonra inoküle edileceği antibiyotikli besi yerine adaptasyonu sağlanmıştır. Bir saat sonunda bakteriler alınarak LB/Amp₁₀₀/ X-gal/ IPTG petrilere (Ek 6) steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekildi ve plaklar 5-10 dk kurutulduktan sonra ters çevrilerek 37°C'de 1 gece üremeye bırakıldı. Ertesi gün transformasyon plaklarında rekombinant (geni almış olan) ve non-rekombinant (geni almadan kapanmış olan) plazmit DNA'lar ile transforme olmuş olan bakteriler belirlendi. Rekombinant koloniler steril kürdan yardımıyla seçilerek 10 mL LB/Amp₁₀₀ besi yeri bulunan Kmax tüplerine aktarıldı ve 37°C'de çalkalamalı olarak 1 gece üretildi ve plazmit izolasyonu QIAGEN mini-prep kitin yardımıyla aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Kmax tüplerindeki kültür 10 000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Pelet 250 μL QIAGEN mini-prep kitinde bulunan P1 tamponunda çözüldü ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

↓
250 μL P2 tamponu eklenerek dikkatli şekilde tüp ters düz edildi.

↓
350 μL N3 tamponu eklendi ve tüp dikkatlice ters düz edildi.

13 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.



Süpernatant QIAprep spin kolonunun bulunduğu tüplere aktarıldı ve 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.



500 µL PB tamponu eklenerek 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.



750 µL PE tamponu eklenerek 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

QIAprep spin kolon tüpleri yeni steril toplama tüplerinin içine bırakıldı ve 50 µL steril saf su spin kolon tüplerinin merkezine doğru eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon süresinden sonra 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve toplama tüpünde elde edilen sıvıdaki plazmit DNA miktarı Nano-Drop ile ölçülerek agaroz jelde saflığı test edildi. Elde edilen örnekler dizi analizi için GATC'ye (www.gatc.biotech.com) gönderildi.

3.2.3.2. Sekansa Dayalı Gen İzolasyonu

β-Galaktosidaz geninin diğer bakteri türlerinde karşılaştırılması için DNA sekans analizi Schmidt ve Stougaard (2000)'a göre yapıldı. Termofilik bakterilere ait β-galaktosidaz geni CLC Workbench v. 4.0 Software (CLC bio, Aarhus, Denmark) ve NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) programı ile analiz edildi.

3.2.3.2.1. β-Galaktosidaz Geninin (*β-gal*) PCR ile Amplifikasyonu

B. licheniformis KG9'un kromozomal DNA'sı üzerinde bulunan β-galaktosidaz geni (*β-gal*) PCR ile amplifiye edilerek değişik vektörler ile ligasyona tabi tutuldu.

3.2.3.2.1.(1). β-Galaktosidaz Geninin (*β-gal*) Amplifikasyonu için

Primer Dizaynı

B. licheniformis KG9'a ait β-galaktosidaz geninin baz dizileri incelenerek *β-gal* 1, *β-gal* 2, *β-gal* 3, *β-gal* 4 genlerinin amplifikasyonu için uygun primer bölgeleri *lac*

promotör bölgelerinin nükleotid sekansları Phan Trân ve ark. (1998)'na göre belirlenmiştir.

3.2.3.2.1.(2). PCR Programlama

Primerlerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık (T_m =Erime Sıcaklığı), primer uzunlukları dikkate alınarak her iki primer için de ayrı ayrı hesaplandı.

Primerlerin T_m değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

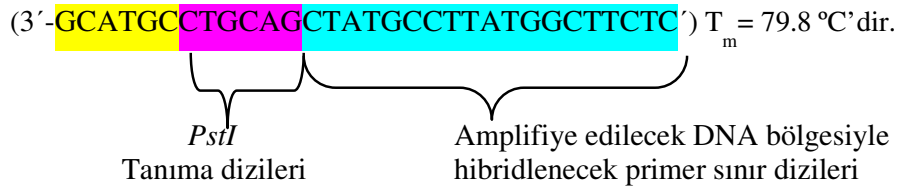
$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

A:

Primer B.lich- β -gal2-p1 için

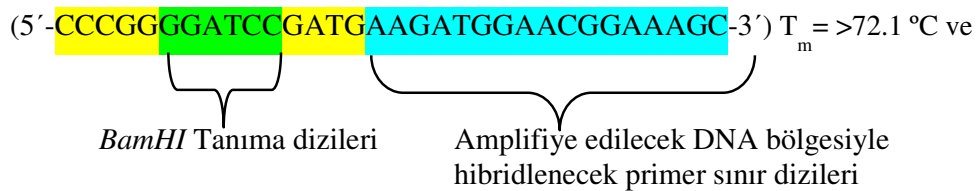


Primer B.lich- β -gal2-p2 için

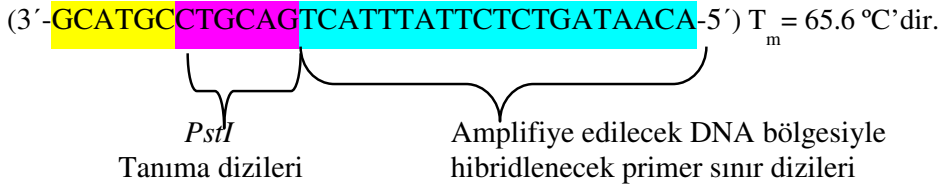


B:

Primer B.lich- β -gal3-p1 için

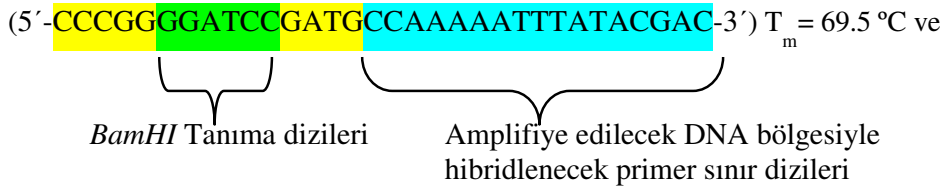


Primer B.lich- β -gal3-p2 için

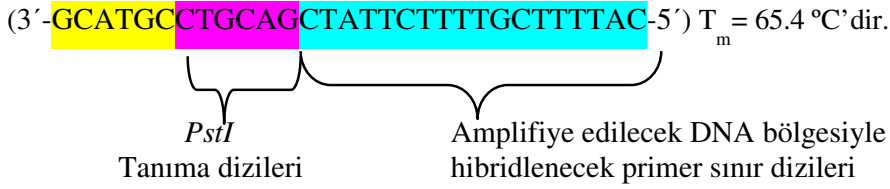


C:

Primer B.lich- β -gal4-p1 için



Primer B.lich- β -gal4-p2 için



Şekil 3.2. β -Galaktosidaz (β -gal) geninin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri ve T_m değerleri

Yukarıdaki formülle yapılan hesaplama göre tasarlanan primerler ve bu primerlerin T_m değerleri Şekil 3.2'de verilmiştir. Bu durumda PCR'da yapışma sıcaklığı her iki primer için de 50°C alınmıştır (yapışma sıcaklığı hesaplanan T_m değerinin aşağısında alınmaktadır). Bu açıklamalar doğrultusunda hazırlanan Thermal Cycler programı Çizelge 3.1.'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. β -Galaktosidaz (β -gal) geninin amplifikasyonu için hazırlanan Thermal Cycler programı			
Program	Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)	Süre	Döngü sayısı (cycle)
1	94	4 dk	1
2	94	30 sn	35
3	50	1 dk	35
4	72	1 dk	35
5	72	7 dk	1
6	14	sınırsız	1

3.2.3.2.1.(3). PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

Günlük stoklar hazırlanarak mümkün olduğu kadar steril şartlarda ve buz üzerinde, en son enzim ilave edilecek şekilde PCR reaksiyonu hazırlandı. PCR ürünü oluşturmak için Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. β -Galaktosidaz (β -gal) geninin amplifikasyonu için hazırlanan PCR reaksiyonu bileşenleri aşağıda verilmiştir.

<u>Miktar</u>	<u>(X6)</u>	<u>Kimyasal</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
2.5 μ L	15 μ L	10X PCR tamponu (15 mM MgCl ₂)	1X
2.5 μ L	15 μ L	10 mM dNTP	200 mM
1.25 μ L	7.5 μ L	Primer 1	0.5 mM
1.25 μ L	7.5 μ L	Primer 2	0.5 mM
0.25 μ L	1.5 μ L	Taq DNA polimeraz	0.05 U/ μ L
16.25 μ L	97.5 μ L	Sigma H ₂ O	

Yukarıdaki şekilde hazırlanan örneklerden 0.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 24 μ L aktarıldı ve 1 tüp kontrol olacak şekilde (üzerine DNA eklenmemiş) ayarlanarak diğer tüplerin üzerine 1 μ L (10-20 ng) kromozomal DNA eklendi. Kromozomal DNA eklenmeden önce 100X sulandırıldı. Hazırlanan reaksiyon karışımı önceden ayarlanmış olan PCR cihazının örnek bloğuna yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı.

3.2.3.2.1(4). PCR Ürününün Elektroforezi ve Agaroz Jelden Arıtılması

PCR işlemi sonunda PCR ürünleri agaroz jel elektrofrezine tabi tutuldu. *B. licheniformis* KG9 bakterisine ait β -galaktosidaz geni (β -gal)'nin elektrofrez ve agaroz jelden arıtılması 3.2.3.1.(3)'e göre yapıldı.

3.2.3.3. β -Galaktosidaz geninin (β -gal) *E. coli*'ye Aktarılması

3.2.3.3.(1) PCR Ürünlerinin ve pUC18 Δ lacZ Klonlama Vektörünün

Ligasyona Hazırlanması ve Ligasyon

B. licheniformis KG9 bakterisine ait 3 farklı β -galaktosidaz geni (β -gal 2, β -gal 3 ve β -gal 4) için tasarlanan primerlerle elde edilen PCR ürünleri (PrA: Primer_B.lich-

3. MATERYAL VE METOT

β -gal2 PCR ürünü, **PrB**: Primer_B.lich- β -gal3 PCR ürünü, **PrC**: Primer_B.lich- β -gal4 PCR ürünü) agaroz jelden arıtdıktan sonra *BamHI* ve *PstI* endonükleaz enzimi ile kesildi. *BamHI* enzimi genom üzerinde 5'-GGATCC-3' dizilerini tanıyan ve yapışkan uç oluşturan restriksiyon endonükleazıdır. *PstI* endonükleaz enzimi genom üzerinde 5'-CTGCA/G-3' dizilerini tanır ve yapışkan uç oluşturur. Klonlama vektörü olarak 3.2.3.1.(2)'de özellikleri belirtilen pUC18 plazmiti kullanıldı ancak bu plazmitte *LacZ* geni çıkarılmıştır (pUC18 Δ lacZ). Klonlama vektörü de *BamHI* ve *PstI* endonükleazlarıyla aşağıda belirtildiği gibi kesildi.

<u>Bileşenler</u>	<u>pUC18ΔlacZ</u>	<u>PrA</u>	<u>PrB</u>	<u>PrC</u>
Plazmit DNA (pUC18 Δ lacZ)	4 μ L	-	-	-
PrA	-	10 μ L	-	-
PrB	-	-	10 μ L	-
PrC	-	-	-	10 μ L
NEB BSA (10X)	2 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L
NEB Tamponu 3 (10X)	2 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L
Steril MQ su	8 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
<i>BamHI</i> enzim	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
<i>PstI</i> enzim	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L

Örnekler 37°C'de 1 gece inkübe edildi ve inkübasyon süresi sonunda duble kesilen PCR ürünleri ve vektör DNA'sı 3.2.3.1.(3)'te belirtilen protokol ile yıkandı. Bu protokol hem DNA'yı agaroz jelden arındırmak hem de enzimatik reaksiyonlardan DNA'yı kurtarmak için kullanılır. Yıkama işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezine tabi tutularak kontrol edildi. Elde edilen duble kesilen örnekler ve vektör DNA'sı ligasyona aşağıda belirtilen şekilde tabi tutuldu.

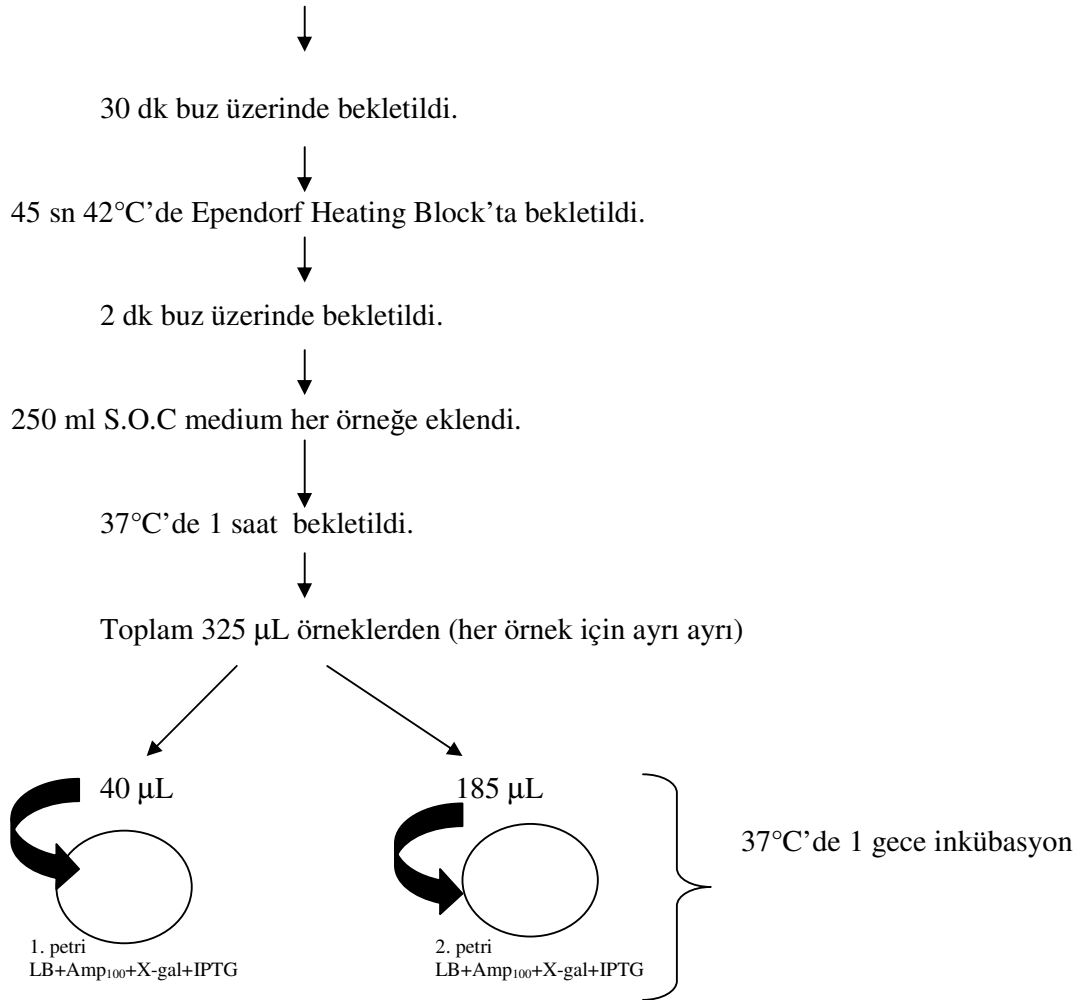
<u>Bileşenler</u>	<u>pUC18ΔlacZ</u>	<u>PrA</u>	<u>PrB</u>	<u>PrC</u>
Plazmit DNA (kesilmiş)	3 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L
PrA (kesilmiş β -gal 2 PCR ürünü)	-	14 μ L	-	-
PrB (kesilmiş β -gal 3 PCR ürünü)	-	-	14 μ L	-
PrC (kesilmiş β -gal 4 PCR ürünü)	-	-	-	14 μ L

Ligasyon Tamponu (10X)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Steril MQ su	14 µL	-	-	-
T4 DNA ligaz	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL

Hem self ligasyon hem de diğer ligasyon örnekleri (PrA, PrB ve PrC) 15°C'de 1 gece ligasyon için inkübe edildi. Ligasyon süresi sonunda örnekleri 65°C'de inaktive etmek için 15 dk inkübe edildi ve aşağıda belirtildiği gibi transformasyona tabi tutuldu.

20 µL self ligasyon örneği + 50 µL TOP 10 kompetent hücre

20 µL ligasyon örneği + 50µL TOP 10 kompetent hücre



3.2.3.3.(2) pUC18 Δ lacZ [pUC18 Δ lacZ+ β -Galaktosidaz Geni (β -gal)]

Plazmitini Taşıyan *E. coli* Kolonilerinin Belirlenmesi

Transformasyonun kontrolü ve rekombinant *E. coli* kolonilerinin belirlenmesi 3.2.3.1(6)'da belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Mavi koloniler seçilerek hem LB+Amp₁₀₀+X-gal+IPTG içeren katı ortama hem de LB+Amp₁₀₀ içeren sıvı ortama aktarıldı ve 37°C'de 1 gece inkübe edildi. LB+Amp₁₀₀ ortamında üretilen kolonilerden 3.2.3.1(6)'da belirtildiği gibi mini-prep yöntemi ile plazmit DNA izole edilerek *Bam*HI ve *Pst*I restriksiyon enzimleriyle kesildi.

<u>Bileşenler</u>	<u>Miktar</u>
Mini prep örnekleri	2 μ L
NEB BSA (10X)	1 μ L
NEB Tamponu 3 (10X)	1 μ L
Steril MQ su	4 μ L
<i>Bam</i> HI enzim	1 μ L
<i>Pst</i> I enzim	1 μ L

Mini prep örnekleri daha sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi ve inkübasyon sonunda agaroz jel elektroforezine tabi tutularak kontrol edildi.

3.2.3.4. Rekombinant *B. licheniformis* KG9 β -Galaktosidazının

Ekspresyonu

3.2.3.3.(2)'de belirtilen şekilde agaroz jel elektroforezine tabi tutularak kontrol edilen ve uygun bantların elde edildiği koloniler master plaktan seçilerek 100 ml'lik erlen mayerlerde hazırlanan LB+Amp₁₀₀ sıvı ortama aktarıldı ve 37°C'de gece boyunca inkübe edildi. Üretilen kültürlerden 1mL alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine %30'luk gliserol eklenerek stok hazırlandı. Daha sonra bütün kültürlerle IPTG (10 mM stok çözeltiden) eklendi ve 20°C'de 20 saat daha üretildi. Bu süre sonunda kültürlerden Fast Prep yöntemiyle hücre içi enzim elde edildi. Fast-Prep yöntemi aşağıda belirtilmiştir.

Kültürlerden 8-10 mL alınarak 10°C’de, 4 000 rpm’de 30 dk santrifüj edildi.



Elde edilen rekombinat hücrelerin bulunduğu pelet 0.5 mL 0,1 M sodyum fosfat (pH 7.6) tamponunda çözüldü.



0.5 mL cam boncuk (300 mm) mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine çözünen pelet ilave edildi ve hücreler lize edildi.



Fast Prep aletinde 5.5 V’ta 25 sn muamele edildi.



2 dk buz üzerinde bekletilip tekrar Fast-Prep aletine bırakıldı ve 14 000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.



Pelet üzerine tekrar 0.5 mL 0.1 M sodyum fosfat eklendi ve yukarıdaki işlemler 3-4 defa tekrar edildi.



Elde edilen süpernatantlardan 3.2.1.1’de belirtildiği gibi β -galaktosidaz aktivitesi belirlendi. Aktivite deneti hem oda ısısında hem de 60°C’de gerçekleştirildi ve sonuçlar mikropleyt okuyucu ile okundu.

3.2.4. DNA Dizi Analizi

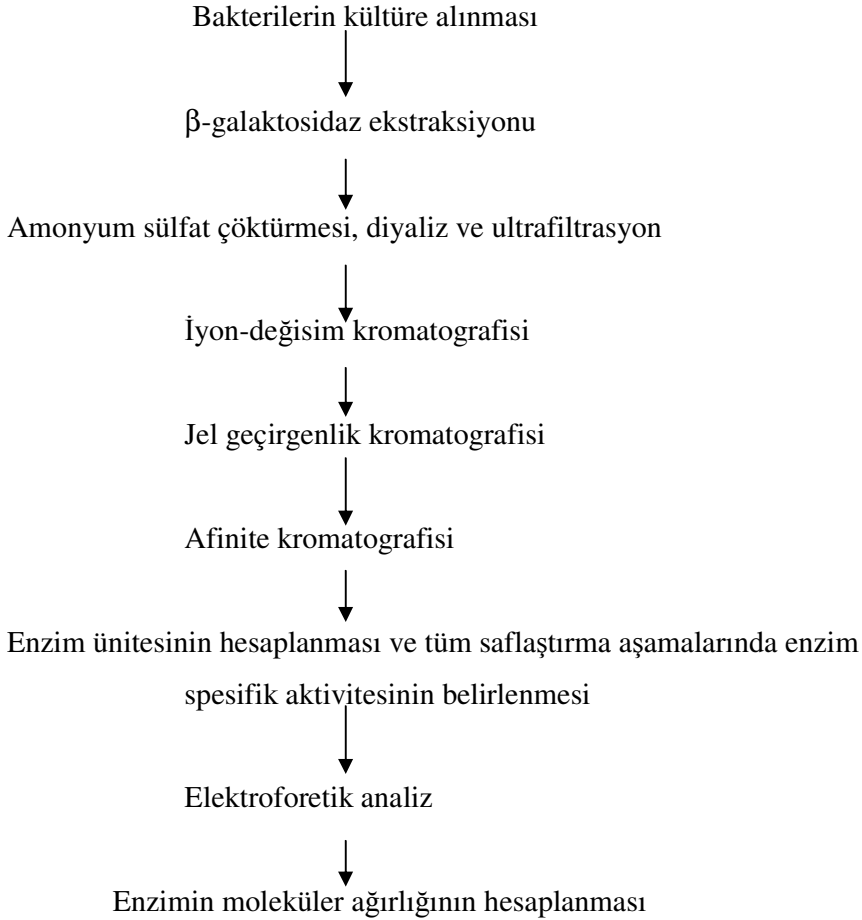
İzole edilen rekombinant plazmitler gen dizi analizleri için GATC (www.gatc.biotech.com) Şirketine (Almanya) gönderildi.

3.2.5. Biyoinformatik İncelemeler

b-gal Gen dizilimleri CLC Workbench v 4.0 Software (CLC bio, Aarhus, Denmark) NCBI (The National Center for Biotechnology Information) web sayfasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) Blast programında incelendi ve diğer *Bacillus* türlerine ait *b-gal* gen dizilimleriyle karşılaştırılarak homoloji yakınlıkları belirlendi.

3.2.6. β -Galaktosidaz Saflaştırılması

B. licheniformis KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazı saflaştırmak için aşağıdaki aşamalar uygulanmıştır.



3.2.6.1. *B.licheniformis* KG9'a Ait Doğal Ekstraselüler β -Galaktosidazın

Saflaştırılması

3.2.6.1.(1) Bakterinin Kültüre Alınması ve Enzim Ekstraksiyonu

B. licheniformis KG9 bakterisi, 200 mL Luria Broth (LB) besi yerinde (Bacto Tripton 10 g/L, Bacto-Yeast Extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0), 55°C'de ve aerobik şartlarda 120 rpm'de çalkalamalı su banyosu kullanılarak 48 saat süreyle üretildi. Bu süre sonunda bakteri kültürü 10 000 rpm' de 15 dk soğutmalı santrifüj kullanılarak santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı ve 1 mL steril mikrosantrifüj tüpüne aktararak -20°C'ye bırakıldı.

3.2.6.1.(2) Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

B. licheniformis KG9'dan elde edilen enzim kaynağı son konsantrasyon %70 oranında olacak şekilde amonyum sülfat azar azar eklenerek buz içeren kap içerisinde magnetik karıştırıcı kullanılarak çöktürme gerçekleştirildi. Çöktürme sonrası oluşan karışım 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi ve pelet üzerine 0.1 M pH 6.0 sodyum fosfat tamponu (Ek 7) eklenerek pelet çözüldü. Çözünen pelet amonyum sülfattan tamamen uzaklaştırılmalıdır. Bunun için diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz için, diyaliz tüpü yeterli uzunlukta kesilerek 1 mM EDTA (Ek 7) içeren çözelti ile 10 dk kaynatıldı, daha sonra saf su ile yıkanarak 10 dk saf su ile kaynatıldı ve yumuşatıldı. Hazırlanan diyaliz tüpü soğuduktan sonra içerisine çöktürme sonu elde edilen çözelti bırakılarak sıkıca bağlandı ve diyaliz işlemi pH 6.0 sodyum fosfat tamponuna karşı 1 gece +4°C'de gerçekleştirildi. Diyaliz sonunda final hacim ölçülerek 1mL steril mikrosantrifüj tüplerine aktararak -20°C'ye bırakıldı. Çözelti içerisindeki proteinleri daha fazla konsantre etmek için karıştırılmalı ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak azot gazı yardımıyla konsantrasyon işlemi gerçekleştirildi. Ultrafiltrasyon sonundaki hacim ölçülerek 1 mL steril mikrosantrifüj tüpüne aktararak -20°C'ye bırakıldı.

3.2.6.1.(3) İyon-Değişim Kromatografisi

İyon-değişim kromatografisi için DEAE-Selüloz kolon dolgu maddesi kullanıldı. DEAE-selüloz kolon dolgu maddesini hazırlamak için; 5 gr DEAE- selüloz üzerine 300 mL 0.1 M NaCl (Ek 7) çözeltisi eklenerek 30 dk pH 13.0 oluncaya kadar yavaş yavaş

karıştırıldı. NaCl çözeltisini uzaklaştırmak ve dolgu maddesini yıkamak için pH 8.0 oluncaya kadar double distile su ile yıkama işlemine devam edildi. Daha sonra 0.1 M HCl (Ek 7) eklenerek 30 dk boyunca pH 1.0 oluncaya kadar yavaş yavaş karıştırıldı. HCl çözeltisini uzaklaştırmak ve dolgu maddesini yıkamak için pH 3.0 oluncaya kadar double distile su ile yıkama işlemine devam edildi. Daha sonra 10X 0.1 M pH 8.0 sodyum fosfat tamponu (Ek 7) ile yıkama işlemine devam edildi. Kullanılacak olan kolon önce saf su ile daha sonra da ultra saf su ile yıkandı. Daha sonra da sodyum fosfat tamponuyla yıkandı. Şişirilen kolon dolgu maddesi karıştırılarak 1.5 X 30 cm cam kolona dikkatlice dolduruldu. Kolon dolgu maddesinin kolona tamamen çökmesi beklendi ve daha sonra tampon çözelti ile yıkandı.

Ultrafiltrasyon ile elde edilen örnekten 2 mL DEAE-selüloz kolona uygulandı. Ne kadar sürede ne kadar tampon ekleneceği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Kolon yarı çapı} \times \text{kolon uzunluğu} \times 3.14 = X \text{ mL}$$

Numune yüklenen kolon, hesaplanan hacim kadar (140.13 mL) önce 0.1 M pH 6.0 sodyum fosfat tamponu ile peristaltik pompa yardımıyla akış hızı 3 mL/dk olacak şekilde ayarlanarak yıkandı. Daha sonra 0.1-1 M NaCl (toplam 50 mL) ile lineer gradiyent hazırlanarak sırayla akış hızı 3 mL/dk olacak şekilde kolondan geçirildi. Daha sonra tekrar 0.1 M pH 6.0 sodyum fosfat tamponu (Ek 7) (140.3 mL) ile yıkandı. Tüm yıkama aşamalarında fraksiyon kollektörü yardımıyla fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlar spektrofotometrede A_{280} 'de protein miktarı ölçüldü. Elde edilen fraksiyonlarda β -galaktozidaz enzim aktivitesine bakıldı. Toplanan fraksiyonlarda enzim aktivitesi elde edilen fraksiyonlar birleştirilerek diyaliz ve ultrafiltrasyon gerçekleştirildi. Ultrafiltrasyon sonundaki hacim ölçülerek 1 mL steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak -20°C 'ye bırakıldı.

3.2.6.1.(4) Jel Geçirgenlik Kromatografisi

Jel geçirgenlik kromatografisi için Sephadex G-75 kolon dolgu maddesi kullanıldı. Sephadex G-75 kolon dolgu maddesini hazırlamak için; 5 gr Sephadex G-75 üzerine 150 mL 0.1 M Tris-asetat pH 7.0 (Ek 7) tamponu eklenerek çözüldü ve kolon dolgu maddesinin şişmesi için yaklaşık 2 saat bekletildi. Kullanılacak olan kolon önce saf su ile daha sonra da ultra saf su ile yıkandı. Daha sonra da sodyum fosfat

tamponuyla yıkandı. Şişirilen kolon dolgu maddesi karıştırılarak 1.5 X 30 cm cam kolona dikkatlice dolduruldu. Kolon dolgu maddesinin kolona tamamen çökmesi beklendi ve daha sonra tampon çözelti ile yıkandı.

Ultrafiltrasyon ile elde edilen örnekten 2.5 mL Sephadex G-75 kolona uygulandı. Ne kadar sürede ne kadar tampon ekleneceği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Kolon yarı çapı} \times \text{kolon uzunluğu} \times 3.14 = X \text{ mL}$$

Numune yüklenen kolon, hesaplanan hacim kadar (140.13 mL) önce 0.1 M pH 6.0 sodyum fosfat tamponu (Ek 7) ile peristaltik pompa yardımıyla akış hızı 3 mL/dk olacak şekilde ayarlanarak yıkandı. Toplanan fraksiyonlar spektrofotometrede A_{280} 'de protein miktarı ölçüldü. Elde edilen fraksiyonlarda β -galaktozidaz enzim aktivitesine bakıldı. Toplanan fraksiyonlarda enzim aktivitesi elde edilen fraksiyonlar birleştirilerek 3.2.6.1.(2)'de belirtildiği gibi diyaliz ve ultrafiltrasyon gerçekleştirildi. Ultrafiltrasyon sonundaki hacim ölçülerek 1 mL steril mikrosantrifüj tüpüne aktararak -20°C 'ye bırakıldı.

3.2.6.1.(5) Affinite Kromatografisi

Affinite kromatografisi için *p*-aminobenzil-1-thio- β -D-galaktopiranosid (PABTG-agaroz) kolon dolgu maddesi kullanıldı. Ultrafiltrasyon ile elde edilen örnekten 2 mL PABTG-agaroz kolonuna uygulandı. Ne kadar sürede ne kadar tampon ekleneceği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Kolon yarı çapı} \times \text{kolon uzunluğu} \times 3.14 = X \text{ mL}$$

Kolon, 50 mM pH 6.0 sodyum fosfat (32.6 mL) ile akış hızı 0.2 mL/dk olacak şekilde yıkandı, 3 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Daha sonra 0.1-1 M NaCl linear gradiyenti oluşturularak 0.2 mL/dk akış hızı ayarlanarak 3 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Kolondan 10 mM ve 100 mM sodyum borat tamponu (pH 6.0) (Ek 7) ile 1 mL/dk akış hızıyla 1 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Elde edilen fraksiyonlarda A_{280} 'de protein miktarı tayini yapılarak sonrasında β -galaktozidaz aktivite tayini yapıldı. Kolona tutunamayan enzimce aktif fraksiyonlar birleştirilerek diyaliz edilerek ultrafiltrasyon ile konsantre edildi.

3.2.6.2. Rekombinant *E. coli*'ye Ait β -Galaktosidazın Saflaştırılması

3.2.6.2.(1) Bakterinin Kültüre Alınması ve Enzim Ekstraksiyonu

Rekombinant koloniler master plaktan seçilerek 900 mL LB+Amp₁₀₀ sıvı ortama aktarıldı ve 37°C'de gece boyunca inkübe edildi. Üretilen kültürlerden 1ml alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine %30'luk gliserol eklenerek stok hazırlandı. Daha sonra bütün kültürlere IPTG (10 mM stok çözeltiden) eklendi ve 20°C'de 20 saat daha üretildi. Bu süre sonunda kültürlerden hücre içi enzim elde etmek için kültür 10 000 rpm'de 20 dk soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Elde edilen pelete ultrasonikasyon yapılarak hücreler parçalandı ve soğutmalı santrifüjde 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan β -galaktosidaz aktivitesi belirlendi. Aktivite gösteren süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı ve 1 mL steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak -20°C'ye bırakıldı.

3.2.6.2.(2) Rekombinant *E. coli*'ye Ait β -Galaktosidazın

Saflaştırma Aşamaları

Rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidaz, 3.2.6.1.(2)'de amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi, 3.2.6.1.(3)'te iyon-değişim kromatografisi, 3.2.6.1.(4)'te jel geçirgenlik kromatografisi ve 3.2.6.1.(5)'te belirtilen affinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırıldı.

3.2.6.3. Elektroforez

Yukarıda belirtilen saflaştırma adımları uygulanan hem *B. licheniformis* KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidazın hem de rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın moleküler ağırlığını ve enzimin aktivitesinin belirlenmesi için doğal jel elektroforezi yapıldı ve iki farklı boyama (Commasie Brilliant Blue ve 6-Bromo-2 naftil- β -D-galaktopiranosid) işlemi uygulandı.

3.2.6.3.(1) Jelin Hazırlanışı

Çalışmamızda %7'lik jel hazırlamak için Ek 8'deki çözeltiler kullanıldı. Ayırma jeli için, 3.5 mL akrilamid / bis akrilamid, 3.75 mL 0.1 M Tris. HCl (pH 8.8), 7.75 mL

saf su, 75 µL %10'luk APS (Amonyum persülfat), 7.5 µL %10'luk SDS, 10 µL TEMED buz içerisinde ve sürekli magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı.

Konsantrasyon jeli için, 520 µL akrilamid/bis akrilamid, 1 mL 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 20 µL %10'luk APS, 4 µL TEMED, 4 µL %10'luk SDS ve 2.44 mL saf sudan oluşan karışım hazırlandı. İşlemler buz içerisinde ve karıştırılarak yapıldı.

İki cam levha arasına 6 cm yükseklikte ayırma jeli döküldü, üzerine pastör pipetiyle, su ile doyurulmuş bütanol eklenerek hava ile teması kesildi. Oda ısısında 30-60 dk polimerizasyon gerçekleşti. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra bütanol distile su ile yıkandı. Kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi ve konsantrasyon jeli döküldü. Hava ile temasını kesmek için, üzerine bütanol eklendi. Oda sıcaklığında 30-45 dk sonra polimerizasyon gözlendi.

3.2.6.3.(2) Elektroforez İşlemi

Elektroforez işlemi için Ek 7'de belirtilen çözeltiler kullanılarak iki ayrı jel (%7'lik) sistemi hazırlandı. Jellerden biri Commasie Brilliant Blue boyama için, diğeri de 6-Bromo-2 naftil- β-D-galaktopiranosid (BNG) boyama için kullanıldı. İki jel için Novex Sharp prestained protein karışımı (3.5-260 kDa) standart protein olarak kullanıldı. Standart proteinden 20 µL alındı ve üzerine 15 µL izboya eklendi. Saflaştırma sonucu elde edilen numunelerden jele yükleme yapılırken eşit konsantrasyonda (0.3 mg) protein yüklemesi yapıldı. Bunun için rekombinant *E. coli*'ye ait ham özütten 11.6 µL, çöktürme ve diyaliz işlemi sonucu elde edilen çözeltiden 19 µL, iyon-değişim kromatografisi sonucu elde edilen numuneden 37 µL ve jel-değişim kromatografisinden elde edilen numuneden 70 µL alınarak ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplerine konuldu. *B. licheniformis* KG9'a ait ham özütten 22.2 µL, çöktürme ve diyaliz işlemi sonucu elde edilen çözeltiden 35 µL, iyon-değişim kromatografisi sonucu elde edilen numuneden 52.5 µL ve jel-değişim kromatografisinden elde edilen numuneden 70µL alınıp ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplerine konularak tüm numunelerin üzerine 15 µL iz boya eklendi. Elektroforez yapılacağı zaman jelin üzerindeki su alındı. Örnekler kuyucuklara sırasıyla konuldu. 1 mm'lik jele 150 V (25 mA) akım verildi, yaklaşık 2 saat sonra elektroforez işlemi tamamlandı. Camlar arasındaki jel çıkarıldıktan sonra jellerden biri BNG boyama için %10 metanol içeren 0.1 M sodyum fosfat pH 6.0'da %0.025 BNG'de inkübe edildi.

İnkübasyon 60°C’de 30 dk uygulandı. İnkübasyondan sonra aktivite jeli, distile suya %0.125’lik Diazo-blue B eklenerek hazırlanan çözelti ile 2-5 dk muamele edildi. Enzimin varlığı mor bir bandın oluşmasıyla tespit edildi. Daha sonra jel %75’lik asetik asit içinde fiske edildi ve durulandı. Diğer jel ise 0.1 M sodyum fosfat (pH 6.0) tamponunda 30 dk inkübe edildi ve Commasie Brilliant Blue ile 1 gece inkübe edildikten sonra destatin çözeltisi ile boya çıkıncaya kadar yıkandı. Saflaştırma işlemleri sonunda elde edilen proteinin molekül ağırlığı standart proteinden faydalanılarak hesaplandı.

3.2.7. Enzim Karakterizasyonu

3.2.7.1. Optimum Sıcaklık Tayini

β -Galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi hem saflaştırma öncesi hem de saflaştırma adımlarından sonra araştırılmıştır. *B. licheniformis* KG9’a ait saflaştırma öncesi ve saflaştırma sonrası elde edilen enzim aktivitesinin optimum sıcaklığını belirlemek için farklı sıcaklıklarda (30-90°C) 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.0) içerisinde 60 mM ONPG substratı kullanılarak tespit edildi.

3.2.7.2. Optimum pH Tayini

B. licheniformis KG9’a ait hem saflaştırma öncesi hem de saflaştırma adımlarından sonra elde edilen β -galaktosidaz aktivitesi üzerine pH’nın etkisini araştırmak için; farklı pH (4.0-10.0) değerlerinde hazırlanan 60 mM ONPG substratı kullanılarak optimum sıcaklıkta enzim aktivitesi tespit edildi.

3.2.7.3. Substrat Özgünlüğü

Substrat özgünlüğünü belirlemek için yapay (ONPG) ve doğal (laktoz) substratlar kullanılarak β -galaktosidaz enzim aktivitesi optimum pH’da ve sıcaklıkta gerçekleştirildi. ONPG konsantrasyonları 1-10 mM, laktoz konsantrasyonları 1-200 mM olacak şekilde 0.1 M sodyum fosfat (pH 6.0) tamponunda hazırlanarak enzim ile 10 dk 60°C’de inkübe edildi. Reaksiyon 1 M Na₂CO₃ ile durdurularak spektrofotometrede aktivite ölçüldü. ONPG ve laktozun K_m ve V_{max} değerleri Linewear-Burk eşitliği kullanılarak hesaplandı.

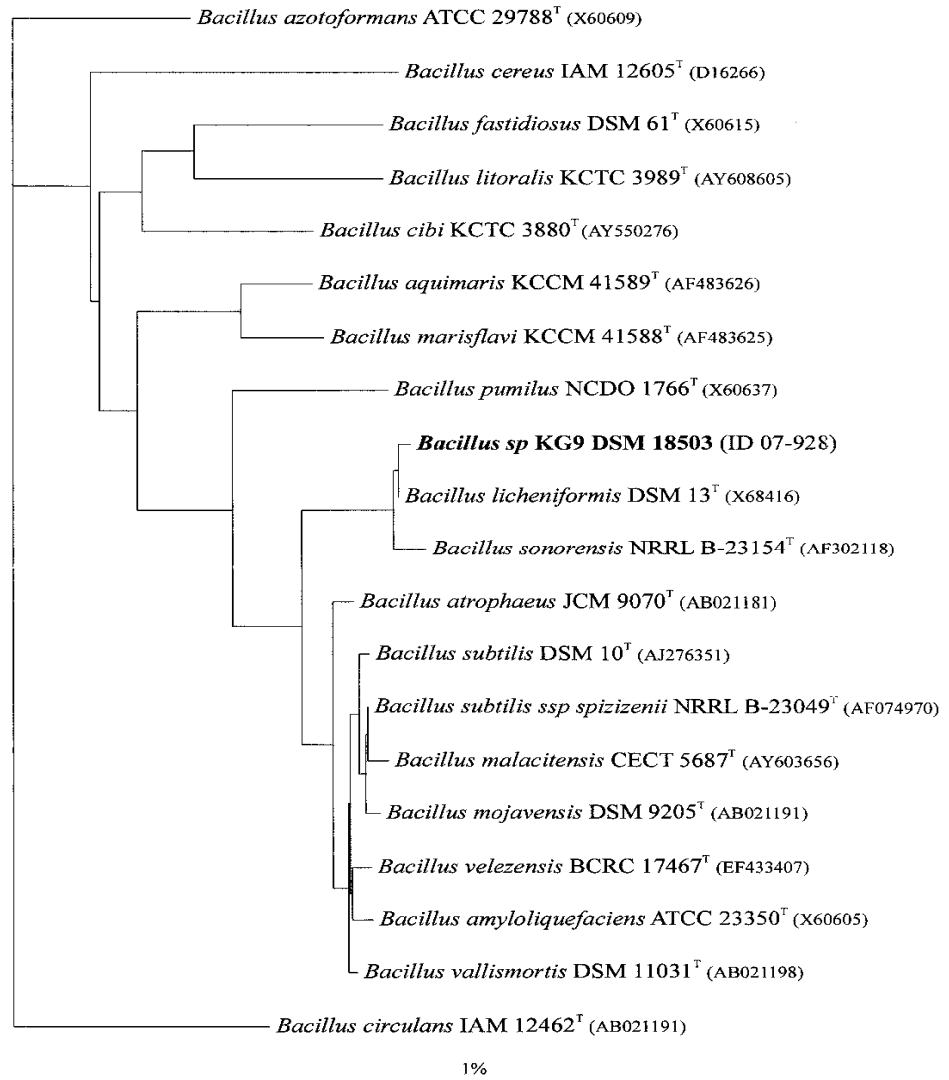
3.2.7.4. Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim, farklı konsantrasyondaki (1, 2.5, 5, 10, 25 mM) CoCl₂, MgCl₂, NiCl₂, CaCl₂, MnCl₂, HgCl₂, AgCl₂, FeCl₂ ve EDTA ile 15 dk 60°C'de öninkübasyona bırakıldı. Daha sonra 0.1 M sodyum fosfat (pH 6.0) tamponunda hazırlanan ONPG substratı eklenerek 10 dk 60°C'de inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon 1 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Oluşan *ortho*-Nitrofenil ürün miktarı 420 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakteri, Plazmit ve Üreme Ortamları

Bu çalışmada sıcak su kaynağından izole edilen termofilik *B. licheniformis* KG9 suşu; β -galaktosidazının stabil olması, bu enzimin bol miktarda üretilmesi ve bu bakterinin 16S rRNA dizi analizi karşılaştırıldığında tüm genomu bilinen *B. licheniformis* DSM13'e %99.9 oranında benzerlik göstermesinden dolayı (Şekil 4.1) kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *B. licheniformis* KG9'un 16S rRNA genlerine göre çizilen diğer *Bacillus* türleriyle yakınlığını gösteren filogenetik ağaç (Gül Güven 2007)

Çalışmamızda gen klonlamada kullanılacak uygun vektör olarak pUC18 plazmiti seçilmiştir. pUC plazmiti *E. coli* lacZ geninin bir kısmına bağlanan pBR322'den türetilmiş bir replikasyon orjini, modifiye ampisilin direnç geni ve bir çok klonlama bölgesini içeren çok yönlü bir plazmittir.

4.2. β -Galaktosidaz Enziminin Varlığının Tespiti

Sıcak su kaynaklarından izole edilen *B. licheniformis* KG9'un değişik inkübasyon sürelerinde (4-96 saat) LB ve LB+%1 laktoz içeren ortamlarda ve 55°C'de üretimi yapılmıştır. β -Galaktosidaz aktivitesini belirlemek için ONPG testi spektrofotometrik yöntem ile belirlendi. 1 Ünite β -galaktosidaz enzim aktivitesi, pH 6.0'da ve 60°C'de, dakikada 1 μ mol o-nitrofenol oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. 420 nm'de okunan absorbans değerlerini o-nitrofenol (ürün) konsantrasyonlarına dönüştürmek amacıyla, ONPG için elde edilen 4.376 mM⁻¹ cm⁻¹ değerindeki Ekstınşın sabitinden (ϵ) faydalandı. Spesifik aktivite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$U = \left[\frac{A_{420} \times SF}{\epsilon \times t_{dk}} \right] \times 10^3$$

U : Ünite enzim

A₄₂₀ : 420 nm'deki absorbans

SF : Seyretme faktörü

ϵ : Ekstınşın sabiti

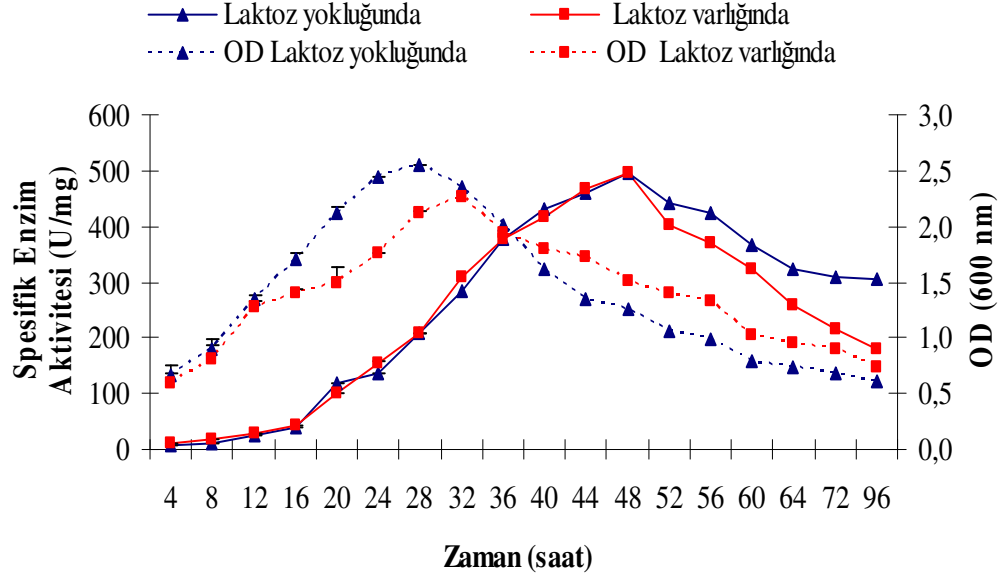
t_{dk} : Enzim aktivitesi için geçen inkübasyon zamanı

Daha sonra süpernatantın 1 mililitresindeki protein miktarı Lowry metoduna göre ölçülerek

Spesifik aktivite= U/mg protein olarak hesaplandı.

Şekil 4.2.'de görüldüğü gibi 16. saatten itibaren laktoz varlığında ve laktoz yokluğunda bakteri üremesinde artış meydana gelmiş ve 28. saatte maksimum değere

ulaşmış, 32. saatten sonra azalan bir eğilim göstermiştir. Elde edilen enzimin spesifik aktivitesi laktoz varlığında ve laktoz bulunmayan LB ortamında 24. saatten itibaren artış göstermiştir ve 48. saatte maksimum değer LB ortamında 497.2 U/mg ve LB+%1 laktoz ortamında ise 494.4 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Zamana bağlı *B. licheniformis* KG9'un üreme grafiği ve spesifik β -galaktosidaz aktivitesi

4.3. *B. licheniformis* KG9'dan Kromozomal DNA İzolasyonu ve

RNA'dan Arındırılması

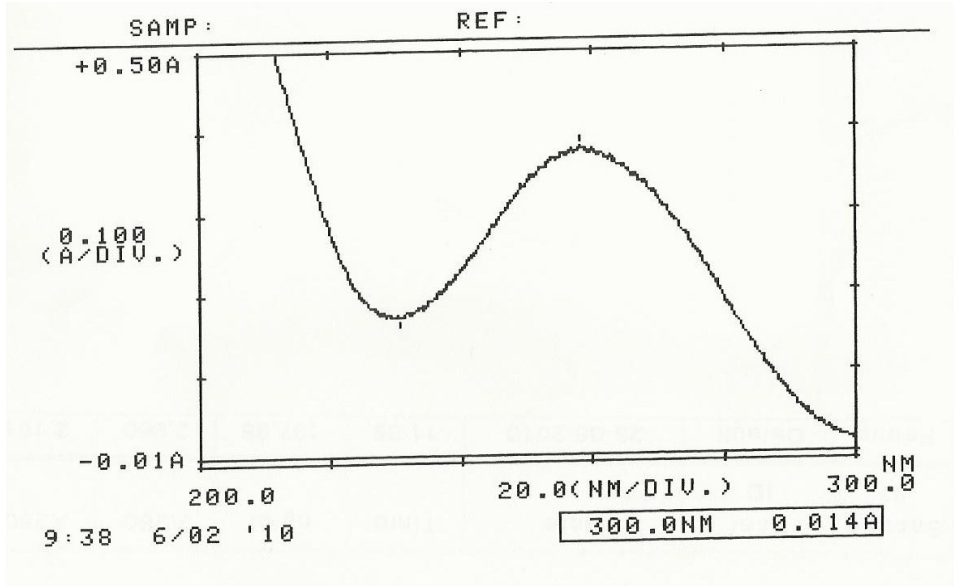
B. licheniformis KG9'a ait kromozomal DNA izole edilerek RNA'dan arındırıldı. DNA konsantrasyonunu hesaplamak ve saflığının kontrolü için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. 260 nm ve 280 nm'de Kör ve DNA örneğinin absorbansları ayrı ayrı ölçüldü.

$$\text{DNA saflığı} = A_{(260)}/A_{(280)}$$

formülüyle hesaplandı (Hesaplanan oran 1.8 ve üstü ise saf DNA elde edildiğini göstermektedir).

$$\text{DNA konsantrasyonu} = 50 \times A_{(260)} \times 100$$

formülüyle ng/μL olarak hesaplandı (eğer konsantrasyon >500 ng/μL ise kromozomal DNA'nın yeterince çözünmediğini göstermektedir).



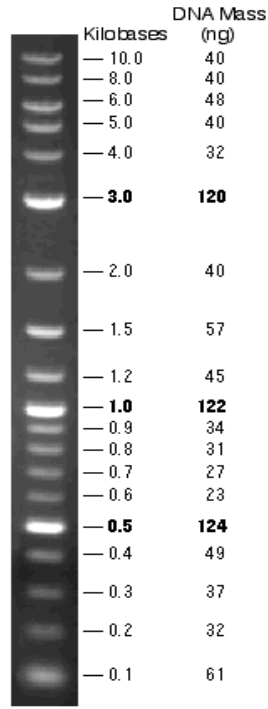
Şekil 4.3. Kromozomal DNA'nın miktarı ve saflığının spektrofotometrik ölçümü

Şekil 4.3'de *B. licheniformis* KG9'a ait izole edilen kromozomal DNA'nın spektrofotometrik sonuçları görülmektedir. Yukarıda belirtilen formüller yardımıyla izole edilen kromozomal DNA'nın konsantrasyonu 1.88 μg/μL ve saflığının da 1,96 olduğu belirlendi. Hesaplanan oran 1.8 μg/μL üstü olduğundan saf DNA elde edildiğini ve izole edilen DNA'nın klonlama çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

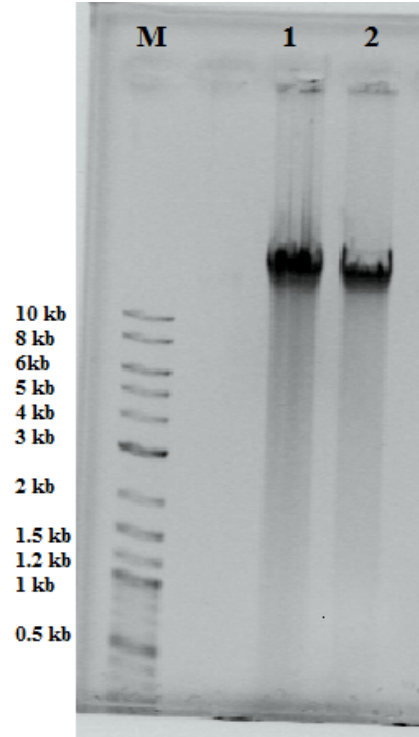
4.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

B. licheniformis KG9'a ait izole edilen kromozomal DNA'sının saflığının kontrolü için %1 agaroz jel elektroforezinde yürütülerek analiz edildi.

Şekil 4.4b'de görüldüğü gibi M ile belirtilen kuyucukta Şekil 4.4a'da belirtilen standart DNA markırı (M) kullanılmıştır. 1 ve 2 ile gösterilen kuyucuklarda *B. licheniformis* KG9'a ait izole edilen kromozomal DNA'nın kullanılan standart DNA markırına göre 10 kb'dan büyük ve miktarının 50 ng'dan büyük olduğu görülmektedir. Ayrıca DNA'nın tek bant halinde görülmesinden dolayı saf olduğu, RNA'dan arındırılmış olduğu ve böylelikle de klonlama çalışmalarında kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4a. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan standart DNA markır (New England Biolabs)



Şekil 4.4b. Agaroz jel elektroforezinde kromozomal DNA'nın saflığının kontrolü
1 ve 2: *B. licheniformis* KG9'a ait kromozomal DNA

4.4. *B. licheniformis* KG9 Bakterisine ait β -Galaktosidaz Geninin

(β -gal) *E. coli*'ye Aktarılması

B. licheniformis KG9 bakterisine ait β -galaktosidaz geninin (β -gal) *E. coli*'ye aktarılması için iki farklı yöntem kullanıldı.

Bunlar:

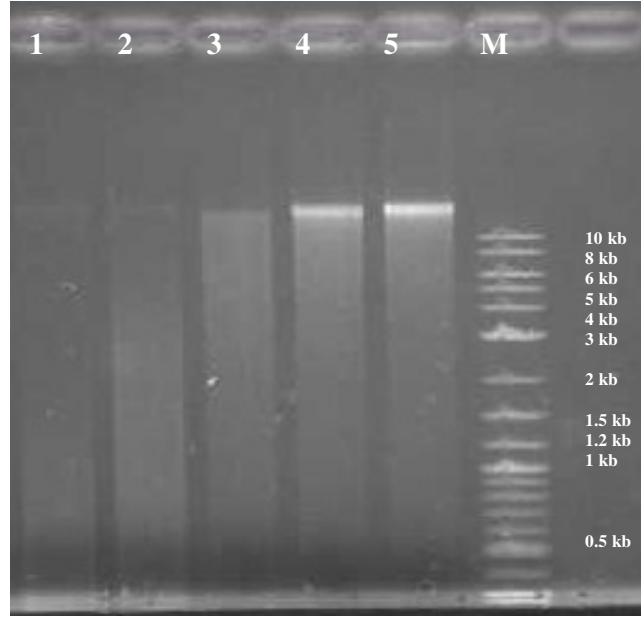
1. Fonksiyona dayalı gen izolasyonu,
2. Sekansa dayalı gen izolasyonudur.

4.4.1. Fonksiyona Dayalı Gen İzolasyonu

B. licheniformis KG9'dan elde edilen kromozomal DNA ve klonlamada kullanılacak vektör (pUC18) DNA'sı restriksiyon enzimleri ile kısmi olarak kesildi ve klonlama gerçekleştirildi.

4.4.1.1. Kromozomal DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kısmi Olarak Kesilmesi

B. licheniformis KG9'dan izole edilen, miktarı ve saflığı kontrol edilen kromozomal DNA, *Sau3A* restriksiyon enzimi ile kısmi olarak kesildi ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jel UV altında translüminatörde görüntülendi.



Şekil 4.5. DNA'nın kısmi olarak kesilmesi

M: DNA markırı,

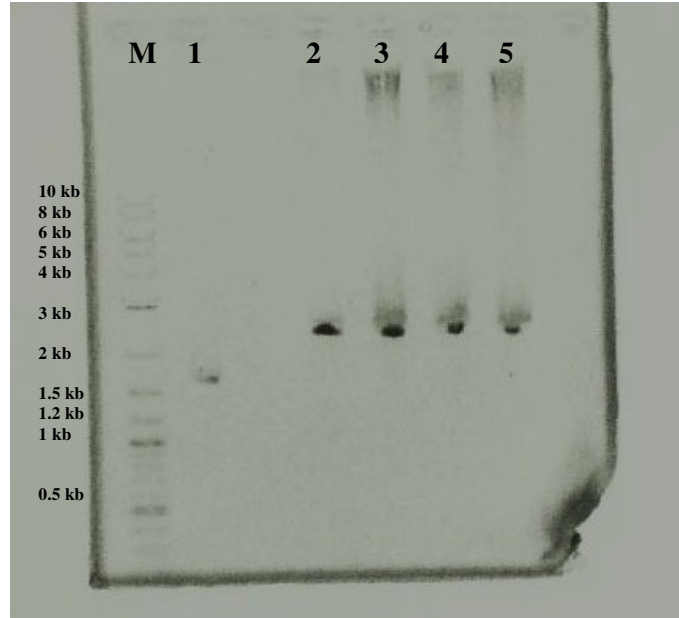
1, 2, 3, 4, 5: *Sau3A* restriksiyon enzimi ile kısmi olarak kesilen kromozomal DNA

Şekil 4.5'te 1, 2, 3, 4, 5 nolu kuyucuklarda agaroz jel elektroforezi sonucunda *Sau3A* restriksiyon enzimi ile kısmi olarak kesilen 10 µg DNA fragmentlerinin kullanılan *Sau3A* restriksiyon enziminin miktarı azaldıkça (1. kuyucukta N, 2. kuyucukta N/3, 3. kuyucukta N/9, 4. kuyucukta N/27 ve 5.kuyucukta N/54) 1. kuyucuktan 5. kuyucuğa kadar artan DNA konsantrasyona bağlı olarak yoğunlaştıkları görülmektedir ve kullanılan markıra göre 2kb ile 10 kb arasındaki DNA fragmentleri kesilerek jelden arındırılmıştır.

4.4.1.2. pUC18 Klonlama Vektörünün Ligasyona Hazırlanması

E. coli'den, pUC18 plazmit DNA'sı klonlama için kullanılmıştır. pUC18 plazmit DNA'sı *BamHI* endonükleaz enzimi ile kesilerek düz zincir (doğrusal) haline

getirilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen örneklerin 5 µL'si alınarak DNA markırı ile %1 v/v'lik agaroz jelde incelendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. pUC18 plazmit DNA'sının *BamHI* endonükleaz enzimi ile kesilmesi
M: DNA markırı, 1: restriksiyon enzimi ile kesilmeyen pUC18 plazmit DNA
2, 3, 4, 5: *BamHI* restriksiyon enzimi ile kısmi olarak kesilen pUC18 plazmit DNA

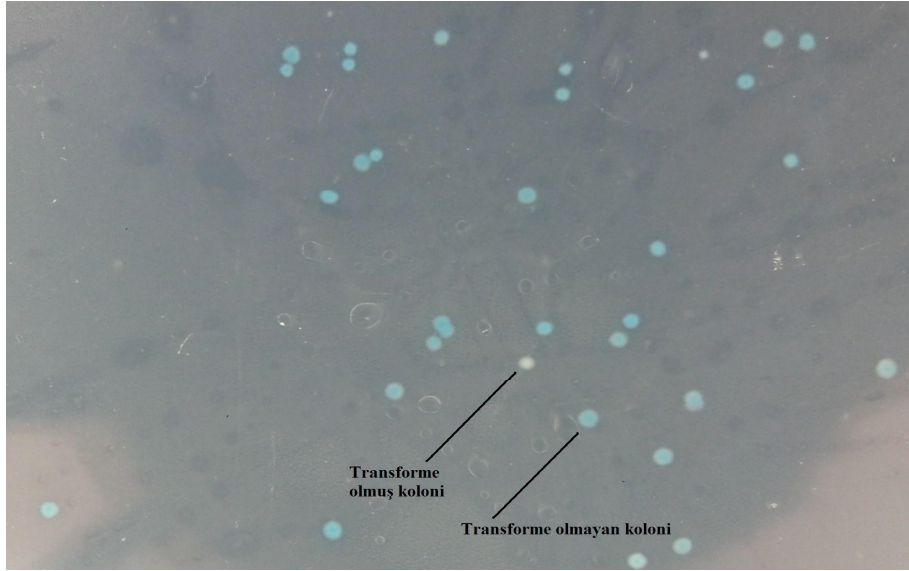
Şekil 4.6'da pUC18 plazmit DNA'sının *BamHI* endonükleaz enzimi kesilen lineer vektör bandının 2 kb'dan büyük olduğu ve tek bant halinde olduğu belirlendi. 1 nolu kuyucukta görülen bant *BamHI* endonükleaz enzimi ile kesilmeyen 2.6 kb büyüklüğündeki plazmit DNA'ya, 2, 3, 4, 5 nolu kuyucuklarda görülen bantlar ise *BamHI* endonükleaz enzimi kesilen lineer plazmit DNA'ya ait bantlardır. Vektör DNA'sı jel kesilerek jelden arındırıldı. 2-10 kb büyüklüğünde olan ve *Sau3A* restriksiyon enzimi ile kısmi olarak kesilen kromozomal DNA fragmentleri ile *BamHI* endonükleaz enzimi kesilen vektörünün ligasyonu yapıldı. Ligasyon karışımından alınarak *E.coli* TOP 10 kompetent bakterisine transfer edildi.

4.4.1.3. pUC18 + β -Galaktosidaz Geninin (*β -gal*) Plazmitini Taşıyan

E. coli Kolonilerinin Belirlenmesi

Transformasyon tüpündeki sıvıların tamamı S.O.C sıvı besiyerlerine boşaltılarak 37°C'de 1 saat süreyle üretilir. Bir saat sonra bakteriler alınarak LB/Amp₁₀₀/ X-gal/ IPTG petriyelerine steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekilir ve

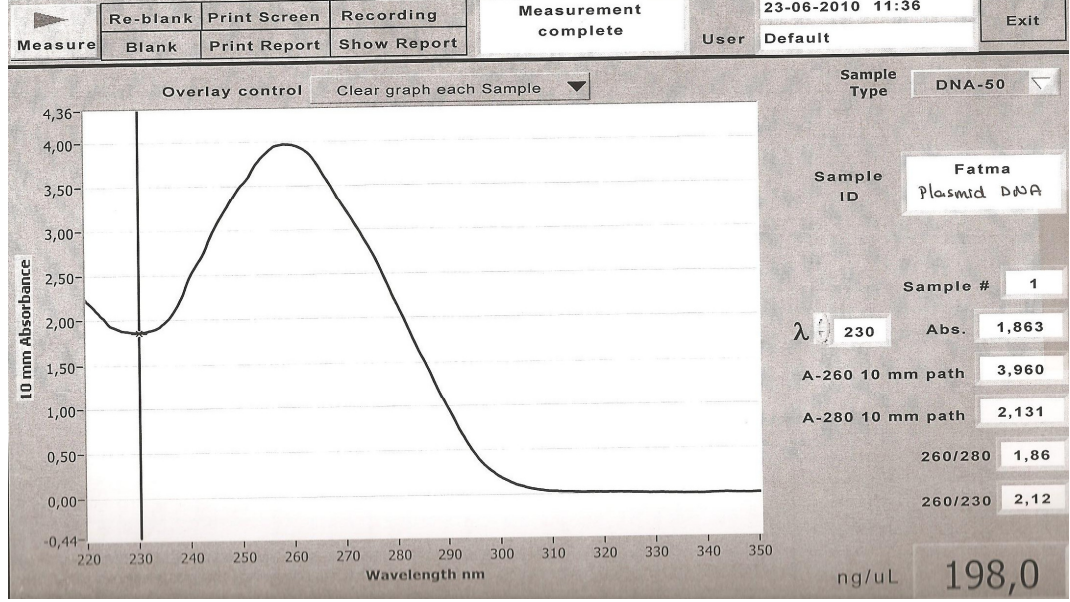
plaklar 37°C’de 1 gece üremeye bırakıldı. Ertesi gün transformasyon plaklarında rekombinant (geni almış olan) ve non-rekombinant (geni almadan kapanmış olan) plazmit DNA’lar ile transforme olmuş olan bakterilerin ürediği belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. pUC18 + β -galaktosidaz genini (β -gal) taşıyan *E. coli* kolonilerinin belirlenmesi

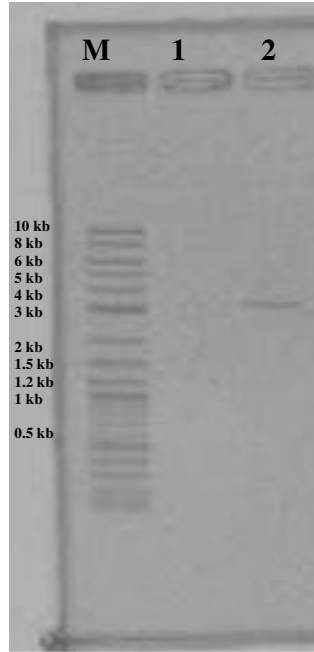
Şekil 4.7’te görüldüğü gibi hem rekombinant hem de non-rekombinant bakterilerde ampisilin direnç geni (β -laktamazı kodlar) sağlam olduğundan koloni oluşturmuşlardır. Rekombinant bakterilerde β -galaktosidaz geni pUC18 plazmiti üzerindeki *LacZ* geni içerisinde bulunan çoklu klonlama bölgesine (MCS) takıldığı için *LacZ* geni inaktive olacaktır. Dolayısıyla rekombinant bakteriler ortamdaki X-gal’ı parçalayamadığından koloniler beyaz renkli olarak gelişmiştir. Diğer taraftan rekombinant olmayan plazmitleri alan rekombinant bakterilerin *LacZ* geni sağlam olduğundan besi yerindeki X-gal’ı kullanarak koloniler mavi olarak gelişmiştir. Beyaz renkli koloniler steril kürdan yardımıyla seçilerek 10 mL LB/Amp₁₀₀ besi yeri bulunan Kmax tüplerine aktarıldı ve 37°C’de çalkalamalı olarak 1 gece üretildi ve plazmit izolasyonu gerçekleştirildi.

Plazmit DNA miktarı Nano-Drop ile ölçülerek (Şekil 4.8) agaroz jelde saflığı test edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Plazmit DNA miktarının ve saflığının Nano-Drop sonucu

Şekil 4.8’de görülen grafikte elde edilen plazmit DNA’nın 4.3’te belirtilen formüller kullanılarak miktarının 198.0 ng/μL ve saflığının 1.86 olduğu belirlendi.



Şekil 4.9. Plazmit DNA’nın saflığının agaroz jelde kontrolü

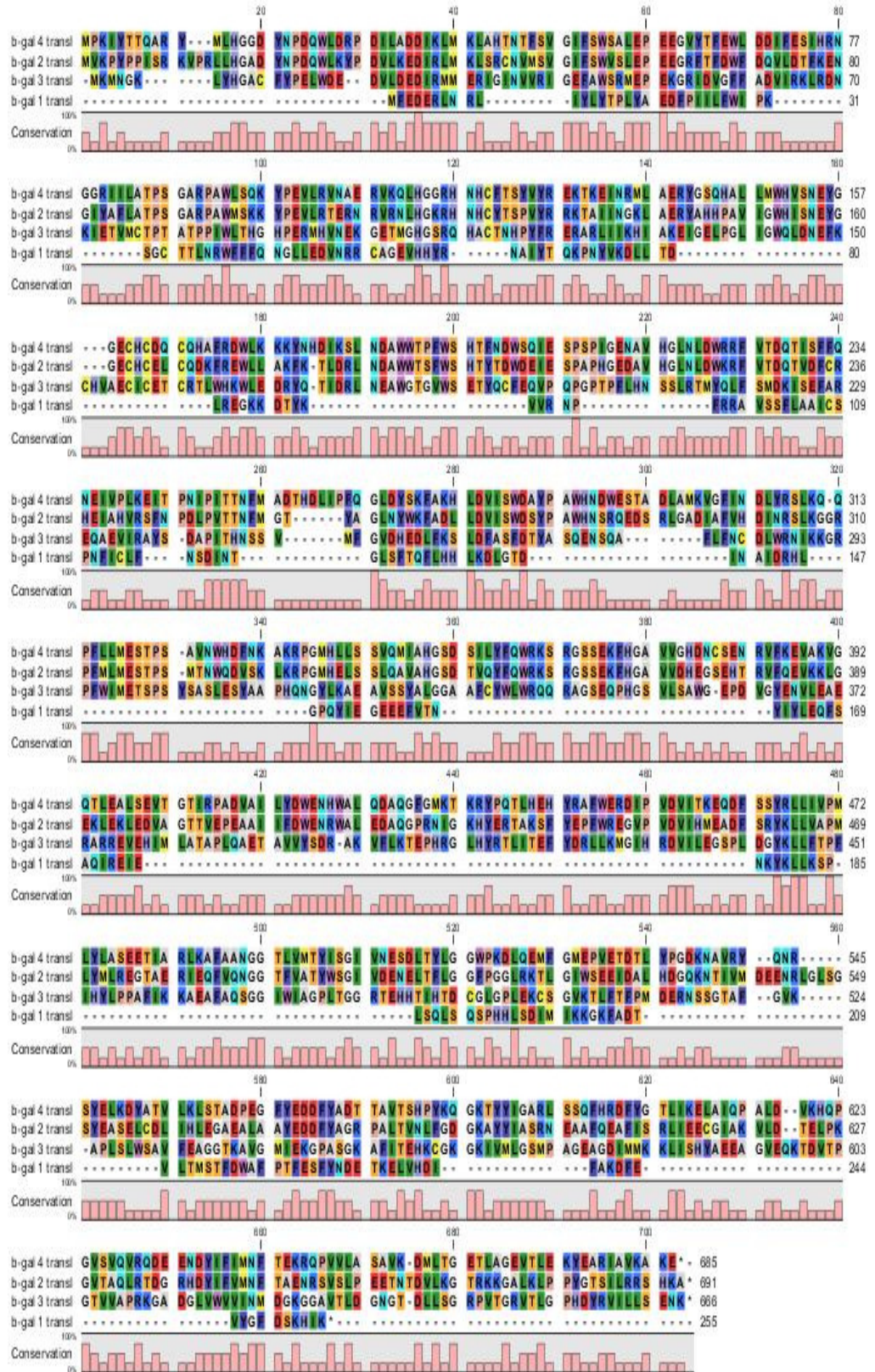
M: DNA markırı, 1: Boş kuyucuk 2: Beyaz renkli kolonilere ait plazmit DNA

Şekil 4.9’da elde edilen plazmit DNA’nın agaroz jelde saflığı test edildi. Beyaz renkli kolonilere ait plazmit DNA’da, β -galaktosidaz geni pUC18 plazmiti üzerindeki *LacZ* geni içerisinde bulunan çoklu klonlama bölgesine (MCS) takıldığı için agaroz jeldeki bant 3 kb’dan büyük görülmektedir. Elde edilen örnekler dizi analizi için GATC’ye (www.gatc.biotech.com) gönderildi.

4.4.2. Sekansa Dayalı Gen İzolasyonu

B. licheniformis’e ait β -galaktosidaz geni CLC Workbench v. 4.0 Software (CLC bio, Aarhus, Denmark) ve NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) programı ile analiz edildi (Şekil 4.10). *B. licheniformis*’e ait β -galaktosidaz geninin baz dizileri incelenerek putatif β -gal 1, β -gal 2, β -gal 3, β -gal 4, genlerinin amplifikasyonu için uygun primer bölgeleri *lac* promotör bölgelerinin nükleotid sekansları PhanTrán ve ark. (1998)’na göre belirlendi. Küt uç klonlamanın yapılabilmesinin ve PCR ürününün vektörlere ligasyonunu kolaylaştırmak için yapışkan uç açığa çıkacak şekilde tasarlanan primerlerin ucuna *BamHI* (5’-GGATCC-3’) ve karşıt yönde tasarlanan primerlerin ucuna *PstI* endonükleazına ait tanıma dizileri (5’-CTGCAG-3’) ilave edildi.

Tasarlanan primerlerin uçlarına ilave edilen endonükleazlar, vektör DNA’lar üzerindeki çoklu klonlama bölgesinde (MCS) kesim yapan enzimlerden olmaları ve gen bölgesi içerisinde tanıma bölgesine sahip olmaması göz önünde bulundurularak seçildi.



Şekil 4.10. *B. licheniformis*'e ait putatif β -galaktosidaz gen sekansları (β -gal 1, β -gal 2, β -gal 3, β -gal 4)

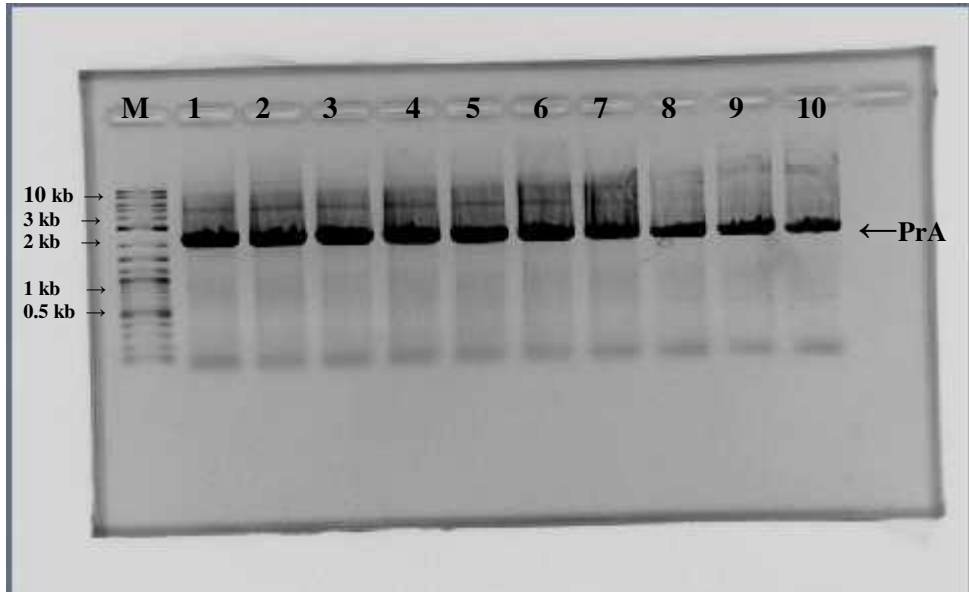
4.4.2.1. β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) PCR ile Amplifikasyonu

B. licheniformis KG9'un kromozomal DNA'sı üzerinde bulunan 4 farklı putatif β -galaktosidaz geni (β -gal 1, β -gal 2, β -gal 3, β -gal 4) PCR ile amplifiye edilerek pUC18 Δ lacZ klonlama vektörü ile ligasyona tabi tutuldu. pUC18 Δ lacZ klonlama vektörü, pUC18 plazmit DNA'sının *lacZ* geninin çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Böylelikle β -galaktosidaz geninin (β -gal) PCR ürünlerinin vektöre aktarılıp aktarılmadığının kontrolü kolaylaşmaktadır.

4.4.2.1.1. β -Galaktosidaz Geninin (β -gal) Amplifikasyonu için

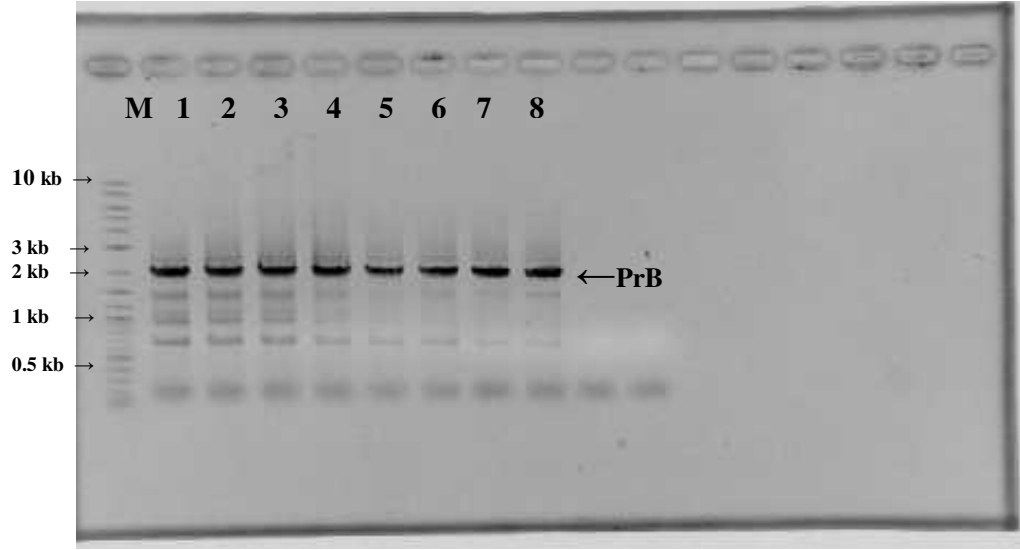
Primer Dizaynı

B. licheniformis KG9'a ait β -galaktosidaz geninin baz dizileri incelenerek β -gal 1, β -gal 2, β -gal 3, β -gal 4 genlerinin amplifikasyonu için uygun primer bölgeleri belirlendi. PCR işlemi sonunda PCR ürünleri agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. β -gal 1'e ait belirlenen PCR ürünü sonuçlarında pUC18 Δ lacZ klonlama vektörüne aktarılmadığı tespit edildi. Sekansa dayalı yöntemde β -gal 2 (PrA), β -gal 3 (PrB), β -gal 4 (PrC)'e ait PCR ürünü sonuçlarında pUC18 Δ lacZ klonlama vektörüne aktarıldığı tespit edildi ve sekansa dayalı yöntemde PrA, PrB ve PrC ile devam edildi.



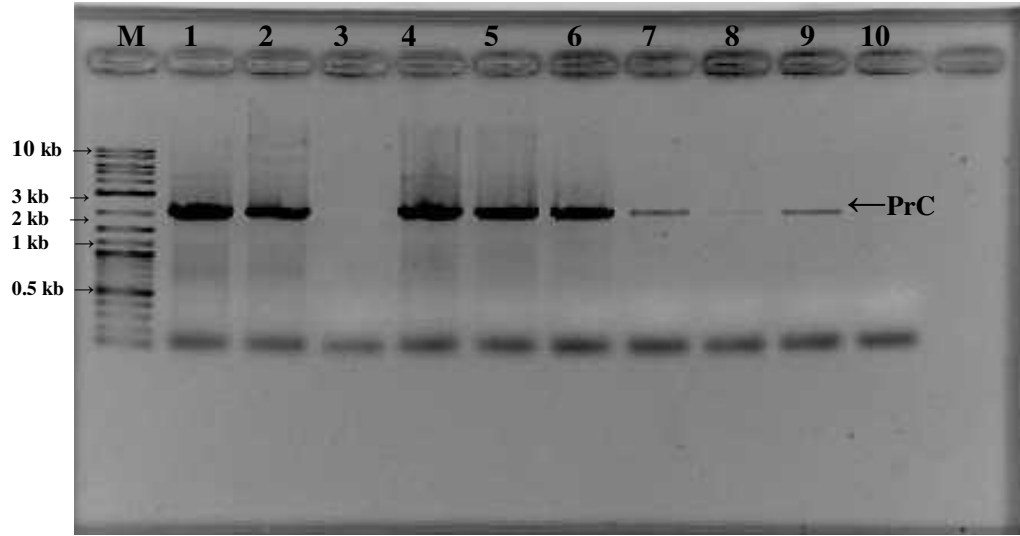
Şekil 4.11a. β -gal 2 PCR ürünü

M: DNA markırı PrA: β -gal 2 PCR ürünü 1-10 nolu kuyucuklar: PCR ürünleri



Şekil 4.11b. β -gal 3 PCR ürünü

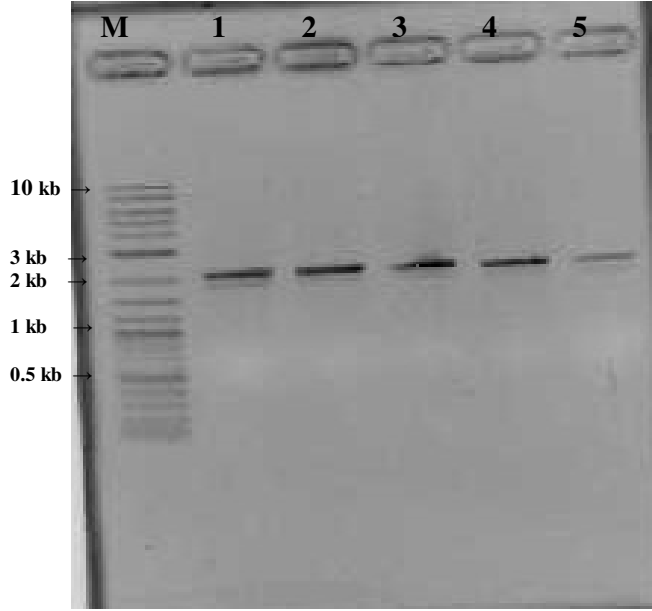
M: DNA markını PrB: β -gal 3 PCR ürünü 1-8 nolu kuyucuklar: PCR ürünleri



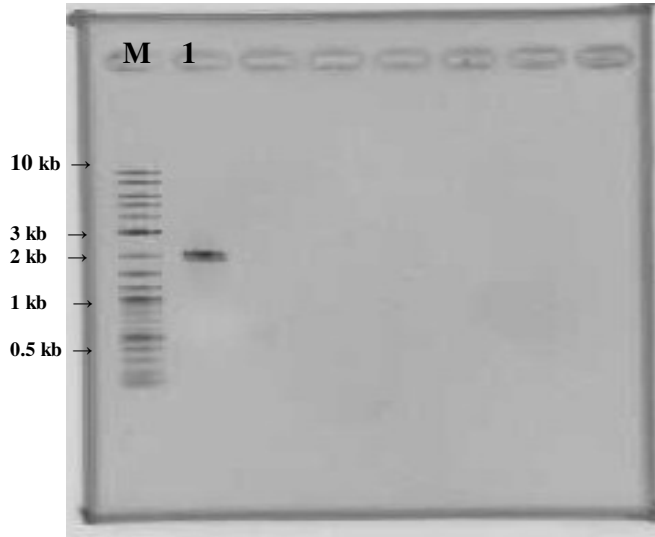
Şekil 4.11c. β -gal 4 PCR ürünü

M: DNA markını PrB: β -gal 4 PCR ürünü 1-10 nolu kuyucuklar: PCR ürünleri

Şekil 4.11a, Şekil 4.11b ve Şekil 4.11c'de **PrA**, **PrB** ve **PrC**'ye ait agaroz jel elektroforezinde görüntülenen PCR ürünleri görülmektedir. 2 kb uzunluğundaki PCR ürünleri jelden kesilerek QIAGEN jel ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden arıtıldı ve 1 μ L alınarak jelden arıtma işlemi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.



Şekil 4.12a. PrA ve PrC'nin PCR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü
M: DNA markırı
1, 2 ve 3: PrA PCR ürünü, 4 ve 5: PrC PCR ürünü



Şekil 4.12b. PrB PCR ürününün agaroz jelde kontrolü
A: DNA markırı 1: PrB PCR ürünü

Şekil 4.12a ve b'de PrA, PrB ve PrC'ye ait PCR ürünlerinin jelden iyi bir şekilde arındırıldığı ve 2kb uzunluğunda olduğu gürölmektedir. Jelden arıtılan PCR ürünleri *BamHI* ve *PstI* endonükleaz enzimleri ile kesildi.

4.4.2.1.2. β -Galaktosidaz geninin (β -gal) *E. coli*'ye Aktarılması

Üç farklı β -galaktosidaz geni (β -gal 2, β -gal 3 ve β -gal 4) için tasarlanan primerlerle elde edilen PCR ürünleri (PrA: Primer_B.lich- β -gal2 PCR ürünü, PrB: Primer_B.lich- β -gal3 PCR ürünü, PrC: Primer_B.lich- β -gal4 PCR ürünü) agaroz jelden arıtdıktan sonra *Bam*HI ve *Pst*I endonükleaz enzimi ile kesildi. Klonlama vektörü olarak pUC18 Δ lacZ kullanıldı ve vektör DNA'sı da *Bam*HI ve *Pst*I endonükleazlarıyla kesildi. Elde edilen duble kesilen örnekler ve vektör DNA'sı ligasyona tabi tutuldu. Hem self ligasyon hem de diğer ligasyon örnekleri (PrA, PrB ve PrC) transformasyona tabi tutuldu.

4.4.2.1.3. pUC18 Δ lacZ [pUC18 Δ lacZ+ β -Galaktosidaz Geni (β -gal)]

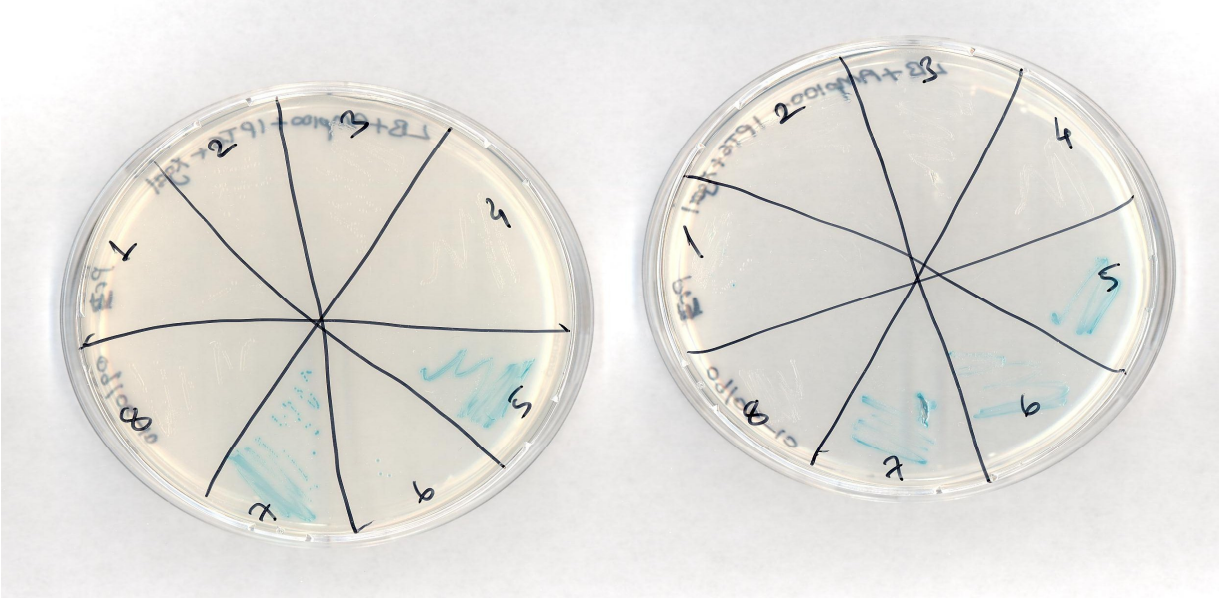
Plazmitini Taşıyan *E. coli* Kolonilerinin Belirlenmesi

Transformasyonun kontrolü ve rekombinant *E. coli* kolonileri belirlendi. Mavi renkte bulunan koloniler (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15) *LacZ* bölgesi aktif olduğundan β -galaktosidaz sentezleyen koloniler olarak belirlendi. Beyaz kolonilerde *LacZ* bölgesi inaktif olduğundan herhangi bir gen aktarılmadığını göstermektedir (Şekil 4.16).

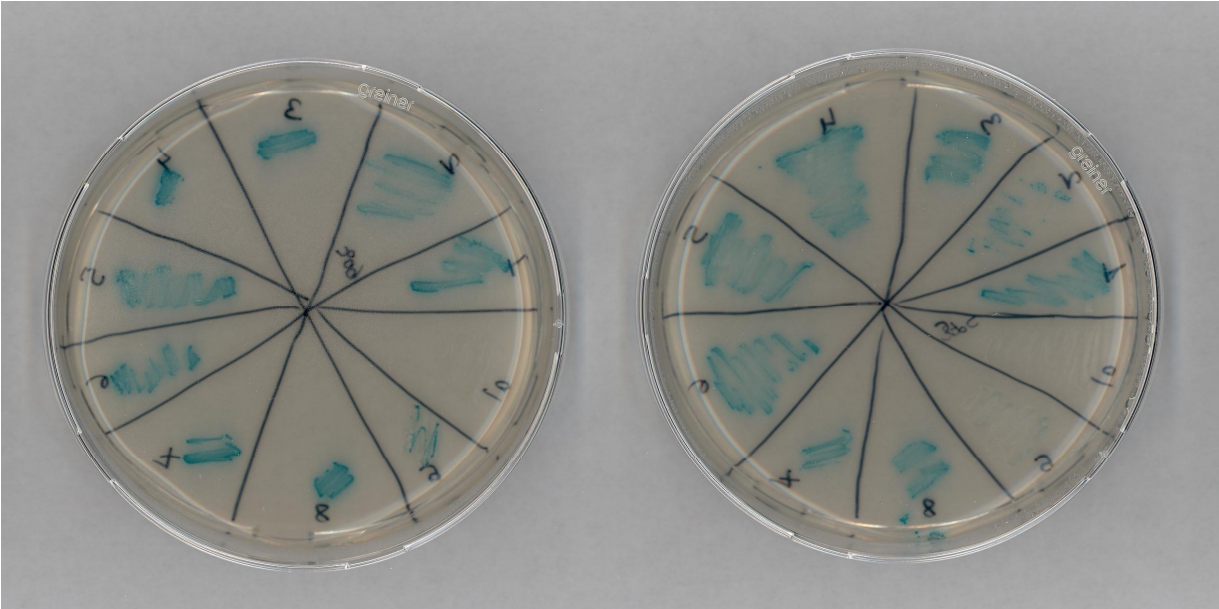


Şekil 4.13. LB+Amp₁₀₀+X-gal+IPTG içeren ortamda gelişen PrA: Primer_B.lich- β -gal2 rekombinant koloniler

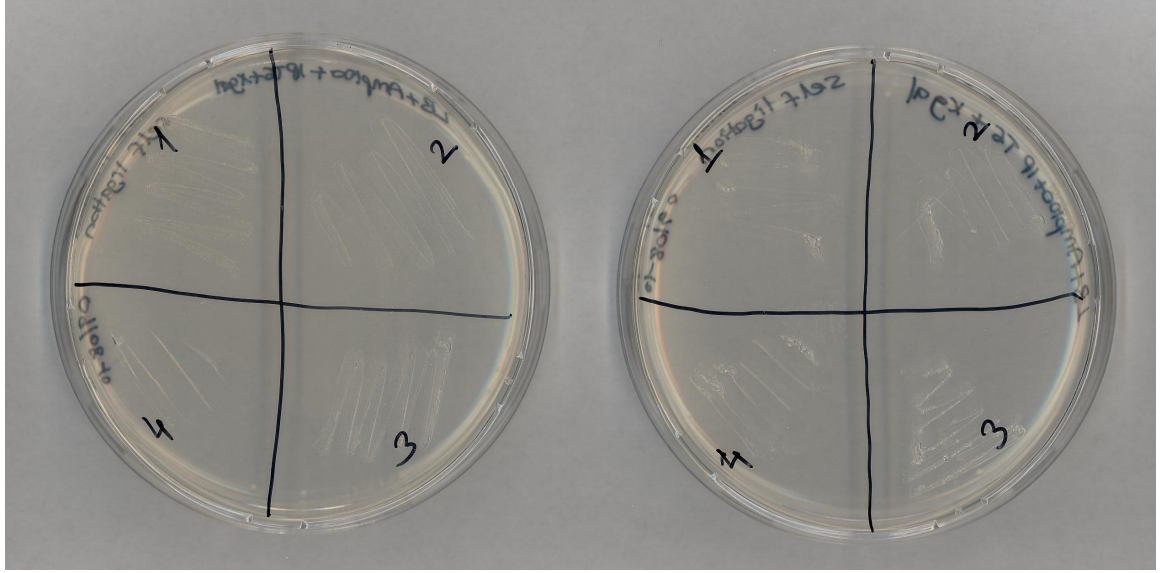
4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.14. LB+Amp₁₀₀+X-gal+IPTG içeren ortamda gelişen PrB: Primer_B.lich-β-gal3 rekombinant koloniler

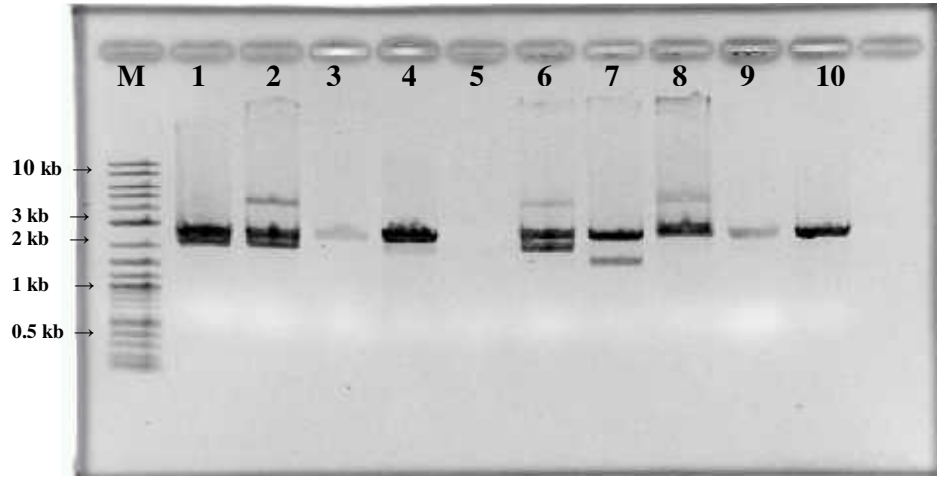


Şekil 4.15. LB+Amp₁₀₀+X-gal+IPTG içeren ortamda gelişen PrC: Primer_B.lich-β-gal4 rekombinant koloniler



Şekil 4.16. LB+Amp₁₀₀+X-gal+IPTG içeren ortamda gelişen self-ligasyon koloniler

LB+Amp₁₀₀ ortamında üretilen rekombinant kolonilerden mini prep yöntemi ile plazmit DNA izole edilerek agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.



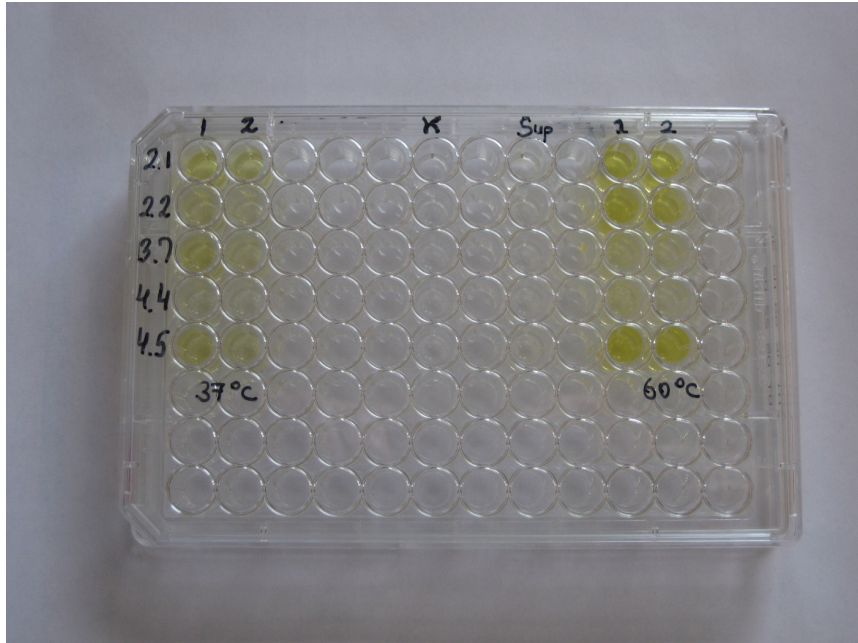
Şekil 4.17. Mini prep ile izole edilen rekombinant bakterilerin plazmit DNA'ları
M: DNA markırı

Şekil 4.17'de agaroz jel elektroforeziyle görüntülenen plazmit DNA sonuçlarına göre; 1, 2 ve 3 nolu kuyucuklar Şekil 4.13'te verilen PrA'ya ait 1, 2, ve 9 numaralı bölmelerden seçilen mavi renkli kolonilere ait mini prep ile izole edilen plazmit DNA bantlarını göstermektedir. 4, 5 ve 6 nolu kuyucuklar Şekil 4.14'te verilen PrB'ya ait 1,

5, ve 7 numaralı bölmelerden seçilen mavi renkli kolonilere ait mini prep ile izole edilen plazmit DNA bantlarını göstermektedir. 7, 8 ve 9 nolu kuyucuklar Şekil 4.15'te verilen PrC'ya ait 4, 5, ve 8 numaralı bölmelerden seçilen mavi renkli kolonilere ait mini prep ile izole edilen plazmit DNA bantlarını göstermektedir. 10 nolu kuyucuk ise Şekil 4.16'da verilen self-ligasyona ait beyaz renkli kolonilere ait mini prep ile izole edilen plazmit DNA bandını göstermektedir. 1, 2, 6, 7 ve 8 nolu bantlarda 2 ve 3 kb uzunluğunda ikinci bir bant görülmektedir. Bu da restriksiyon enzimleriyle kesilen plazmit DNA'ya aktarmak istediğimiz PCR ürünlerinin entegre olduğunu göstermektedir. Bu bantları veren koloniler enzim aktivitesinin belirlenmesi için master plaktan seçildi.

4.5. Rekombinant β -Galaktosidaz Ekspresyonu

Agaroz jel elektroforezine tabi tutularak kontrol edilen ve uygun bantların elde edildiği koloniler master plaktan seçilerek LB+Amp₁₀₀ sıvı ortama aktarıldı ve 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra bütün kültürlerle IPTG (10 mM stok solüsyondan) eklendi ve 20°C'de 20 saat daha üretildi. Bu süre sonunda kültürlerden Fast Prep yöntemiyle hücre içi enzim elde edildi ve β -galaktosidaz aktivitesine bakıldı.



Şekil 4.18. Rekombinant β -Galaktosidazın Ekspresyonu

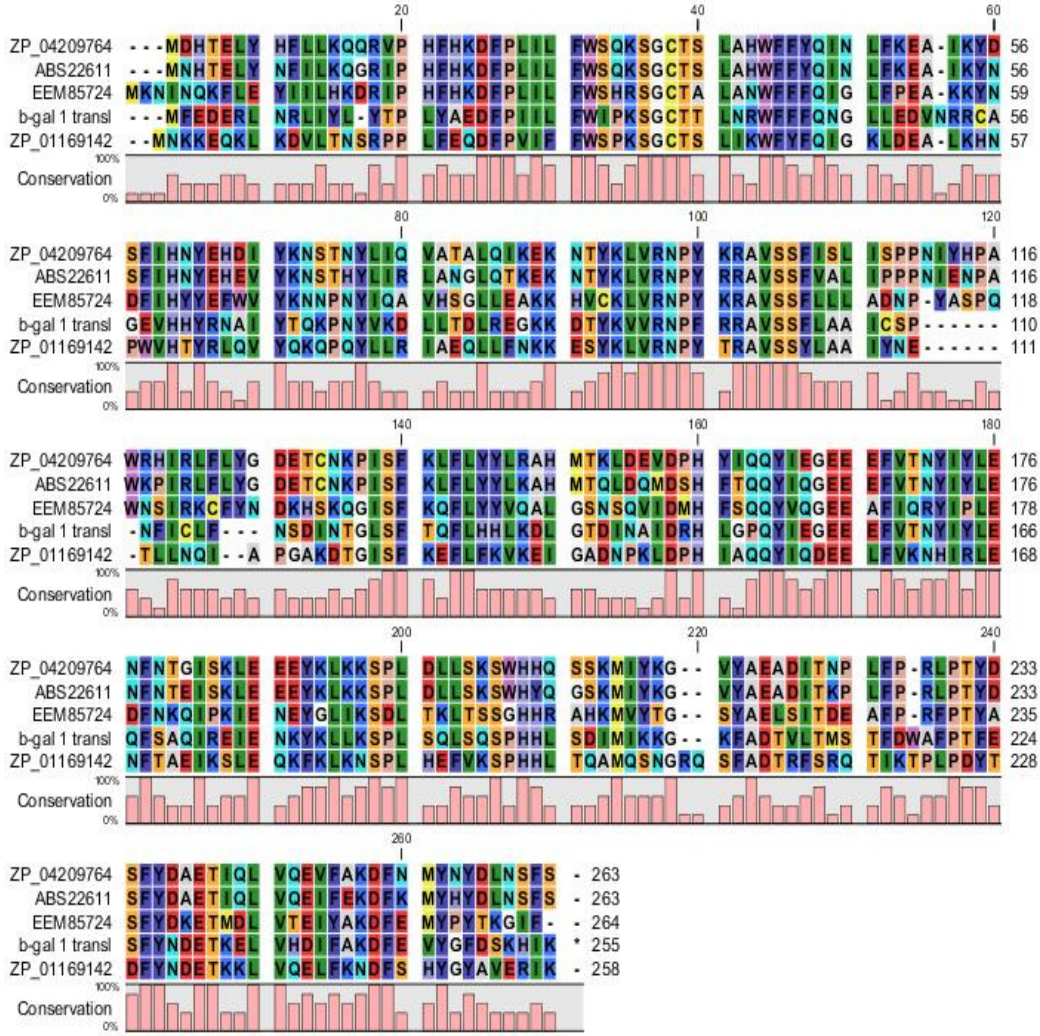
Şekil 4.18’de görüldüğü gibi β -galaktosidaz geni (β -gal 2, β -gal 3 ve β -gal 4) için tasarlanan primerlerle elde edilen PCR ürünlerinin (PrA: Primer_B.lich- β -gal2 PCR ürünü, PrB: Primer_B.lich- β -gal3 PCR ürünü, PrC: Primer_B.lich- β -gal4 PCR ürünü) *E.coli*’ye aktarıldığı ve hem 37°C hem de 60°C’de yapılan enzim deneyleri sonunda 60°C’de daha koyu sarı rengin elde edilmesiyle ve mikropleyt okuyucuda elde edilen sonuçlarla β -galaktosidaz enziminin daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar termofilik *B.licheniformis* KG9’a ait ve termostabil β -galaktosidaz sentezinden sorumlu üç yeni putatif genin *E.coli*’ye başarılı bir şekilde aktarıldığını ve bu genlerin *E.coli*’de termostabil β -galaktosidaz sentezini sağladığını göstermektedir.

4.6. Biyoinformatik İncelemeler

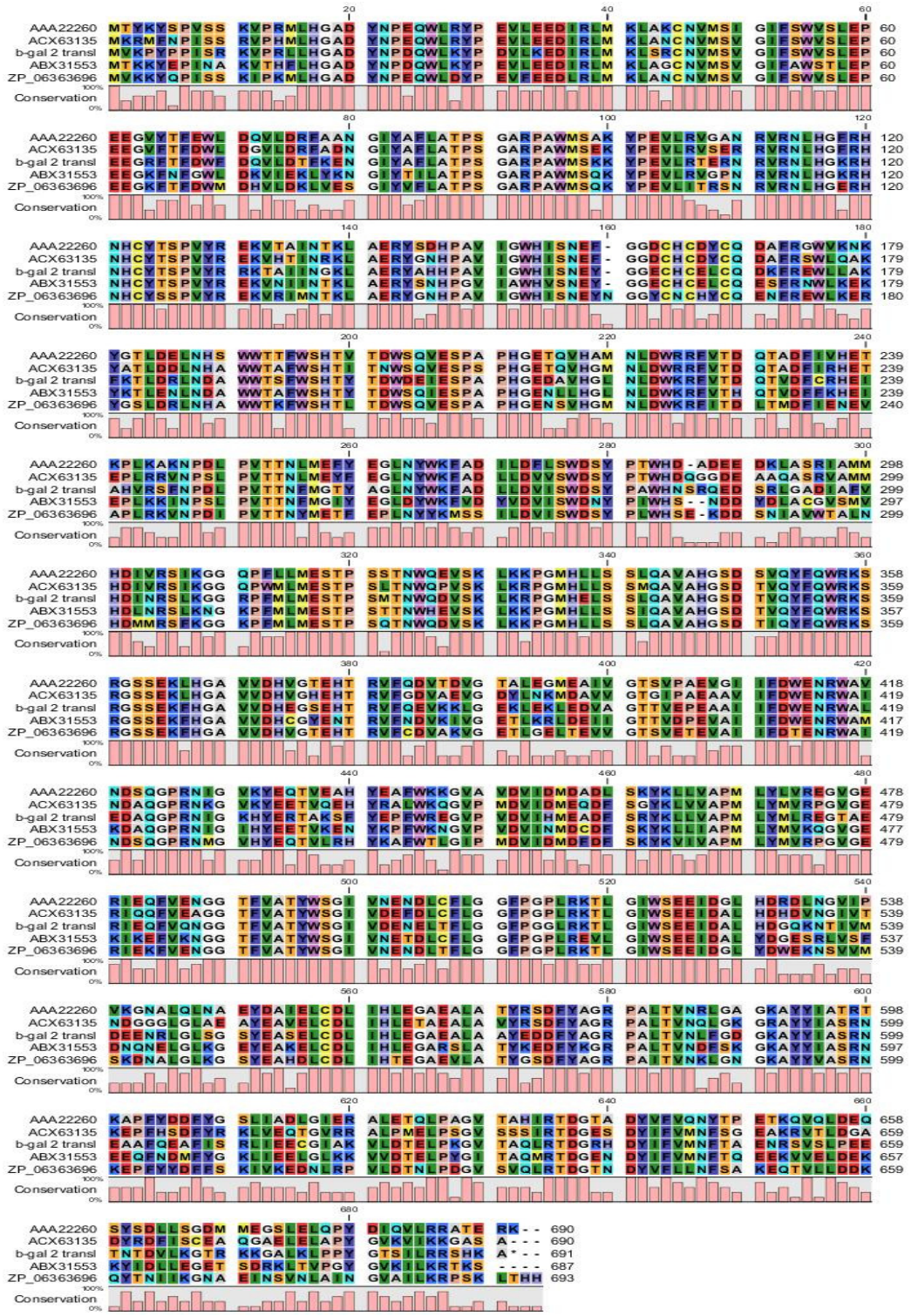
4.6.1. *B. licheniformis* KG9’un β -gal Kütüphanesinin İncelenmesi

B. licheniformis KG9’dan fonksiyona ve sekansa dayalı metodlarla izole edilen dört farklı putative β -galaktosidaz geninin, gen kütüphanesinde bulunan diğer Gram pozitif *Bacillus* türlerinin genlerine benzerlik gösterdiği görülmüştür. En yakın homologilerin: β -gal I % 42.9 *B. cereus*’tan tanımlanan *b-gal*’a (Şekil 4.19a); β -gal II % 68.3 *B. circulans*’tan tanımlanan *b-gal*’a (Şekil 4.19b); β -gal III % 68.8 *B. subtilis*’ten tanımlanan *b-gal*’a (Şekil 4.19c); β -gal VI % 76.7 *B. subtilis*’ten tanımlanan *b-gal*’a (Şekil 4.19d) yakınlık gösterdiği belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

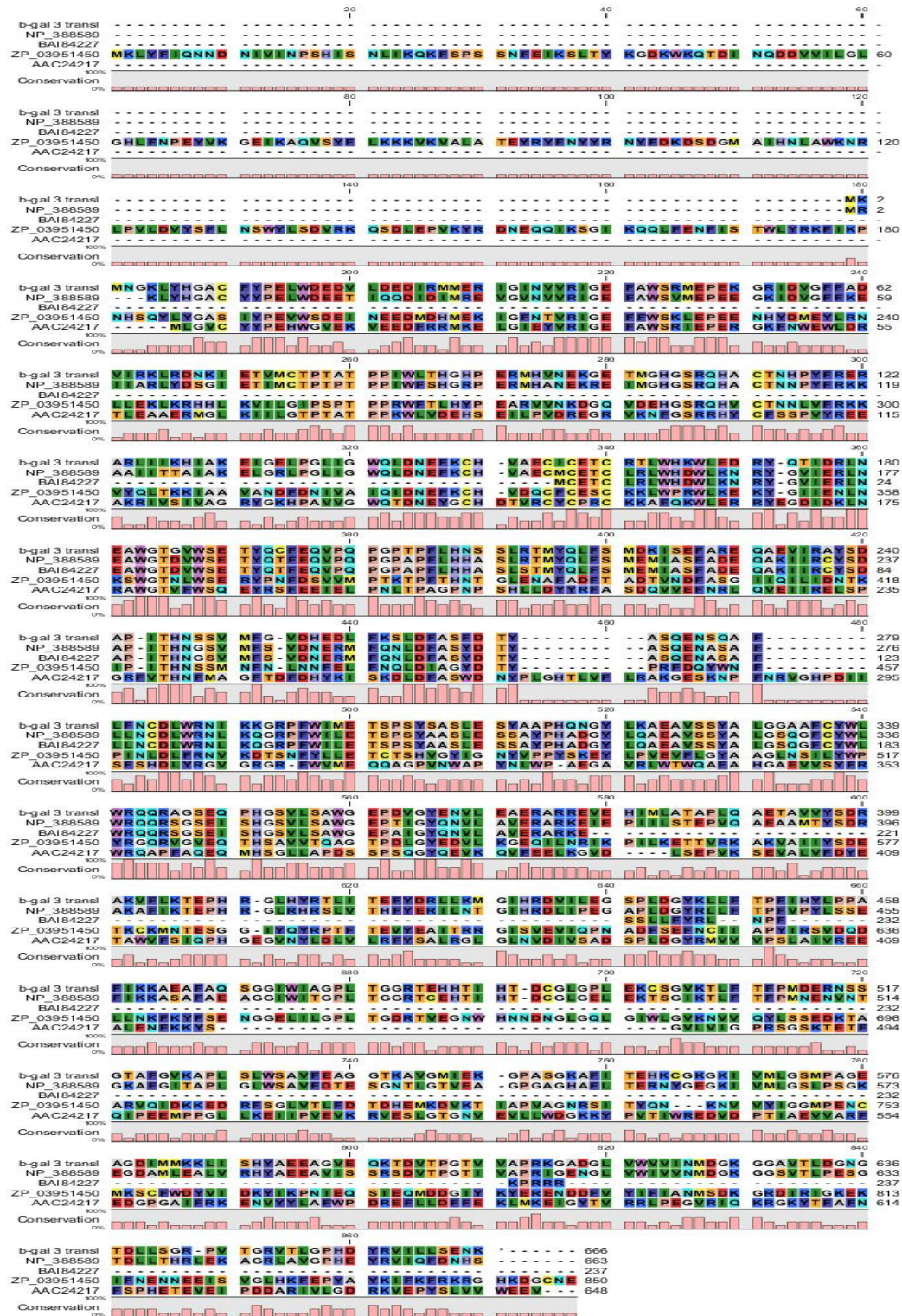


Şekil 4.19a. β -galaktosidaz 1 geninin nükleotid sekanslarının diğer bakterilerde karşılaştırılması
 ZP_04209764: *Bacillus cereus*
 ZP_01169142: *Bacillus* sp. NRRL B-14911
 EEM85724: *Bacillus thuringiensis* serovar *huazhongensis* BGSC 4BD1
 ABS22611: *Bacillus cytotoxicus* NVH 391-98



Şekil 4.19b. β -galaktosidaz 2 geninin nükleotid sekanslarının diğer bakterilerde karşılaştırılması
 AAA22260: *Bacillus circulans*
 ACX63135: *Geobacillus* sp. Y412MC10
 ABX31553: *Petrotoga mobilis* SJ95 ZP_06363696: *Bacillus cellulosilyticus* DSM 2522

4. ARAŞTIRMA BULGULARI



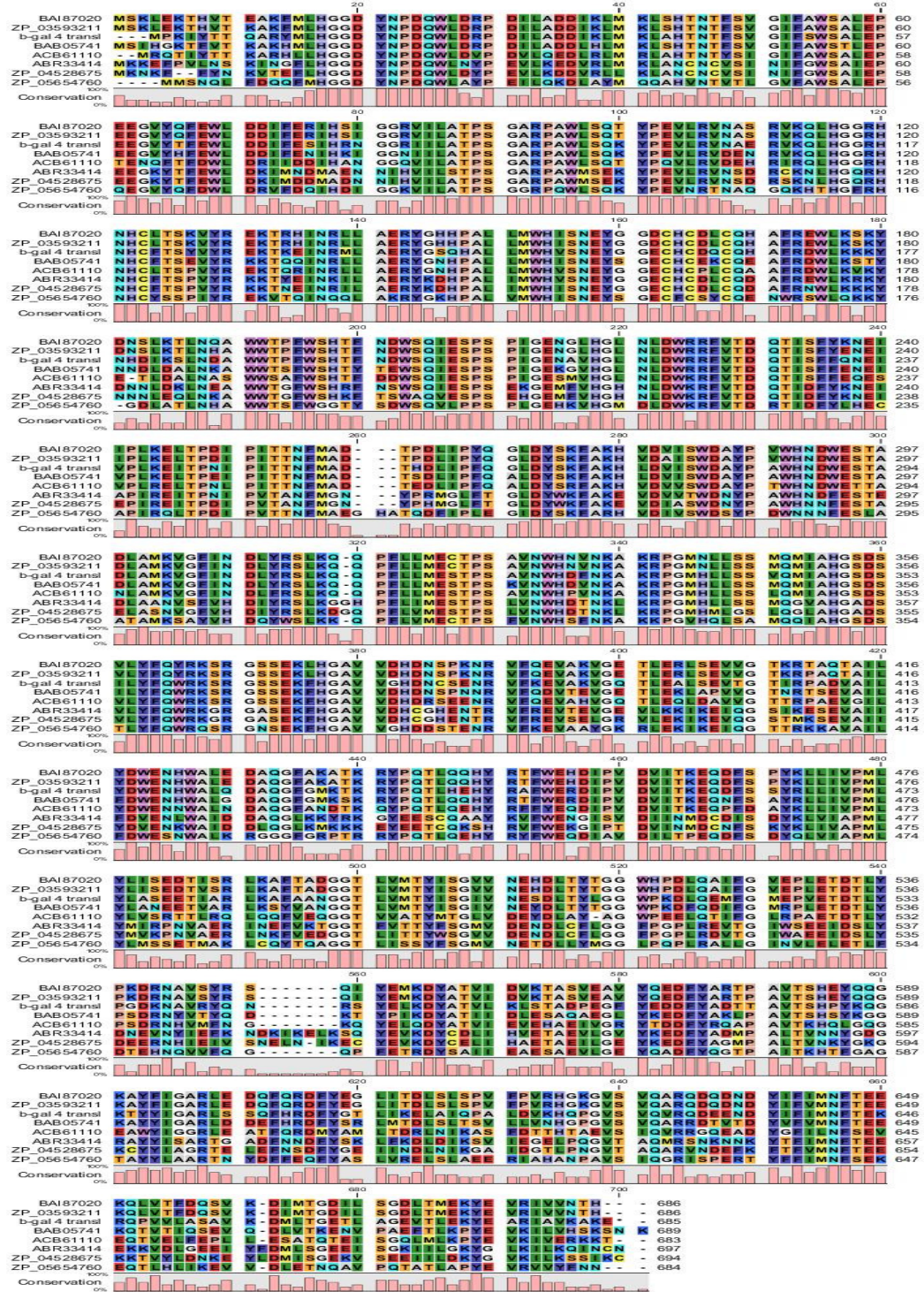
Şekil 4.19c. β -galaktosidaz 3 geninin nükleotid sekanslarının diğer bakterilerde karşılaştırılması

NP_388589: *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168

ZP_03951450: *Lactobacillus gasseri* JV-V03

BAI84227: *Bacillus subtilis subsp. natto* BEST195

AAC24217: *Thermotoga neapolitana*

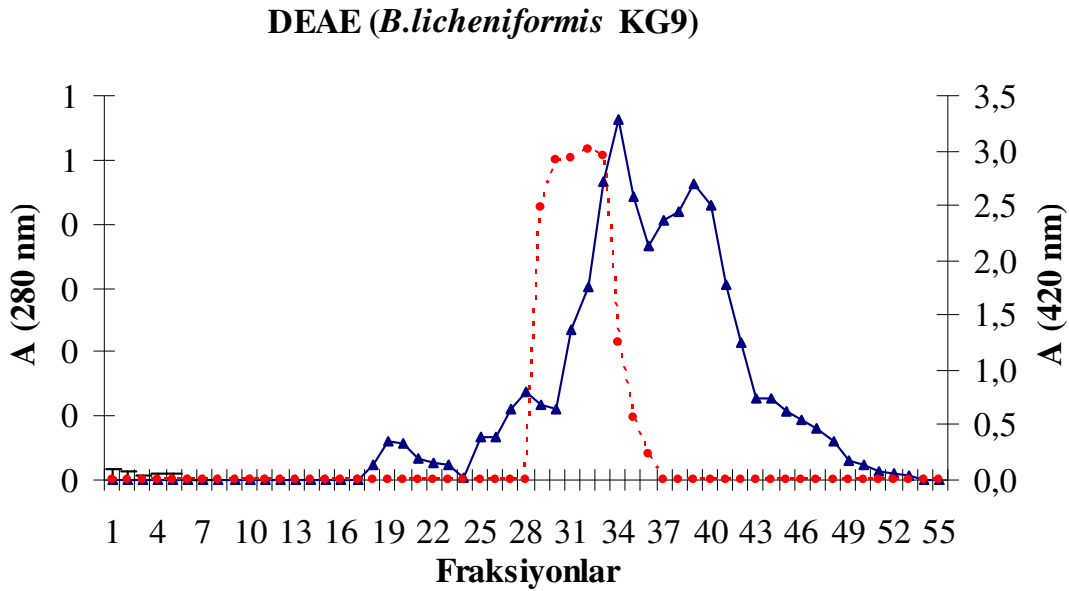


Şekil 4.19d. β -galaktosidaz 4 geninin nükleotid sekanslarının diğer bakterilerde karşılaştırılması
 BAI87020: *Bacillus subtilis* subsp. *natto* BEST195
 ZP_035093211: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168
 BAB05741: *Bacillus halodurans* C-125 ACB61110: *Exiguobacterium sibiricum* 255-15
 ABR33414: *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052
 ZP_04526675: *Clostridium butyricum* E4 str. BoNT E BL5262

4.7. *B. licheniformis* KG9'a ait Doğal Ekstraselüler β -Galaktosidaz ve Rekombinant *E. coli*'ye ait β -Galaktosidazın Saflaştırılması

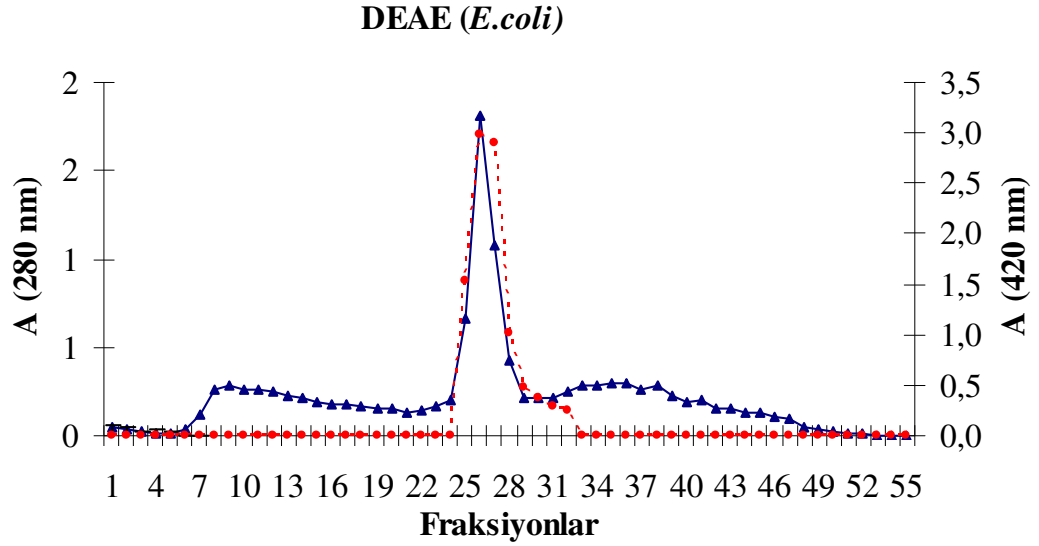
4.7.1. İyon-Değişim Kromatografisi

B. licheniformis KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın DEAE-selüloz iyon-değişim kromatografisiyle toplanan fraksiyonlar ve A_{280} 'de protein miktarı ile A_{420} 'de elde edilen enzim aktivite sonuçları aşağıdaki grafiklerde gösterilmektedir.



Şekil 4.20. *B. licheniformis* KG9'un DEAE-selüloz iyon-değişim kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar

Şekil 4.20'deki grafikte görüldüğü gibi *B. licheniformis* KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidazın DEAE-selüloz kullanılarak yapılan iyon değişim kromatografisinde mavi çizgi ile gösterilen değerler A_{280} 'de elde edilen protein miktarını, kırmızı renkle gösterilen değerler A_{420} 'deki enzim aktivitesini göstermektedir. 19. fraksiyon tüpü ile 50. fraksiyon tüpü arasında proteinlerin fraksiyonlara düştüğü görülmektedir. Bu fraksiyon tüplerinde β -galaktosidaz aktivitesi ölçüldü ve en yüksek enzim aktiviteleri 29. ve 34. fraksiyonlarda elde edildi ve bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımı için birleştirildi ve diyaliz edilerek ultrafiltrasyon yapıldı.

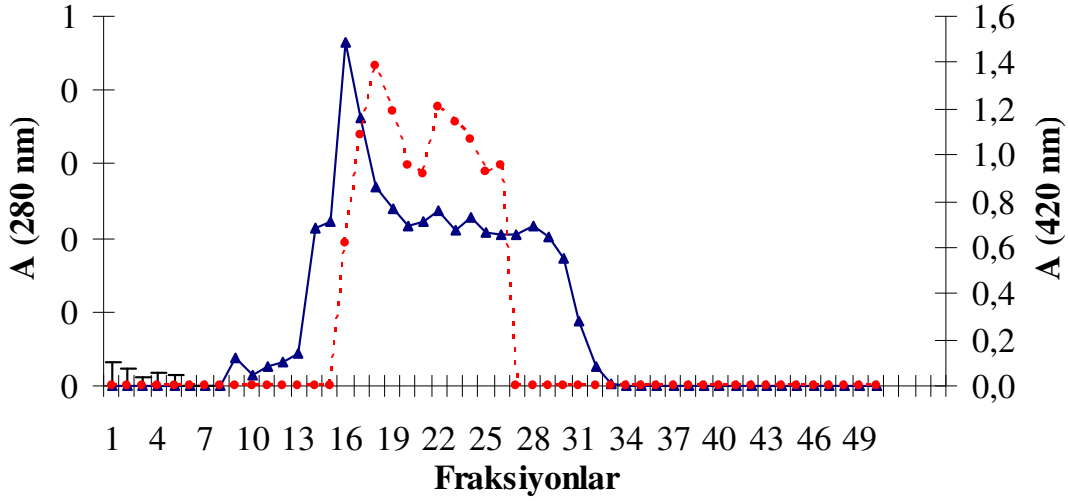


Şekil 4.21. *E.coli*'nin DEAE-selüloz iyon-değişim kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar

Şekil 4.21'deki grafikte görüldüğü gibi rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın DEAE-selüloz iyon-değişim kromatografisiyle A_{280} 'de toplanan fraksiyonlar 7. fraksiyon tüpü ile 47. fraksiyon tüpü arasında toplanmıştır. Bu fraksiyonlarda A_{420} 'de elde edilen enzim aktivitesi 25. ve 31. fraksiyon tüplerinde elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımı için birleştirildi ve diyaliz edilerek ultrafiltrasyon yapıldı.

4.7.2. Jel Geçirgenlik Kromatografisi

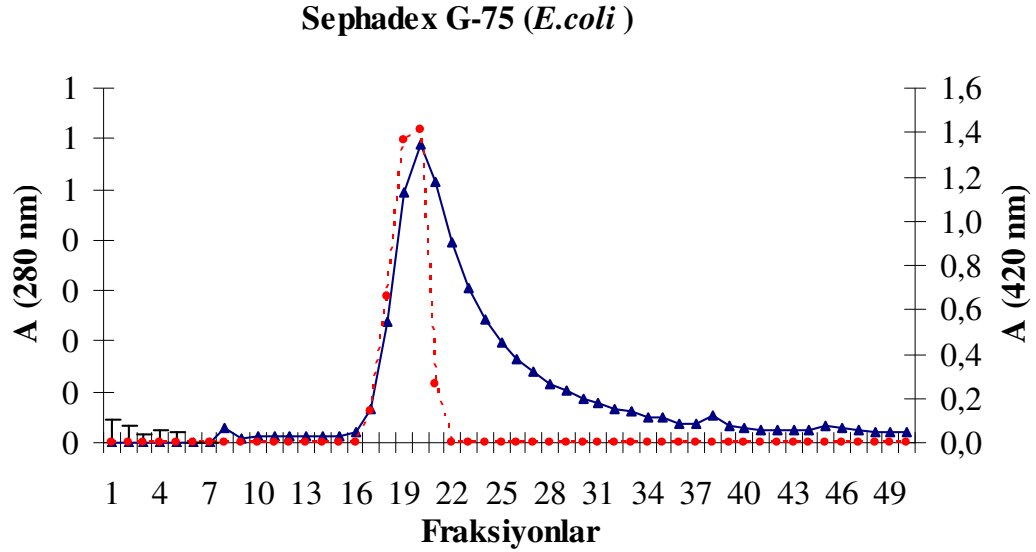
Aşağıdaki grafiklerde *B. licheniformis* KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın Sephadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisiyle toplanan fraksiyonlar ve A_{280} 'de protein miktarı ile A_{420} 'de elde edilen enzim aktivite sonuçları gösterilmektedir.

Sephadex G-75 (*B.licheniformis* KG9)

Şekil 4.22. *B. licheniformis* KG9'un Sephadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar

Şekil 4.22'deki grafikte görüldüğü gibi *B. licheniformis* KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidazın Sephadex G-75 kullanılarak yapılan jel geçirgenlik kromatografisinde mavi çizgi ile gösterilen değerler A_{280} 'de elde edilen protein miktarını, kırmızı renkle gösterilen değerler A_{420} 'deki enzim aktivitesini göstermektedir. 9. fraksiyon tüpü ile 32. fraksiyon tüpü arasında proteinlerin fraksiyonlara düştüğü görülmektedir. Bu fraksiyon tüplerinde β -galaktosidaz aktivitesi ölçüldü ve en yüksek enzim aktiviteleri 16. ve 26. fraksiyonlarda elde edildi ve bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımı için birleştirildi ve diyalizlenerek ultrafiltrasyon yapıldı.

Şekil 4.23'deki grafikte görüldüğü gibi rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın Sephadex G-75 kullanılarak yapılan jel geçirgenlik kromatografisiyle A_{280} 'de toplanan fraksiyonlar 7. fraksiyon tüpü ile 49. fraksiyon tüpü arasında toplanmıştır. Bu fraksiyonlarda A_{420} 'de elde edilen enzim aktivitesi 17. ve 21. fraksiyon tüplerinde elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımı için birleştirildi ve diyalizlenerek ultrafiltrasyon yapıldı.



Şekil 4.23. *E.coli*'nin Sephadex G-75 jel geçirgenlik kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar

4.7.3. Affinite Kromatografisi

Affinite kromatografisinde 10 mM ve 100 mM sodyum borat tamponu ile yıkanan kolondan 1 mL/dk akış hızıyla 1 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Elde edilen fraksiyonlarda A_{280} 'de protein miktar tayini yapılarak sonrasında β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı. Fakat bu fraksiyonlarda önemli ölçüde enzim aktivitesi elde edilemedi.

B. licheniformis KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazının %70'lik doyumluk seviyelerinde olacak şekilde amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$, iyon değişim kromatografisi (DEAE-selüloz) ve jel geçirgenlik kromatografisi (Sephadex G-75) kromatografik yöntemleriyle saflaştırma işlemlerinin sonunda her saflaştırma adımında toplanan fraksiyonlardan hem protein miktarı hem de enzim aktivitesi ölçülerek saflaştırma katsayısı ve % verim hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.1. <i>B. licheniformis</i> KG9'a ait saflaştırma basamakları					
Saflaştırma Basamakları	Total Protein mg/mL	Total Aktivite	Spesifik Aktivite U/mg	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham özüt (Crude extract)	32.3	4223	130.3	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve Diyaliz	4.7	4100	869.1	6.6	97
DEAE-Selüloz	2.9	3591	1230.3	9.4	85

B. licheniformis KG9'un ekstraselüler β -galaktosidaz enziminin saflaştırma adımlarında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de görülmektedir. Çizelge 4.1.'e göre enzim 9.4 kat saflaştırılmış ve enzimin verimi %85 olarak belirlenmiştir.

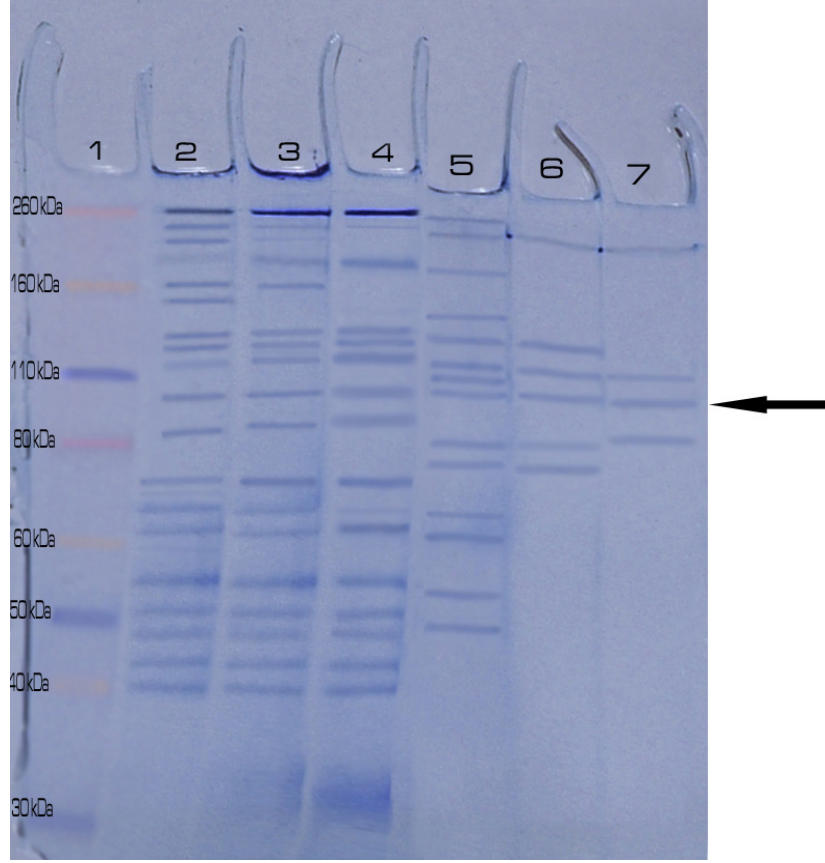
E.coli'nin ekstraselüler β -galaktosidaz enziminin saflaştırma adımlarında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.'de görülmektedir. Çizelge 4.2.'ye göre enzim 2.46 kat saflaştırılmış ve enzimin verimi %7 olarak belirlendi.

Çizelge 4.2. <i>E. coli</i> 'ye ait saflaştırma basamakları					
Saflaştırma Basamakları	Total Protein mg/mL	Total Aktivite	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Ham özüt (Crude extract)	59.6	1074	18	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve Diyaliz	9.91	383	38.6	2.14	37.4
DEAE-Selüloz	1.60	71	44.3	2.46	7.0

4.7.4. Elektroforez

B. licheniformis KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazının amonyum sülfat [(NH₄)₂SO₄], iyon değişim kromatografisi (DEAE-selüloz) ve jel geçirgenlik kromatografisi (Sephadex G-75) kromatografik yöntemleriyle saflaştırma işlemlerinin sonunda elde edilen örneklerin molekül ağırlığı non-denatüre PAGE ile belirlendi. Şekil 4.24'te görüldüğü gibi 1 numaralı kuyucuğa yüklenen standart proteine ait bantlar görülmektedir *B. licheniformis*

KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın saflaştırma adımlarına ait jele yüklenen örneklerin molekül ağırlığı kullanılan protein standardı yardımıyla yaklaşık 90 kDa olarak hesaplandı.



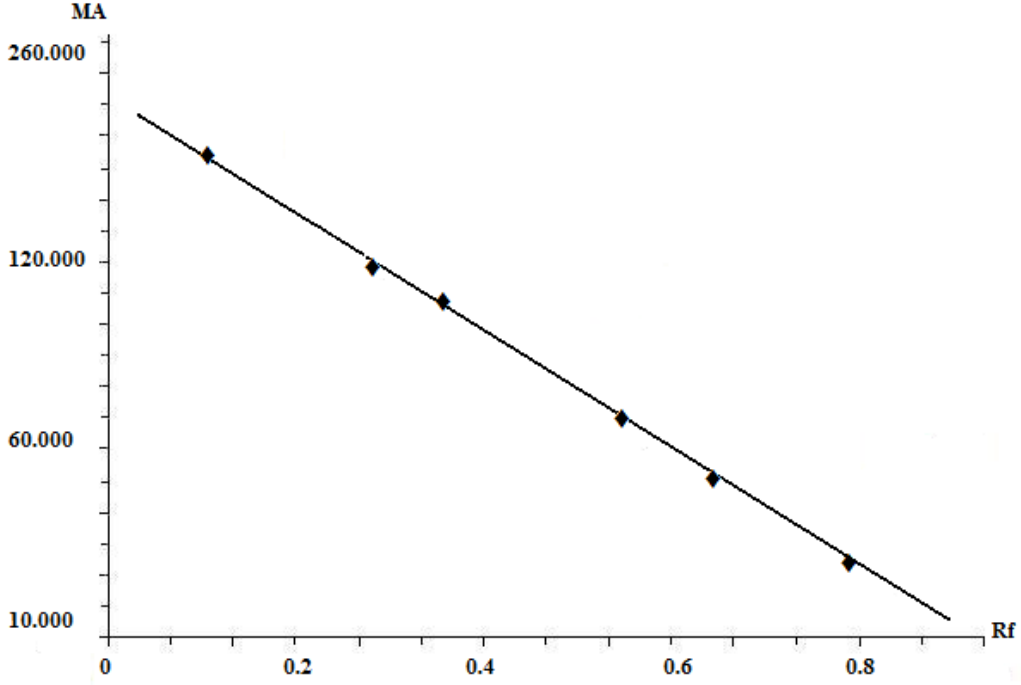
Şekil 4.24. *B. licheniformis* KG9'a ait saflaştırılmış doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant *E. coli*'ye ait saflaştırılmış β -galaktosidazının nondenatüre-PAGE elektroforezi [1:Novex Sharp Prestained Protein Standardı, 2: rekombinant *E. coli*'ye ait ham özü, 3: rekombinant *E. coli*'ye ait çöktürme ve diyaliz sonrası, 4: rekombinant *E. coli*'ye ait iyon-değişim kromatografisi, 5: *B. licheniformis* KG9'a ait ham özü, 6: *B. licheniformis* KG9'a ait çöktürme ve diyaliz sonrası, 7: *B. licheniformis* KG9'a ait iyon-değişim kromatografisi]

Molekül ağırlığını hesaplamak için; non-denatüre PAGE sonucu jel üzerindeki 1 numaralı kuyucukta kullanılan standart proteinin her biri için Rf değerleri ölçüldü.

$$Rf = \frac{\text{Proteinin aldığı yol}}{\text{İz boyanın aldığı yol}}$$

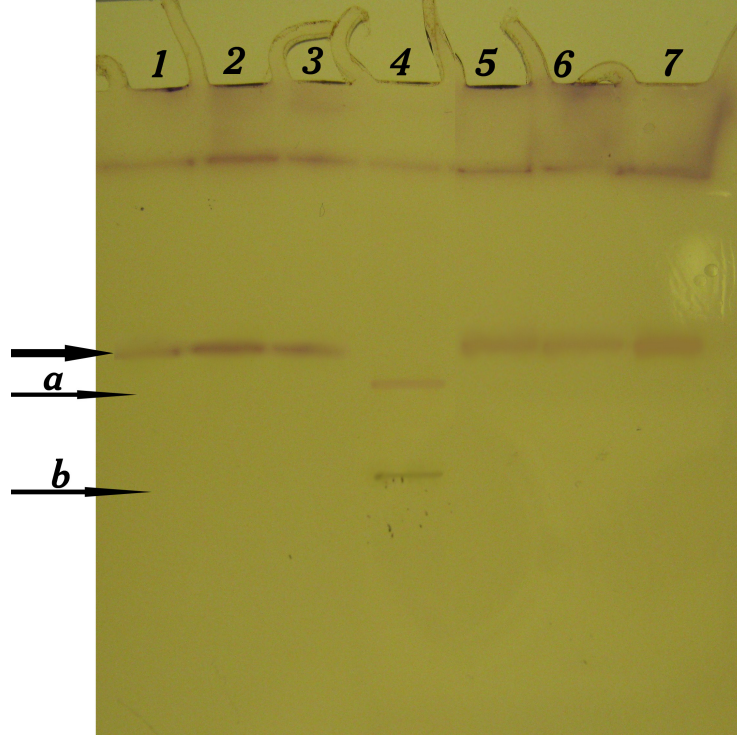
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Her bir standart proteinin moleköl ağırlığı ile hesaplanan Rf değerleriyle grafik çizildi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Standart proteinlerin MA değerlerinin Rf değerlerine göre değişimi

Şekil 4.26'da görüldüğü gibi rekombinant *E. coli*'ye 1, 2, 3 ve *B. licheniformis* KG9'a ait 5, 6, 7 numaralı jel kuyucuklarındaki saflaştırma adımları sonrası örneklerin BNG boyama sonucunda tek bant halinde ve iyi aktivite gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.26. *B. licheniformis* KG9'a ait saflaştırılmış doğal ekstraselüler β -galaktosidaz ve rekombinant *E. coli*'ye ait saflaştırılmış β -galaktosidazının BNG boyamalı elektroforezi [1: rekombinant *E. coli*'ye ait ham özüt, 2: rekombinant *E. coli*'ye ait çöktürme ve diyaliz sonrası, 3: rekombinant *E. coli*'ye ait iyon-değişim kromatografisi, 4a: Standart protein (80 kDa) 4b: Standart protein (50 kDa) 5: *B. licheniformis* KG9'a ait ham özüt, 6: *B. licheniformis* KG9'a ait çöktürme ve diyaliz sonrası, 7: *B. licheniformis* KG9'a ait iyon-değişim kromatografisi]

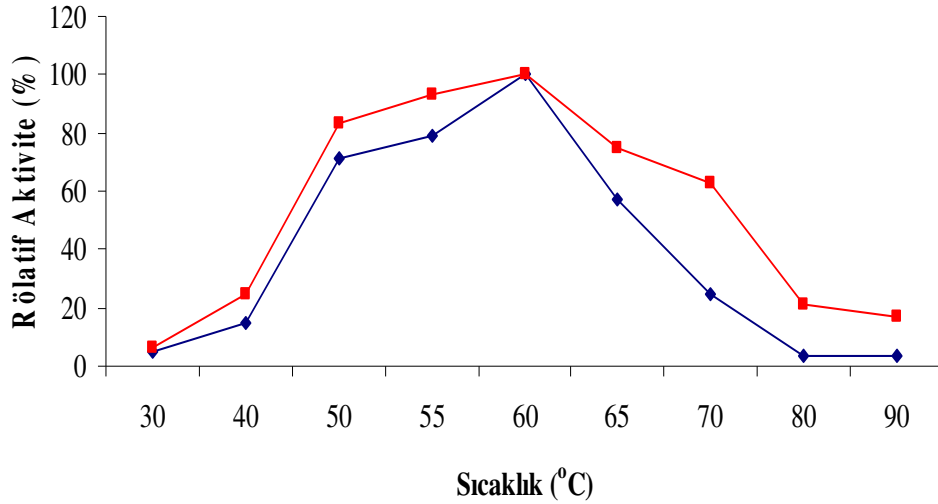
Her iki boyama (Commassie Brilliant Blue R-250 ve BNG) sonucunda enzimin büyük oranda saf olarak elde edildiği görülmektedir. Saflaştırma aşamalarından amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz homojen saf enzim elde etmek için gereklidir. Hem *B. licheniformis* KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidazın hem de rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın protein kayıplarının çok olması ve verimin düşük elde edilmesi nedeniyle Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisinin saflaştırma basamaklarında kullanılmamasına karar verildi. Ayrıca hem doğal ekstraselüler β -galaktosidazın hem de rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın afinite kromatografisine bağlanmaması veya zayıf bağlanması nedeniyle saflaştırma için kullanılmayacağı belirlendi.

4.8. Enzim Karakterizasyonu

B. licheniformis KG9'a ve rekombinant *E.coli*'ye ait β -galaktosidazın saflaştırılmasıyla ilgili Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilen saflaştırma adımlarına ait sonuçlar karşılaştırıldığında *B. licheniformis* KG9'a ait β -galaktosidazın saflaştırma adımlarından sonra *E.coli*'ye ait β -galaktosidaza göre daha yüksek verimde olmasından dolayı enzim karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar saflaştırma adımlarından sonra elde edilen *B. licheniformis* KG9'a ait β -galaktosidaz üzerinde yapılmıştır.

4.8.1. Optimum Sıcaklık Tayini

β -Galaktosidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi saflaştırma adımlarından sonra araştırılmıştır. *B. licheniformis* KG9'a ait saflaştırma sonrası elde edilen enzim aktivitesinin optimum sıcaklığını belirlemek için farklı sıcaklıklarda (30-90°C) 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.0) içerisinde 60 mM ONPG substratı kullanılarak tespit edildi.



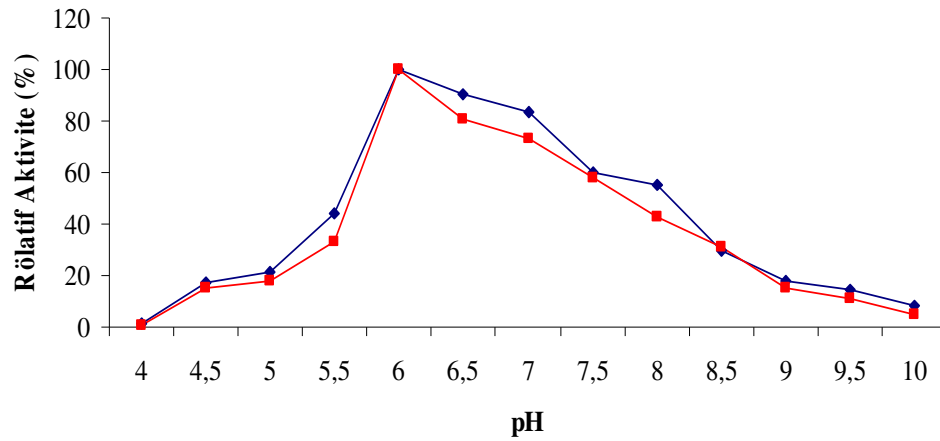
Şekil 4.27. *B. licheniformis* KG9'a ait saflaştırma öncesi ve sonrası elde edilen enzimin optimum sıcaklığı

Şekil 4.27'de *B. licheniformis* KG9'a ait hem saflaştırma öncesi (kırmızı çizgi) hem de saflaştırma sonrası (mavi çizgi) elde edilen enzimin optimum sıcaklığı görülmektedir. Saflaştırma öncesi ve sonrası enzim aktivitesinin 40°C'den sonra sıcaklık artışına bağlı olarak arttığı ve 60°C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği,

60°C'den sonra sıcaklık artışıyla aktivitede azalma olduğu görülmektedir. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlendi.

4.8.2. Optimum pH Tayini

B. licheniformis KG9'a ait saflaştırma adımlarından sonra elde edilen β -galaktosidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisini araştırmak için; farklı pH (4.0-10.0) değerlerinde hazırlanan 60 mM ONPG substratı kullanılarak optimum sıcaklıkta enzim aktivitesi tespit edildi.

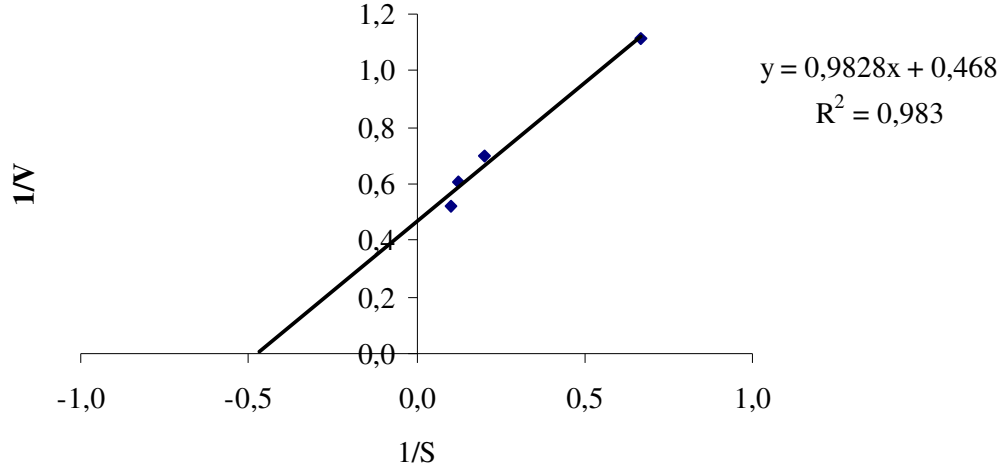


Şekil 4.28. *B. licheniformis* KG9'a ait saflaştırma öncesi ve sonrası elde edilen enzimin optimum pH'sı

Şekil 4.28'de *B. licheniformis* KG9'a ait hem saflaştırma öncesi (kırmızı çizgi) hem de saflaştırma sonrası (mavi çizgi) elde edilen enzimin optimum pH'sı görülmektedir. Saflaştırma öncesi ve sonrası enzim aktivitesinin pH 4.5'ten sonra pH artışına bağlı olarak arttığı ve pH 6.0'da en yüksek aktiviteyi gösterdiği, pH 6.0'dan sonra pH artışıyla aktivitede azalma olduğu görülmektedir. Enzimin optimum pH'sı 6.0 olarak belirlendi.

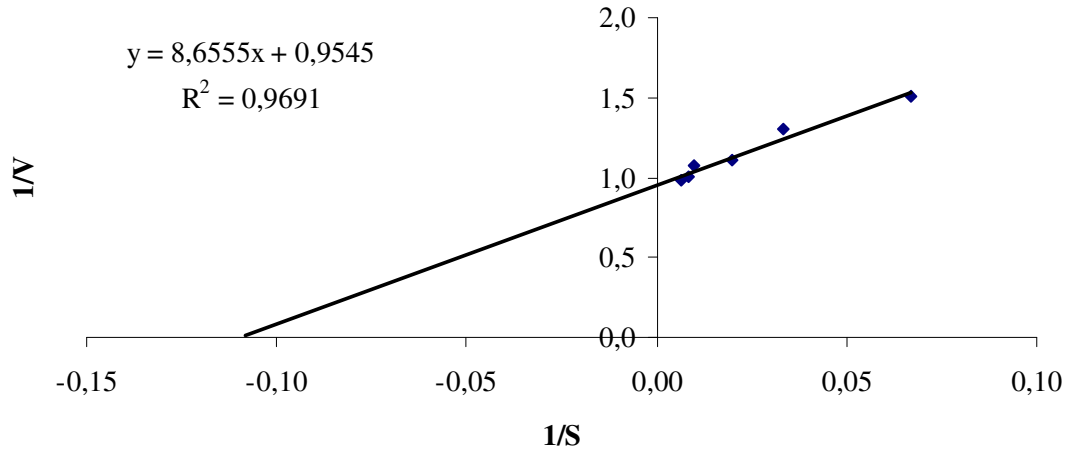
4.8.3. Substrat Özgünlüğü

ONPG konsantrasyonları 1-10 mM, laktoz konsantrasyonları 1-200 mM olacak şekilde 0.1 M sodyum fosfat (pH 6.0) tamponunda hazırlanarak substrat olarak kullanıldı ve enzim aktivitesi ölçüldü. ONPG ve laktozun K_m ve V_{max} değerleri Linewear-Burk eşitliği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 4.29. ONPG konsantrasyonunun bağlı Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.29'da elde edilen verilerle ONPG konsantrasyonuna bağlı enzimin K_m değeri 2.0792, V_{max} değerleri de 2.037 $\mu\text{mol/dk}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.30. Laktoz konsantrasyonunun bağlı Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.30'da elde edilen verilerle laktoz konsantrasyonuna bağlı enzimin K_m değeri 9.068 mM, V_{max} değerleri de 1.0476 $\mu\text{mol/dk}$ olarak hesaplandı.

4.8.4. Metal iyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim, farklı konsantrasyondaki (1, 2.5, 5, 10, 25 mM) CoCl₂, MgCl₂, NiCl₂, CaCl₂, MnCl₂, HgCl₂, AgCl₂, FeCl₂ ve EDTA ile 15dk. muamele edildi ve daha sonra ONPG eklendi ve reaksiyon sonucunda oluşan o-Nitrofenol ürün miktarı 420 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kontrole karşı eklenen metal enzimin rölatif aktivitesi hesaplandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Metal iyonları ve EDTA'nın enzim aktivitesine etkisi									
Metaller	Co ⁺²	Mg ⁺²	Ni ⁺²	Ca ⁺²	Mn ⁺²	Hg ⁺²	Ag ⁺²	Fe ⁺²	EDTA
Konsantrasyon									
1 mM	81	93	61	102	66	0	0	61	99
2.5 mM	93	98	53	111	96	0	3	87	104
5 mM	97	101	47	129	106	0	0	71	93
10 mM	85	135	31	147	61	0	0	18	78
25 mM	51	94	18	87	33	0	0	0	41

Kontrol grubunda herhangi bir metal eklenmeden aktiviteye bakılmıştır ve rölatif aktivite 100 olarak kabul edilmiştir. Çizelgede verilen değerler rölatif aktiviteyi göstermektedir.

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi metaller ve EDTA'nın etkisini belirlemek için farklı konsantrasyondaki (1, 2.5, 5, 10, 25 mM) CoCl₂, MgCl₂, NiCl₂, CaCl₂, MnCl₂, HgCl₂, AgCl₂, FeCl₂ ve EDTA kullanılarak test edildi. Kontrole karşılaştırıldığında 10 mM Ca⁺² (%147), 5 mM Mn⁺² (%106) ve 10 mM Mg⁺²'nin (%135) aktiviteyi artırdığı; Co⁺² ve Ni⁺²'nin artan konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin azaldığı, 10 mM Fe⁺²'nin aktiviteyi %82, 25 mM EDTA'nın ise aktiviteyi %59 azalttığı, Ag⁺² ve Hg⁺²'nin ise enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği tespit edildi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda termofilik kaynaklar ve bu kaynakların ekolojik özellikleri ile ilgili çalışmalar mikrobiyoloji, biyoteknoloji gibi alanlarda ilgi çekmektedir. Ülkemizin çeşitli bölgelerinde çok sayıda doğal sıcak su kaynağı bulunmaktadır. Sıcak su kaynakları gibi ekstrem çevrelerden elde edilen mikroorganizmaların enzimleri, taşıdıkları spesifik özelliklerden dolayı atıkların arıtımı, gıda, tekstil, ilaç sanayine kadar çok sayıda alanda uygulama alanı bulmaktadır. Vasiljevic ve Jelen (2001), β -galaktosidaz enziminin çok geniş organizma grubu tarafından üretilse de, endüstriyel olarak en iyi üreticilerin bakteriler olduğunu belirterek, süt endüstrisi için oldukça önemli olan β -galaktosidaz enziminin üretimini termofilik laktik asit bakterilerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Chakraborti ve ark. (2003) termofilik *B. polymyxa*, Kara (2004) *L. plantarum*, Soydan (2006) ve Sarıgül (2007), *Thermus* genusu, Dağbağlı (2009) *Kluyveromyces* türü mayalardan β -galaktosidaz enzimi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bilindiği gibi *Bacillus* suşları ürettikleri enzimleri hücre dışına salgılaya yeteneğinde olduklarından endüstriyel enzim üretiminde en çok kullanılan bakteri konumundadırlar. Ayrıca patojen olmamaları ve endospor oluşturmaları bu bakterilerin enzimlerinin mikrobiyal kontaminasyon riskinin düşük olması ve geniş pH'larda aktivite gösterebilmesi gibi sebeplerden dolayı bu çalışmada *B. licheniformis* KG9 tercih edilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, *B. licheniformis* DSM 13 suşunun tüm genomu rapor edilmiştir ve bu, genomun biyoteknolojik uygulamalar için önemli enzimleri kodlayan bazı genleri içerdiğini göstermektedir (Veith ve ark 2004). Böylece, endüstriyel enzimler ile ilgili sonraki çalışmaların aydınlatılmasında daha fazla bilgi için bir kapı açmıştır (Juajun ve ark. 2010).

Makromoleküllerin filogenetik analizlerde kullanılması pek çok çalışma için önemli bilgiler sağlamaktadır. rRNA'ların özellikle de 16S rRNA'nın yapısında büyük bir oranda bilgi içermektedir ve yapısının evrimsel olarak korunmasından dolayı akrabalık incelemesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. *B. licheniformis* DSM 13 suşunun tüm genomunun daha önceki çalışmalarda açıklanması ve bu suşun genomunun biyoteknolojik uygulamalar için önemli enzimleri kodlayan bazı genleri içerdiğinin belirtilmesiyle endüstriyel enzimler ile ilgili yaptığımız çalışmada *B. licheniformis* KG9 suşunun gen klonlamada kullanılmasını kolaylaştırmıştır. Bu çalışmada, sıcak su

kaynağından elde edilen *B. licheniformis* KG9 ekstraselüler β -galaktosidazı fazla miktarda üretmesinden ve daha önce yapılan (Gül Güven 2007) 16S rRNA analizlerine göre tüm genomu bilinen *B. licheniformis* DSM 13 suşuna %99.9 benzerlik gösterdiğinden dolayı klonlama çalışmaları için kullanılmıştır.

Değişik mikroorganizmalarda β -gal geni daha önce klonlanmış (Saito 1989, Phan Trân ve ark. 1998, Hoyoux ve ark. 2001, Karasová-Lipovová ve ark. 2003, Kim ve ark. 2006, Lu ve ark. 2007, Nguyen ve ark. 2007, Söyler 2004, Chen ve ark. 2008, Yuan 2008, Li ve ark. 2009, Hildebrandt ve ark. 2009, Juajun ve ark. 2010, Schmidt ve Stougaard 2010), *B. licheniformis*'ten intraselüler β -galaktosidaz kodlayan genler Phan Trân ve ark. (1998) tarafından *E.coli*'ye aktarılarak DNA baz dizileri okunarak yayınlanmıştır. Daha önce *B. licheniformis* DSM 13'ten Juajun ve ark. (2010) tarafından intraselüler sıcaklığa dirençli β -gal geni pOJBlilacA2 plazmiti yardımıyla *E.coli*'ye klonlanmıştır.

B. licheniformis KG9'un termostabil β -galaktosidazı hem ekstraselüler olarak salgılaması, hem yüksek aktiviteye sahip olması, hem de mikrobiyal kontaminasyon riskinin düşük olması nedeniyle bu çalışmada tercih edilmiştir. Çalışmamızda da *B. licheniformis* KG9 kullanılarak, termofilik bakterilere ait β -galaktosidaz geni, gen kütüphanesinden tarandı. PCR'a dayalı metodla izole edilen 4 farklı putative β -galaktosidaz geni (β -gal I, β -gal II, β -gal III, β -gal IV) çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri pUC18 Δ lacZ vektörüne klonlanarak *E. coli*'ye aktarıldı. Yaptığımız çalışmada termofilik β -galaktosidaz geninin *B. licheniformis* KG9 kromozomundan restriksiyon endonükleazlar tarafından doğrudan klonlanması yerine, bunun PCR ile amplifikasyonunun daha doğru olacağı düşünülmüştür. Rekombinant β -galaktosidaz enzim üretimi, endüstriyel proseslerde üretim koşullarının daha iyi tanınan *E.coli* gibi mikroorganizmalar için dizayn edilmesinin kolaylığı ve yüksek verim sağlaması nedeni ile tercih edilmektedir. Çalışmamızda *E. coli*'de termofilik β -galaktosidaz ekspresyonunu gerçekleştirerek bu enzimin ticari yönden önemli olan, düşük maliyetli substratlar kullanılarak üretilmesi, endüstriyel çapta enzim üretimi sağlanması konusunda avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Dizi analiz sonuçlarına göre; 4 farklı putatif β -galaktosidaz geninin amino asit sekans analizlerine göre, gen kütüphanesinde bulunan diğer GH-42'ye ait Gram pozitif

Bacillus türlerinin β -gal genlerine benzerlik gösterdiği görülmüştür. En yakın homolojilerin: β -gal I %42.9 *B. cereus*'tan tanımlanan β -gal'a; β -gal II %68.3 *B. circulans*'tan tanımlanan β -gal'a; β -gal III %68.8 *B. subtilis*'ten tanımlanan β -gal'a; β -gal VI %76.7 *B. subtilis*'ten tanımlanan β -gal'a yakınlık gösterdiği belirlendi.

Juajun ve ark. (2010) *B. licheniformis*'ten elde edilen β -galaktosidazın amino asit sekanslarının diğer bakterilerin sekanslarıyla benzerliklerinin %76.6 *B. subtilis* (GenBank accession number ABQM01000009), %47.9 *Clostridium perfringens* (GenBank accession number BAB79873), %36.9 *Bacillus circulans* (GenBank accession number AAA22258), %35.6 *B. stearothermophilus* (GenBank accession number P19668), %26.9 *Thermotoga neapolitana* (GenBank accession number AAC24217), %26.8 *Thermus thermophilus* (GenBank accession number BAA28362), %25.3 *Thermotoga maritima* (GenBank accession number AAD36270) ve %24.9 *Haloferax* sp. (GenBank accession number AAB40123)'den tanımlanan β -gal'a benzerlik gösterdiği ve Carbohydrate-Active Enzymes databank (<http://www.cazy.org>)'a göre amino asit benzerliklerine bağlı olarak GH-42 ailesinin üyesi olduğunu belirtmişlerdir.

Bu yönüyle daha önceki pek çok çalışmada β -galaktosidaz gen aktarımı çalışılmış olmasına rağmen ekstraselüler β -galaktosidazın gen aktarımı ile ilgili çalışmaya rastlanmamasından dolayı da önemlilik arz etmektedir. Ayrıca bu suşun bol miktarda ve yüksek aktivitede β -galaktosidaz üretmesinden dolayı bu enzimin saflaştırılması ve karakterize edilmesi de önemlilik göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda; Pisani ve ark. (1990), *Sulfolobus solfataricus*'tan termostabil β -galaktozidaz izoenzimini iyon-değişim ve jel filtrasyon kromatografilerini kullanarak, Shaikh ve ark. (1999), termofilik mantar *Rhizomucor* sp.'den ekstraselüler β -galaktosidazı DEAE-selüloz kromatografisi ve Sephacryl S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile, Chakraborti ve ark. (2000), *Bacillus* sp. MTCC 3088'den ekstraselüler yeni β -galaktozidaz enzimini iyon-değişim ve jel filtrasyon yöntemlerini kullanarak, Li ve ark. (2001), β -galaktosidazları asit karışımı çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE kromatografisi, con-A-Sefaroz ve kromatofokuslama yöntemleriyle, Gül Güven ve ark. (2007), *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*' den termostabil β -galaktozidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, iyon-değişim ve jel

filtrasyon ile, Uyanık (2008), β -galaktosidaz enzimini *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 mayasından jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi tekniklerini kullanılarak saflaştırmışlardır.

Çalışmamızda, hem *B. licheniformis* KG9 hem de rekombinant *E. coli*'den elde edilen β -galaktosidaz, DEAE-selüloz, Sephadex G-75 ve *p*-aminobenzil-1-thio- β -D-galaktopiranosid (PABTG-agarose) kromatografi yöntemleriyle saflaştırıldı. Saflaştırma yöntemlerinde kullanılan kromatografik tekniklerden jel filtrasyon yönteminde seçilen matriksin protein kaybına yol açmasından dolayı bu enzimin saflaştırma adımlarında kullanılmamasına karar verildi. Yapmış olduğumuz çalışmada, bütün saflaştırma aşamalarından amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selülozun homojen saf enzim elde etmek için gerekli olduğu, hem *B. licheniformis* KG9'a ait doğal ekstraselüler β -galaktosidaz hem de rekombinant *E. coli*'ye ait β -galaktosidazın affinite kromatografisine bağlanmaması veya zayıf bağlanması nedeniyle saflaştırma için kullanılmayacağı belirlendi. Bu durumdan dolayı GH-42 ailesinin bir üyesi olduğu düşünülmektedir. GH-2 ailesine ait β -galaktosidazlar affinite ile kolayca saflaştırılırken, GH-42 üyeleri affinite kolonuna bağlanmadığı için saflaştırılamamaktadır. Affinite kromatografisine bağlanamama sebebi Hidaka ve ark. (2002)'in yaptıkları çalışmada; enzime ait aktif merkezin protein yapısında büyük bir cep içerisinde yer aldığından, dolayısıyla aktif merkezin trimerik yapıda dış yüzeyde yer almamasından dolayı affinite kromatografisindeki bağlanma bölgeleri ile temas kuramadığı şeklinde izah edilmektedir.

Yaptığımız çalışmada *B. licheniformis* KG9'a ait β -galaktosidazın saflaştırma kat sayısı 9.4, verim %85 olarak belirlendi. Saf enzimin spesifik aktivitesinin 1230 U/mg, optimum sıcaklığının 60°C ve optimum pH'sının 6.0 olduğu belirlendi. Saflaştırılan enzimin moleköl ağırlığı non-denatüre PAGE ile yaklaşık 90 kDa olarak tespit edildi. *E.coli*'ye ait β -galaktosidazın spesifik aktivitesi 44.3 U/mg, enzimin saflaştırma kat sayısı 2.46, verimi %7 olarak belirlendi.

Hirata ve ark. (1984) *B. stearothermophilus*'tan elde edilen β -galaktosidazların moleköl ağırlığının 120, 95 ve 70 kDa olduğu belirtilmiştir. *Thermoanaerobacter* (Lind ve ark. 1989), *B. subtilis* (Rahim ve ark. 1991), *B. circulans* (Mozaffar ve ark. 1984) ve bazı *Bifidobacterium* (Berger ve ark. 1997) türlerinden elde edilen β -galaktosidazların

izoenzimlerinin mevcut olduğunu belirtilmiştir. *B. stearothermophilus*'tan elde edilen β -galaktosidazın üç izoenzimi belirtilmiştir ve molekül ağırlıklarının 120, 95 ve 70 kDa olduğu Hirata ve ark. (1984) tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir.

β -galaktosidazın saflaştırılmasıyla ilgili yapılan önceki çalışmalarda; Chang ve Mahoney (1989), *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*'tan elde ettikleri termostabil saf β -galaktosidazın spesifik aktivitesini 592 U/mg, verimini %46 olarak elde etmişlerdir. Leng ve ark. (1998), *Flavobacterium keratolyticus*'tan endo β -galaktosidazı *E.coli*'ye klonlayıp, *E.coli*'de eksprese olan bu enzimi saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesini 148 U/mg, SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığını 43 kDa olarak belirlemişlerdir. Ohtsu ve ark. (1998), sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Thermus* sp. A4' ten termofilik β -galaktosidazı saflaştırıp enzimin yeni GH42 ailesinden olduğunu ve SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığını 75 kDa olarak belirlemişlerdir. Phan Trân ve ark. (1998) *E.coli*'de *lacBl* gen ürününün molekül ağırlığını 80 kDa olarak belirlemişlerdir ve *B. stearothermophilus*'ta *bgaB* geninin ürününün 78 kDa, *Arthrobacter* sp.'den elde edilen β -galaktosidaz izoenzimlerinin 71 kDa molekül ağırlığında olduğunu çalışmalarında bildirmişlerdir. Shaikh ve ark. (1999), termofilik mantar *Rhizomucor* sp.'den saflaştırdıkları ekstraselüler β -galaktosidaz enziminin saflaştırma kat sayısını 60, verimi %32 olarak belirlemişlerdir. Chakraborti ve ark. (2000), *Bacillus* sp. MTCC 3088'den saflaştırdıkları ekstraselüler yeni β -galaktosidaz enziminin saflaştırma kat sayısını 36.2, verimi %12.7 olarak belirlemişlerdir. Li ve ark. (2001), çalışmalarında saflaştırma sonrası elde ettikleri β -galaktosidazın saflaştırma kat sayısını 10.4, verimi %44.4 olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 78 ve 76 kDa olarak tespit edilmiştir. Gül Güven ve ark. (2007), *Thermus aquaticus*'tan elde edilen termofilik β -galaktosidazın molekül ağırlığının 144 kDa, *B. stearothermophilus*'ta ise 120 kDa olduğunu bildirmişlerdir. *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'den termostabil β -galaktosidaz enziminin saflaştırma kat sayısını 163, verimi %8 olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 165 ve 76 kDa olarak tespit edilmiştir. Di Laura ve ark. (2008), *A. acidocaldarius*'de β -galaktosidaz enziminin saflaştırılmasını, karakterizasyonunu, genin klonlanmasını, ekspresyonunu ve rekombinant enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin yeni GH-42

ailesinden olduğunu bildirmişlerdir. Uyanık (2008), β -galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonunu çalışmıştır. Yapılan çalışmada, *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y1140 mayasından saflaştırılan β -galaktosidaz enziminin molekül ağırlığını 135 kDa olarak belirlemiştir.

B. licheniformis KG9'dan ve rekombinant *E.coli*'den elde ettiğimiz ve saflaştırma adımlarını uyguladığımız β -galaktosidazın molekül ağırlığı, 120 kDa molekül ağırlığında *Achatina achatina* (Leparoux ve ark. 1997), *Rhizomucor* sp. (Shaikh ve ark. 1999), *T. maritima* (Gabelsberger ve ark. 1993, Kim ve ark. 2004) ve *Enterobacter agglomerans* B1 (Lu ve ark. 2007)'tan elde edilen β -galaktosidazlar ile karşılaştırıldığında yakın molekül ağırlığına sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca saflaştırma adımlarından sonra *B.licheniformis* KG9'a ait β -galaktosidazın spesifik aktivitesi daha önce termofilik mikroorganizmalarla yapılan çalışmalara kıyasla daha yüksek elde edilmiştir.

B. licheniformis KG9'a ait β -galaktosidazın saflaştırma adımlarından sonraki optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. Değişik termofilik mikroorganizmalardan elde edilen ve saflaştırılan β -galaktosidaz enziminin optimum sıcaklığı çalışmamızda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Chakraborti ve ark. (2000) *Bacillus* sp. MTCC 3088'den 60°C, Pisani ve ark. (1990) *Sulfolobus solfataricus*'tan 75°C, Torres ve Lee (1995) *B. subtilis*'ten 50°C, Berger ve ark. (1997), *Thermus aquaticus* YT-1'den 80°C, Fokina ve Velikodvorskaia (1997), termofilik anaerob *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E'den 75-80°C, Vetere ve Paoletti (1998) *B.circulans*'tan sırasıyla 44°C, 74°C, 60°C, Di Laura ve ark. (2008) *A. acidocaldarius*'dan 60°C'de optimum β -galaktosidaz aktivitesi elde etmişlerdir.

B.licheniformis KG9'a ait β -galaktosidazın optimum pH'sı 6.0 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç *B. subtilis*'ten (Torres ve Lee 1995) elde edilen β -galaktosidaz, *Pyrococcus wosei*'den (Dabrowski ve ark. 1998) elde edilen β -galaktosidaz, *Thermus* sp. IB-21'den (Kang ve ark. 2005) elde edilen laktoz-hidrolaz, *T. maritima*'dan (Li ve ark. 2009) elde edilen BgalB, *B. circulans*'tan (Vetere ve Paoletti, 1998), *B. licheniformis*'ten (Phan Trân ve ark. 1998), *T.maritima*'dan (Kim ve ark. 2004) ve *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'den (Gül Güven ve ark. 2007) elde edilen GH-42 ailesine ait bazı termostabil β -galaktosidazlar ile benzer özellik göstermektedir. Yuan ve

ark. (2008), β -galaktosidazların tam yağlı süt (pH 5.8-6.0) ya da peynir altı suyu (pH 6.0) gibi süt ürünlerinde (pH 5.5-7.0) nötral pH'da laktoz hidrolizinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada saflaştırma sonucu elde ettiğimiz enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH'sı süt ve süt ürünlerinin işlenmesi ve laktoz hidrolizi gibi işlemlerde kullanılabileceğini göstermektedir.

Genellikle GH-42 ailesi olarak sınıflandırılan β -galaktosidazların laktoz hidrolizi zayıftır ve *pNPGal* veya *oNPGal* gibi substratları hidrolizlemeyi tercih ederler (Kosugi ve ark. 2002, Møller ve ark. 2001, Phan Trân ve ark. 1998, Shipkowski ve Brenchley 2006). Chakarboti ve ark. (2000), çalışmalarında β -galaktosidaz enzimin ONPG konsantrasyonuna bağlı K_m değerini 6.34 mM, V_{max} değerini de 9351 IU ml⁻¹ olarak, laktoz konsantrasyonuna bağlı enzimin K_m değerini 6.18 mM, V_{max} değerini de 909 x 10⁻⁵ IU ml⁻¹ olarak bulmuşlardır. Gül Güven ve ark. (2007), *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*'den elde edilen termofilik β -galaktosidazın ONPG konsantrasyonuna bağlı K_m değerini 8.9 mM, V_{max} değerini de 1074 dk⁻¹ olarak bulmuşlardır. Sørensen ve ark. (2006), çalışmalarında değişik mikroorganizmalara ait β -galaktosidazların ONPG konsantrasyonuna bağlı K_m değerini ve V_{max} değerini bildirmiştir. Bu mikroorganizmalardan *Bifidobacterium infantis*'ten elde edilen β -galaktosidazın K_m değerinin 2.6, V_{max} değerinin 262 U mg⁻¹ ve optimum sıcaklığının 60°C olduğunu ve GH42 ailesine ait β -galaktosidazlar ile benzer özellikte olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *B. licheniformis* KG9'a ait saflaştırılan enzimin ONPG konsantrasyonuna bağlı K_m değeri 2.0792 mM, V_{max} değerleri de 2.037 μ mol/dk olarak, laktoz konsantrasyonuna bağlı enzimin K_m değeri 9.068 mM, V_{max} değerleri de 1.0476 μ mol/dk olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre enzimin substrat olarak ONPG'ye ilgisinin laktoza göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ve GH-42 ailesinde sınıflandırılan β -galaktosidazlar ile benzer özellik göstermektedir.

Genellikle β -galaktosidazlar metal iyonları ya da diğer reaktifler ile aktive veya inhibe olabilirler (Shaikh ve ark. 1999, Lu ve ark. 2007,). Pek çok β -galaktosidaz enzimini Mg⁺² iyonları aktive ederken (Ohtsu ve ark. 1998, Kim ve ark. 2004, Wanarska ve ark. 2005, Lu ve ark. 2007), Hg⁺² ve Cu⁺² iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği daha önceki çalışmalarda (Onishi ve Tanaka 1995, Ohtsu ve ark. 1998, Shaikh ve ark. 1999, Ladero ve ark. 2002, Wanarska ve ark. 2005, Shipkowski ve

Brenchley 2006) belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada, saflaştırılan enzim üzerine metaller ve EDTA'nın etkisini belirlemek için farklı konsantrasyondaki (1, 2.5, 5, 10, 25 mM) CoCl₂, MgCl₂, NiCl₂, CaCl₂, MnCl₂, HgCl₂, AgCl₂, FeCl₂ ve EDTA kullanılarak test edildi. Ca⁺² (%147), Mn⁺² (%106) ve Mg⁺²'nin (%135) aktiviteyi artırdığı; Ag⁺², Fe⁺² ve Hg⁺²'nin ise enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edildi. Daha önceki çalışmalarda; Somkuti ve ark. (1979), Chakraborti ve ark. (2000) ve Karasová-Lipovová ve ark. (2003), Juajun ve ark. (2010), Ustok ve ark. (2010) ve Gül Güven ve ark. (2011), saf β-galaktozidazın Mg⁺² ile enzim aktivasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Berger ve ark. (1997), β-galaktozidaz enzim aktivitesinin CaCl₂ ile arttığını tespit etmişlerdir. Khalid ve ark. (1991), β-galaktozidaz enzim aktivitesini Cu⁺², Itoh ve ark. (1993), Chakraborti ve ark. (2003) ve Ustok ve ark. (2010), Fe⁺² iyonlarının β-galaktozidaz enzimine büyük oranda inhibisyon etkisinin olduğunu çalışmalarında bildirmişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak aşağıda verilen çalışmalar önerilebilir:

1. *B. licheniformis*'e ait sıcaklığa dirençli β-galaktosidaz geninin, sıcaklığa dirençli farklı endüstriyel enzimleri üretebilen *Bacillus* türlerine klonlanmasıyla biyoteknolojik ve endüstriyel alanlar için her iki enzimi de üreten özel bir endüstriyel suş geliştirilebilir.
2. *E.coli*'ye aktarılan termofilik β-galaktosidaz enziminin daha yüksek verimde ve tek aşamada saflaştırılması ve elde edilen saf enzimin karakterizasyonu gerçekleştirilebilir.
3. Sıcaklığa dirençli β-galaktosidazın karakterizasyonuna yönelik, farklı yapay substratlar (*o*-NO₂-fenil-β-D-galaktopiranosid, *p*-NO₂-fenil-β-D-galaktopiranosid, *p*-NO₂-fenil-α-l-arabinopiranosid, *p*-NO₂-fenil-β-l-arabinopiranosid, *p*-NO₂-fenil-α-D-mannopiranosid, *p*-NO₂-fenil-α-l-fukopiranosid, *p*-NO₂-fenil-α-D-galaktopiranosid, *p*-NO₂-fenil-α-D-glukopiranosid) kullanılarak hidroliz yeteneği araştırılarak, enzimin β-D-anomerik bağlara davranışı belirlenebilir.
4. Farklı karbonhidrat kaynaklarının enzime etkisi araştırılarak inhibisyon olup olmadığı ve varsa hangi çeşit inhibisyonu gösterdikleri belirlenebilir. Ayrıca GOS üretimi araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Akman, S.B. 2007. Avrupa Birliğinin biyoteknolojik ürün ve uygulamalara yönelik tüketici politikası ve Türkiye'nin uyumu. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 128.
- Alagöz, D. 2007. β -Galaktosidaz ve glukoz izomerazın eupergit desteğe kovalent immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin laktoz hidrolizi ve glukoz izomerizasyonunda kullanılması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 72.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2003. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Türkiye Bilimler Akademisi Yayınları, Sayfa: 1463. Ankara.
- Anson, D.S., Limberis, M. 2004. An improved β -galactosidase reporter gene. *Journal of Biotechnology*, 108: 17–30.
- Arda, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara
- Arıkan, B. 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99: 3071-3076.
- Atasoy Ulusoy, Ö.İ., Görgül G. 2006. Polimeraz zincir reaksiyonu (pcr) ve endodontik mikrobiyoloji. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg.*, 16(2):61-65.
- Aykut, U., Temiz, H., Dervişoğlu, M. 2008. β -Galaktosidaz'ın transgalaktosilasyon yönü ve galaktooligosakkarit sentezi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Bayramoğlu, G., Tunalı, Y., Arica, M.Y. 2007. Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8: 1094–1101.
- Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:338–344.
- Berger, J.L., Lee, B.H., Lacroix, C. 1997. Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β -galactosidase isoenzyme from *Thermusaquaticus* YT-I. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 25(1):29-4.
- Beuzekom, B. Arundel, A. 2009. OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development) Biotechnology statistics. 103.
- Brown, T.A. 2009. Gen Klonlama ve Dizi Analizi. Yaşam Bilimleri Fakültesi Manchester Üniversitesi. Nobel Yayın Dağıtım, Yayın no: 1437, Sayfa: 386. Ankara.
- Campuzano, S., Serra, B., Llull, D., García, J. L., García, P. 2009. Cloning, expression, and characterization of a β -galactosidase from *Streptococcus mitis*, a peculiar choline-binding protein. *Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.00618-09

Cantrel, B. L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. 2009. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37: 233–238.

Chang, B.S., Mahoney, R.R. 1989. Purification and thermostability of β -galactosidase (lactase) from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *Journal of Dairy Research*, 56 : 117-127.

Chakraborti, S., Sani, R.K., Banerjee, U.C., Sobti, R.C. 2000. Purification and characterization of a novel β -galactosidase from *Bacillus* sp. MTCC 3088. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24: 58-63.

Chakraborti, S., Sani, R. K., Banerjee, U.C., Sobti, R.C. 2003. Production and partial characterization of a novel β -galactosidase from a newly isolated *Bacillus polymyxa*. *Scientia Iranica*, 10(3):279–286.

Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao J., Tian, F., Zhang, H. 2008. Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 91:1751–1758.

Cooper G.M., Hausman R.E. 2006. Hücre Moleküler Yaklaşım. İzmir Kitapevi, Sayfa: 714. İzmir.

Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., 2002. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 57-61.

Çelik, N. 2006. *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırılan alkalen proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu^{+2} iyonları ile termostabilizasyonu. Yüksek lisans tezi. Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli. 92.

Çerçi, B., Koçyiğit, A., Karaboz, İ. 2011. Gıdaların işlenmesinde kullanılan enzimlerin rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9 (3): 1-7.

Dabrowski, S., Maciun'ska, J., Synowiecki, J. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the thermostable β -galactosidase gene from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. *Molecular Biotechnology*, 10(3):217–222.

Dağbağlı, S., 2009. Beta-galaktosidaz enzim üretiminin optimizasyonu ve saflaştırılması. Doktora tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.192.

De Cleck, E., De Vos, P. 2004. Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources. *FEMS Microbiology Letters*. 231: 91-98.

Di Laura, B., Strazzulli, A., Perugino, G., La Cara, F., Bedini, E., Corsaro, M. M., Rossi, M., Moracci, M. 2008. Isolation and characterization of a new family 42 β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*: identification of the active site residues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784: 292-301.

Dokuz Eylül Üniversitesi. 2012. Rekombinant DNA teknolojisi, klonlama ve vektörler. Erişim: [http://www.deu.edu.tr/UploadedFiles/Birimler/16928/rekombinant_dna_tek__vektorler.pdf]. Erişim tarihi: 03.01.2012

Dominques, L, Lima, N, Teixeira, J.A. 2005. *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry** 40: 1151–1154.

DPT: 2515 - ÖİK: 533. 2000. Biyoteknoloji ve biyogüvenlik özel ihtisas komisyon raporu. Ankara.

Ercan-Akkaya, S. 2005. Sıcak su kaynaklarından termofilik bakteri türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu. Doktora tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir. 152.

Fokina, NA, Velikodvorskaia, GA. 1997. Cloning and expression of the gene for thermostable beta-galactosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* in *Escherichia coli*: purification and properties of the product. **Mol Gen Mikrobiol Virusol**, 2:34-6.

Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 94: 518-525.

Gabelsberger, J., Liebl, W., and Schleifer, K.H. 1993. Cloning and characterization of β -galactoside and β -glucoside hydrolysing enzymes of *Thermotoga maritima*. **FEMS Microbiology Letters**, 109(2-3): 131–137.

Glazer, A.N., Nikaïdo, H. 1995. Microbial enzymes. Microbial biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology, W.H. Freeman and Company, USA.

Göğüş, F., Fadıloğlu, S., 2006. Food Chemistry, Nobel Yayın Dağıtım, Sayfa:344. Ankara.

Grosova, Z., Rosenberg, M., Rebros, M. 2008. Perspectives and applications of immobilized β -galactosidase in food industry: a review. **Czech Journal of Food Science**, 26: 1–14.

Gül Güven, R., Güven, K., Poli A., Nicolaus, B., 2007. Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *Rittmannii* isolated from Antarctica. **Enzyme and Microbial Technology**, 40:1570–1577.

Gül Güven, R., 2007. sıcak su kaynaklarından bakteri izolasyonu, tanımlanması ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* Subsp. *Rittmannii*'nin β -galaktozidaz enziminin saflaştırılması, Doktora tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır. 198.

Gül Güven, R. 2011. Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR**, 9(1): 1-10.

Güven, K. 2011. Biyoteknoloji. Erişim: [https://www.anadolu.edu.tr/aos/kitap/IOLTP/2282/unite24.pdf]. Erişim Tarihi: 22.12.2011

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

Haris, E.L.V. 1989. Protein Purification Methods. Oxford University Pres, Sayfa:316. Oxford/England.

Hart-Davis, A. 2011. Bilim Atlası. Boyut Yayıncılık, İstanbul. 512.

Hartley, J.L. 2006. Cloning technologies for protein expression and purification. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 359–366.

Hilderbrand, P., Wanarska, M., Kur, J. 2009. A new cold-adapted β -D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c-gene cloning, overexpression, purification and properties. *BMC Microbiology*. 9: 151.

Hirata, H., Negoro, S. and Okada, H. 1984. Molecular basis of isozyme formation of β -galactosidase in *Bacillus stearothermophilus*: isolation of two b-galactosidase genes, bga A and bga B. *Bacteriology* 160: 9–14.

Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., Francois, J.M., Baise, E., Feller, G., Gerday, C. 2001. Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1529–1535.

Itoh, K., Toba, T., Itoh, T., Adachi, S. 1993. Properties of β -galactosidase of *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1 isolated from kefir grains, *Letters in Applied Microbiology*, 15: 232–234.

Jacobson, R.H., Zhang, X.J., DuBose, R.F., Matthews, B.W. 1994. Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. *Nature*., 369(6483): 761-6.

Juajun, O., Nguyen, T., Maischberger, T., Iqbal, S., Haltrich, D., Yamabhai, M., 2010. Cloning, purification, and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Applied Microbiology and Biotechnology*, DOI 10.1007/s00253-010-2862-2.

Kang, S.K., Cho, K.K., Ahn, J.K., Kang, S.H., Lee, S.H., Lee, H.K., Choi, Y.J. 2005. Cloning, expression, and enzyme characterization of thermostable β -glycosidase from *Thermus flavus* AT-62. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(6): 655-662.

Kara, F. 2004. Release and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. Yüksek tisans tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 122.

Karasová-Lipovová, P., Strnad, H., Spiwok, V., Maláa, S., Králová, B., Russell, N.J. 2003. The cloning, purification and characterisation of a cold-active β -galactosidase from the psychrotolerant Antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. C2-2. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 836–844.

Katrolia, P., Zhang M., Yan Q., Jiang J., Song C., Li L. Characterisation of a thermostable family 42 b-galactosidase (BgalC) family from *Thermotoga maritima* showing efficient lactose hydrolysis. *Food Chemistry*, 125: 614–621.

Khalid, A.A.R., Byong, H.L. 1991. Specificity, inhibitory studies, and oligosaccharide formation by p-galactosidase from psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL88, *Journal of Dairy Science*, 74: 1773 -1778.

- Kıymaz, T., Tarakçıoğlu, M. 2006. Biyoteknoloji alanındaki gelişmelerin yansımaları ve Türkiye'nin politika seçenekleri. *Planlama Dergisi Özel Sayı*. 235-242.
- Kıran E.Ö., Çömlekçioğlu U. 2003. Zeytin İlması (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(2):41-48.
- Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1):12-19.
- Kim, J.W., Rajagopal, S.N. 2000. Isolation and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiologica (Praha)*, 45: 29–34.
- Kim, C.S., Ji, E.S., Oh, D.K. 2004. Characterization of a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *Journal of Applied Microbiology*, 97:1006–1014.
- Kim, Y.S., Park, C.S., Oh, D.K., 2006, Lactulose Production from Lactose and Fructose by a Thermostable β -Galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 903-908.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:345–351.
- Klug, S.W., Cummings, W.R., 2000. Concept of Genetics, Prentice Hall, Sayfa:816. New Jersey.
- Kosugi, A., Murashima, K., Doi, R.H. 2002. Characterization of two noncellulosomal subunits, ArfA and BgaA, from *Clostridium cellulovorans* that cooperate with the cellulosome in plant cell wall degradation. *Journal of Bacteriology*, 184: 6859–6865.
- Koyama, Y., Okamoto, S., Furukawa, K. 1990. Cloning of alpha- and beta-galactosidase genes from an extreme thermophile, *Thermus strain T2*, and their expression in *Thermus thermophilus* HB27. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (7): 2251-2254.
- Kuk, S., Erensoy, A. 2008. Gen klonlama, plazmit seçimi ve *Fasciola hepatica* cathepsin L1 uygulamaları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (1):16-22.
- Ladero, M., Perez, M.T., Santos, A., Garcia-Ochoa, F. 2003. Hydrolysis of lactose by free and immobilized beta-galactosidase from *Thermus sp.* strain T2. *Biotechnology and Bioengineering*, 81: 241-252.
- Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B.C.C., Vian, A., Santos, A., Garcia-Ochoa, F. 2006. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2: Comparison to the free enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, 31: 14-24.
- Lee, M.F., Krasinski, S.D. 1998. Human adult-onset lactase decline: an update. *Nutrition Reviews*., 56: 1-8.

- Leng, L., Zhu, A., Zhang, Z., Hurst, R., Goldstein, J. 1998. Cloning, functional expression and purification of endo- β -galactosidase from *Flavobacterium keratolyticus*. **Gene**, 187-194.
- Leparoux, S., Padrines, M., Placier, G., Colas, B. 1997. Characterization of a strictly specific acid β -galactosidase from *Achatina achatina*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1336(3): 522-532.
- Li, S.C., Han, J.W., Chen, K.C., Chen, C.S. 2001. Purification and characterization of isoforms of beta- galactosidases in mung bean seedlings. **Phytochemistry**, 57(3): 349-59.
- Li, L., Zhang, M., Jiang, Z., Tang, L., Cong, Q. 2009. Characterisation of a thermostable family 42 β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. **Food Chemistry**, 112: 844-850.
- Lind, D.L., Daniel, R.M., Cowan, D.A., Morgan, H.W. 1989. β -galactosidase from a strain of the anaerobic thermophile, *Thermoanaerobacter*. **Enzyme and Microbial Technology**, 11: 180-186.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. 2011. Moleküler Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Sayfa:1150. Ankara.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Bioogical Chemistry**, 193: 265- 275.
- Lu, L., Xiao, M., Xu, X., Li, Z., and Li, Y., 2007, A novel β -galactosidase capable of glycosyl transfer from *Enterobacter agglomerans* B1, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 356(1): 78-84.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Sayfa: 992. Ankara.
- Marmur, J. 1961. A procedure fort he isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism. **Journal of Moecular Biology**, 3: 208-218.
- Matthews, B.W. 2005. The structure of *E. coli* β -galactosidase. **Comptes Rendus Biologies**, 328:549-556.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E. 2001. Polyphasic taxonomic study of thermophilic *Bacilli* from Shallow, marine vents system. **Applied Microbiology**. 24: 572-587.
- Mazı, B.G., Dungan, S.R., Hamamcı, H. 2008. β -Galaktosidaz'ın ters misel içerisinde çözünürlüğü. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Møller, P.L., Jørgensen, F., Hansen, O.C., Madsen, S.M., Stougaard, P. 2001. Intra- and extracellular β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression and comparative characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, 67:2276-2283.
- Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R., Kamikubo, T. 1984. Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans*. **Agricultural Biology and Chemistry**, 48: 3053-3061.

- Mullis, K.B., 1990. Recombinant DNA technology and molecular cloning. *Scientific American*, 262:36.
- Nakayama, T., Amachi, T. 2002. β -galactosidase, *Enzymology*, 1291-1305.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2005. Leninger Biyokimyanın İlkeleri. Palme Yayıncılık, Sayfa: 1152. Ankara.
- Nguyen, T-H., Splechtna, B., Yamabhai, M., Haltrich, D., Peterbauer, C. 2007. Cloning and expression of the β -galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, In Pres.
- Nielsen, J.E., Borchert, T.V. 2000. Protein engineering of α -amylase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543: 253-274.
- Nogales, J.M.R., Lopez, A.D. 2006. A novel approach to develop β -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. *International Dairy Journal*, 16:354-360.
- Ohtsu, N., Motoshima, H., Goto, K., Tsukasaki, F., Matsuzawa, H. 1998. Thermostable β -galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus* sp. A4: Enzyme purification and characterization and gene cloning and sequencing. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62 (8): 1539-1545.
- Olempska-Bier, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., Di Novi, M.J. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 45:144-158.
- Onishi, N., Tanaka, T. 1995. Purification and properties of a novel thermostable galactooligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11): 4026-4030.
- Özcan, N., 1996. Protoplast füzyonu ile *Bacillus stearothermophilus*'a ait sıcaklık dirençli α -amilaz geninin *Bacillus subtilis* kromozomuna aktarılması. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(4): 97-106.
- Özcan, B.D., Özcan, N. 2001. *Bacillus subtilis* RSKK243'e ait bifonksiyonel ksilanaz geninin *E. coli* ve *B. subtilis*'te klonlanması ve enzim karakterizasyonu. *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, 25: 881-885.
- Özcan, B.D. 2005. Sıcaklığa dirençli amilaz genlerinin klonlanması üzerine çalışmalar. Doktora tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.122.
- Öztürk S. 2007. Ülkemizden izole edilen *Bacillus licheniformis* BA17'den elde edilen alkalen proteaz enzimimin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.76.

Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Kumar, H. 2006. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81: 530-543.

Panesar, R., Panesar, P.S., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Bera, M.B. 2007. Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. *Food Chemistry*, 101: 786-790.

Phan Tr n, L.S.P., Szabo, L., F l p, L., Orosz, L., S k, T., Holczinger A., 1998. Isolation of β -galactosidase-encoding gene from *Bacillus licheniformis*: Purification and characterization of the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 37: 39-43.

Primer Biosoft Accelerating Research in Life Science. 2010. PCR primer design guidelines. Erişim: [http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html]. Erişim Tarihi: 05.07.2010

Primrose, S.B., Twyman, R.M. 2001. Principles of Gene Manipulation and Genomics Business and Technology Management. Sayfa: 319. University of York.

Pisani, F. M., Rella, R. Raia, C. A., Rozzi, C., Nucci, R., Gambacorta, A., Rosa, M., Rossi, M. 1990. Thermostable β -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* Purification and properties. *European Journal of Biochemistry*, 187(2):321–328.

Rahim, K.A.A., Lee, B.H. 1991. Production and characterization of β -galactosidase from psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL-88. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 13: 246–256.

Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson Shari, B.A., Brody-Karpin, D., Zaretsky, E.J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P. B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 5(10): Article R77.

Richmond, M.L., Gray, J.I., Stine, C.M. 1981. β galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *Journal of Dairy Science*, 64: 1759-1771.

Rigden, D.J., Jedrzejasz, M.J., Mello, L.V. 2003. Identification and analysis of catalytic TIM barrel domains in seven further glycoside hydrolase families. *FEBS Letters*, 544: 103-111.

Saito, T., Honda, H., Iijima, S., Kobayashi, T. 1989. Isolation of thermostable β -galactosidase gene from a thermophilic anaerobe and its expression in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11: 302-305.

Saito, T., Kato, K., Maeda S., Suzuki, T., Shiba, S., Lijima, S., Kobayashi T. 1992. Overproduction of thermostable β -galactosidase in *Escherichia coli*, its purification and molecular structure. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(1): 12–16.

Sani, R.K., Chakraborti, S., Sobti, R.C., Patnaik, P.R., Banerjee, U.C. 1999. Characterization and some reaction–engineering aspects of thermostable extracellular β -galactosidase from a new *Bacillus* species. *Folia Microbiologica*, 44 (4): 367-371.

Sarıgül, N., 2007. Ege Bölgesi'ndeki çeşitli sıcak su kaynaklarından *Thermus* genusu bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle identifikasyonu ve β -galaktosidaz aktivitesinin saptanması. Doktora tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir. 344.

Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1-17.

Schmidt, M., Stougaard, P. 2010. Identification, cloning and expression of a cold-active β -galactosidase from a novel Arctic bacterium, *Alkalilactibacillus ikkense*. *Environmental Technology*, 31: 1107-1114.

Schwab, C., Sørensen K.I., Gänzle M.G. 2010. Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42 β -galactosidases of lactic acid bacteria in *Lactococcus lactis*. *Systematic and Applied Microbiology*, 33: 300–307.

Shaikh, S.A., Khire, J.M., Khan, M.I. 1999. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472: 314-322.

Shipkowski, S., Brenchley, J. E. 2006. Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolase family 42 β -galactosidases are arabinogalactan type I oligomer hydrolases. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12): 7730–7738.

Somkuti, G.A., Steinberg, D.H. 1979. Beta-D-Galactoside galactohydrolase of *Streptococcus thermophilus*: induction, purification, and properties. *Journal of Applied Biochemistry*, 1: 357-368.

Sørensen, H.P., Porsgaard, T.K., Kahn, R.A., Stougaard, P., Mortensen, K.K., Johnsen, M.G. 2006. Secreted β -galactosidase from a *Flavobacterium* sp. Isolated from a low-temperature environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70: 548–557.

Soydan, M. 2006. Production of thermostable beta-galactosidase from thermophilic fungi for use in low lactose milk production. Doktora tezi. Orta Doğu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara. 89.

Soysal, M.İ. 2012. Rekombinant DNA teknolojisi. Erişim: [http://misoysoyal.nku.edu.tr/admin/userfiles/9_%20Bolum.pdf]. Erişim Tarihi: 03.01.2012

Söyler U.B. 2004. Cloning and characterization of industrially important alpha-galactosidase genes from the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. Yüksek lisans tezi. Orta Doğu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 110.

Sridhar, R.P.N. 2006. Genetic engineering / Recombinant DNA technology. www.microrao.com

Sürmeli, H. 2008. Üniversite öğrencilerinin biyoteknoloji ve genetik mühendisliği çalışmaları ile ilgili tutum, bilgi ve biyoetik görüşlerinin değerlendirilmesi. Doktora tezi. Marmara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. 363.

Tekinşen, C., 1997. Süt ürünleri teknolojisi, Selçuk Üniversitesi, *Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi*, Konya, 326.

Telefoncu, A. 1996. Biyoteknoloji, *Ege Üniversitesi Fen- Edb. Fak. Yayınları*, İzmir. No:1591-4.

Topal, S., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., Çeltik, Ö., 2000. Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: amilaz, proteaz, lipaz. *Turkish Journal of Biology*, 24:79-93

Torres, M.J., Lee, B.H. 1997. Cloning and expression of β -galactosidase from psychotrophic *Bacillus subtilis* KL88 into *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 17(2):123-128.

Tosun, H. 2011. Biyoteknolojinin tanımı, tarihçesi ve uygulama alanları. Erişim: [www.bayar.edu.tr/~gida/biyotek%20unite%201.doc]. Erişim Tarihi: 22.12.2011

Tunç, G. 2006. Poli (metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) hidrojelii kullanılarak β -galaktosidazın kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu. Yüksek lisans tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 78.

Turner, P., Mamo, G., Karlsson, E.N. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6:9.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) 1997. Program under the Toxic Substances Control Act (TSCA). *Bacillus subtilis* Final Risk Assessment. Erişim: [http://www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra009.htm]. Erişim Tarihi: 05.07.2010

Ustok-Isık, F., Tari, C., Harsa, S. 2010. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chemistry*, 119: 1114-1120.

Uyanık, A. 2008. Beta-galaktosidaz enziminin mikrobiyal hücrelerden izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.72.

Van Den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Microbiology*. 6: 213-218.

Vasiljevic, T., Jelen, P. 2001. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(2): 75-85.

Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM 13, an organism with great industrial potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7:204-211.

Vetere, A., Paoletti, S. 1998. Separation and characterization of three β -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1380: 223-231.

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

Vierstraete, A. 1999. Principle of the PCR. Erişim:[
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>]. Erişim Tarihi: 20.10.2011

Yavuz, E. 2003. Genotypic characterization of extracellular enzyme producing thermophilic bacteria in Balçova geothermal region. Yüksek lisans tezi. İzmir İleri teknoloji Enstitüsü, İzmir. 86.

Yılmaz, F. 2002. *Bacillus* Türleri. Bitirme tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi, Rize. 89.

Yılmaz, S., Devran Z. 2003. Polimeraz zincir reaksiyonu (pqr) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları. *Derim*, 20:31-42.

Yuan, T., Yang, P., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Zhang, W., Wu, N., Fan, Y., Yao, B. 2008. Heterologous expression of a gene encoding a thermostable β -galactosidase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnology Letters*, 30: 343-348.

Wanarska, M., Kur, J., Pladzyk, R., Turkiewicz, M. 2005. Thermostable *Pyrococcus woesei* β -D-galactosidase high level expression, purification and biochemical properties. *Acta Biochimica Polonica*, 52: 781–787.

Weaver, R.F. 2004. Molecular Biology. University of Kansas – Lawrence. U.S.A

Williams, R.A.D., Sharp, R. 1995. *Thermus* Species. Plenum Press. Sayfa: 233. ISBN 0306449250.

EKLER

EK-1. Alkalin Çözeltisi

0.1 N NaOH:

0.4 g NaOH tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözöldü. Otoklav ile steril edilerek saklandı.

%2 Na₂CO₃:

2 gr Na₂CO₃ tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözöldü. Otoklav ile steril edilerek saklandı.

%1 Na-K-Tartarat:

1 gr Na-K-Tartarat tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözöldü. Otoklav ile steril edilerek saklandı.

% 5 CuSO₄. 5H₂O:

1 gr CuSO₄. 5H₂O tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözöldü. Otoklav ile steril edilerek saklandı.

Alkalin çözeltisini hazırlamak için yukarıda belirtilen çözeltilerden yararlanılarak aşağıda belirtilen karışım hazırlandı.

A: 0.1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na₂CO₃ çözöldü.

B: %1 (w/v) Na-K-Tartarat içinde % 5 (w/v) CuSO₄. 5H₂O çözöldü.

C: 50 ml A belirteci ile 1 ml B belirteci karıştırılarak oluşturuldu. Koyu renkli şişede saklandı.

EKLER

EK-2. Kromozomal DNA İzolasyonu Çözeltileri

2.1. Lizozim:

10 mg/mL lizozim stok solüsyonu hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

2.2. Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol (25:24:1) :

Stok fenolden bir pipet yardımıyla dikkatlice 25 mL çekildi. Üzerine 24 mL kloroform ve 1 mL izoamil alkol ilave edilerek toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce iyice çalkalanarak homojenize edildi. İçinde bulunduğu şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu ve +4°C'de saklandı. (Kullanım süresi 1 ayı geçmemelidir)

2.3. Kloroform/İzoamil Alkol (24:1):

24 birim kloroform, 1 birim izoamil alkol ile karıştırılarak hazırlanır. İçinde bulunduğu şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalı ve +4°C'de saklanmalıdır.

2.4. TE Tamponu (pH 8.0):

10 mM Tris (pH 7.6)

1 mM EDTA (pH 8.0)

Hazırlanacak hacim için gerekli Tris ve EDTA hesaplanarak stoktan alındı ve saf su ile istenilen hacme tamamlandı. Otoklavlanarak kontamine etmeden kullanıldı.

2.5. STET Tamponu:

%8 Sukroz

%5 Triton X-100

50 mM EDTA (pH 8.0)

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Hazırlanacak hacim için gerekli miktarlar hesaplanarak saf su ile hacme tamamlandı.

Filtre edilerek otoklavlandı, kontamine etmeden kullanıldı. +4°C'de saklandı.

2.6. %10 SDS (Sodyum Dosesil Sülfat):

10 gr SDS tartılarak 100 mL saf su ile çözüldü. Steril edilerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2.7. 5 M NaCl:

Hazırlanmak istenen hacimde, 5 M olacak şekilde NaCl tartıldı ve manyetik karıştırıcı üzerinde bir miktar saf suda çözüldü. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2.8. RNaz R Hazırlanması (10 mg/mL):

Hazırlanmak istenen hacim için gerekli kadar miktar RNaz R dikkatli bir şekilde tartılarak RNaz çözeltilisinde (10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 15 mM NaCl) çözüldü. 100°C'de 15 dk tutularak DNaz aktivitesi inhibe edildi. Oda sıcaklığında soğuduktan sonra mikrosantrifüj tüplerine paylaştırıldı ve -20°C'de muhafaza edildi.

EK-3. Agaroz Jel Elektroforezi

3.1. 50X TAE Tamponu (pH 8.0):

4 Litre için

2 M Tris-baz (968.8 gr)

50 mM EDTA pH 8.0 (74.45 gr)

Asetik asit %96-100 (330 mL)

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre orantılanarak alındı. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülerek pH'sı 1 M NaOH ile 8.0'e ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

Kullanım konsantrasyonu olan 1X yapmak için 100 mL 50X TAE alınarak üzerine 4.9 L saf su ilave edildi.

3.2. Ethidium Bromid (EtBr) (10 mg/mL):

Hazırlanmak istenen hacim için gereken miktar Ethidium bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartıldı ve saf suda vortekslenerek iyice çözüldü. Işığa hassas olduğu için koyu renkli bir şişeye bırakıldı (veya bulunduğu kap alüminyum folyo ile sarılır) +4°C'de muhafaza edildi.

Not: Kuvvetli bir mutajen olduğu için tartım ve kullanım sırasında çok dikkatli olunmalı, muhakkak eldiven ve maske kullanılmalıdır. EtBr floresan bir boya olup DNA ve RNA'da bulunan bazlar arasına girerek bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerlerinin belirlenmesini sağlar.

3.3. DNA standardı:

Agaroz jel için kullanılacak DNA standardı New England BioLabs'tan temin edildi.

140 µL TE tamponu (pH 8.0)

40 µL BFB (Brom Fenol Blue) [%1 BFB, %50 gliserol, %50 su]

20 µL DNA standardı

Yukarıda belirtilen miktarlar hazırlanarak ependorf tüplere 20 mL olacak şekilde bölünerek 4°C'de muhafaza edildi (kullanılan DNA standardı 0.1-10 kb arasındadır).

EK-4. *E. coli* DH5 α Bakterisinin Kompetent Hale Getirilmesi

1. *E. coli* DH10B suşu 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampisilin içeren 5 mL hacimli LB sıvı besi yerine aktarılarak 37°C’de 1 gece inkübe edildi.
2. İnkübasyon süresi sonunda, üremiş olan kültürden 25 mL hacimli LB sıvı besi yerine aktarılarak 37°C’de $\text{OD}_{600} \cong 0.4$ oluncaya kadar (~2.5-3.0 saat) üretildi.
3. Bakteri buz üzerine alınarak 10 mL hacimli steril santrifüj tüplerine ayrı ayrı aktarıldı.
4. Bakteri kültürü 4 000 rpm’ de 10 dk santrifüjlendi.
5. Süpernatant kısım dökülerek pelet üzerine 2 mL soğuk 0.1 M MgCl_2 eklenerek yıkandı.
6. Bakteri kültürü 4 000 rpm’de 10 dk santrifüjlendi.
7. Süpernatant uzaklaştırılarak peleti 2 mL soğuk 0.1 M CaCl_2 ile çözüldü ve buz üzerinde 20 dk bekletildi.
8. Daha sonra 4 000 rpm’de 10 dk santrifüjlenerek süpernatant kısmı dökülerek peleti 1000 μL soğuk 0.1 M CaCl_2 ile tekrar çözüldü.
9. Elde edilen hücreler mikrosantrifüj tüplerine 200’er μL olacak şekilde paylaşılırak kullanıma hazır hale getirildi.

EK-5. S.O.C Medium (Süper Optimal Katabolit Represyon Besi Ortamı)

% 2 Tripton

% 0.5 Maya (Yeast) Özütü

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM glukoz hazırlandı 1 litre saf su içinde çözündü ve otoklavlandı.

EK-6. LB+ Amp+IPTG+X-gal Besi Yeri Hazırlanışı

Luria Broth (LB) besiyeri: Bacto Tripton 10 g/L, Bacto-Yeast Extract 5 g/L, NaCl 10 g/L (pH 7.0) + % 1.5 Agar eklenerek hazırlandı ve otoklavlandı.

X-gal (Bromo-kloro-indolil-galaktopiranosid) (20 mg/mL):

İstenen hacim için gerekli miktarda X-gal tartılarak N,N-Dimetilformamid içerisinde çözünür. Koyu renkli bir şişeye alınarak veya bulunduğu kap alüminyum folyo ile sarılarak -20°C'de muhafaza edildi. Hazırlanan LB besiyeri 48°C'ye kadar soğuduktan sonra son konsantrasyon 40 µg/mL olacak şekilde stoktan ilave edildi.

Ampisilin (50 µg/mL):

İstenen hacim için gereken miktar ampisilin tartılarak saf suda çözünür. Bakteriyel filtreden (0.2 µm) geçirilerek steril bir şekilde mikrosantrifüj tüplerine paylaştırıldı ve -20°C'de muhafaza edildi. Besiyerine son konsantrasyon 50 µg/mL olacak şekilde ilave edilir.

Hazırlanan katı LB besiyeri steril petrilere aktarılmadan önce 100 mg/mL stok olarak hazırlanan steril Ampisilinden 50 µg/mL, 10 mM IPTG (İzopropil β-D-1-thio-galaktopiranosid) stok çözeltisinden ~0.1-0.01 mM ve ~20 mg/ml X-gal (bromo-kloro-indolil-galaktopiranosid) eklenerek karıştırıldı ve petrilere aktarıldı.

EK-7. Saflaştırma Tamponları

0.1 M Sodyum-Fosfat Tamponu (pH 6.0):

0.1 M Na₂HPO₄

0.1 M NaH₂PO₄

İstenen hacim için gereken miktarlarda Na₂HPO₄ ve NaH₂PO₄ tartılarak önce her birinin ayrı çözeltileri hazırlandı. Daha sonra geniş bir kaba her iki çözeltiden dikkatlice aktarılarak birbiri ile pH 6.0'ya ayarlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

50 mM Sodyum-Fosfat Tamponu (pH 6.0):

50 mM Na₂HPO₄

50 mM NaH₂PO₄

İstenen hacim için gereken miktarlarda Na₂HPO₄ ve NaH₂PO₄ tartılarak önce her birinin ayrı çözeltileri hazırlandı. Daha sonra geniş bir kaba her iki çözeltiden dikkatlice aktarılarak birbiri ile pH 6.0'ya ayarlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0.1 M Sodyum-Fosfat Tamponu (pH 8.0):

0.1 M Na₂HPO₄

0.1 M NaH₂PO₄

İstenen hacim için gereken miktarlarda Na₂HPO₄ ve NaH₂PO₄ tartılarak önce her birinin ayrı çözeltileri hazırlandı. Daha sonra geniş bir kaba her iki çözeltiden dikkatlice aktarılarak birbiri ile pH 8.0'ya ayarlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0.1 M Tris-asetat Tamponu (pH 7.0):

0.1 M Tris

0.1 M Glasiyal asetik asit

İstenen hacim için gereken miktarlarda Tris ve Glasiyel asetik asit tartılarak önce her birinin ayrı çözeltileri hazırlandı. Daha sonra geniş bir kaba her iki çözeltiden dikkatlice aktarılarak birbiri ile pH 7.0'e ayarlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1 mM EDTA (pH 8.0):

1 mM EDTA tartılarak distile su içerisinde çözüldü. 0.1 M NaOH kullanılarak pH'sı 8.0'e ayarlandı. İstenilen hacme tamamlandı ve otoklav ile steril edilerek saklandı.

0.1 M NaCl:

0.5844 g NaCl tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözülür. Otoklav ile steril edilerek saklanır.

0.1 M NaOH:

0.4 g NaOH tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözündü. Otoklav ile steril edilerek saklandı.

Sodyum Borat $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$:

10 mM ve 100 mM olacak şekilde ayrı ayrı sodyum borat hazırlandı ve distile su ile çözündü. Otoklavlanarak, oda sıcaklığında saklandı.

EK-8. Elektrophorez Çözeltileri

% 30 akrilamid / % 0.8 bis akrilamid : 30 g akrilamid, 0.8 g bis akrilamid saf su ile 100 mL'ye tamamlandı, filtre edildi. Koyu renkli şişede 4°C'de saklandı.

1.5 M Tris-HCl pH 8.8: 54.45 g Tris 150 mL'ye tamamlandı, 1 N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı, hacim saf su ile 300 mL'ye tamamlandı, filtre edilerek 4°C'de saklandı.

0.5 M Tris-HCl pH 6.8: 6 g Tris 60 mL saf suda çözüldü, 1 N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı, hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı, filtre edilerek 4°C'de saklandı.

%10'luk APS (amonyum persülfat): 0.1 g APS saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. (Taze olarak hazırlanmalıdır.)

Elektrophorez tamponu: 3 g Tris, 14.4 g glisin, 0.1 g SDS, 1000 mL saf su ilave edilerek hazırlandı ve 4°C'de saklandı.

Yükleme Tamponu (iz boya): 7 mL 0.1 M Tris-HCl pH 6.8 , 3.6 ml gliserol, 1.2 mg BFB (brom fenol blue) ile 10 mL saf su ilave edildi. 1'er ml olacak şekilde mikrosantrifüj tüplere konarak -70°C'de saklandı.

% 10'luk SDS: 0.1 g SDS saf su ile 1 mL'ye tamamlandı.

β-D-galaktopiranosid (BNG): %0.025 6-Bromo-2-naftil-β-D-galaktopiranosid (BNG), %10 metanol içeren 0.1 M sodyum fosfat tamponunda pH 6.0'da çözüldü.

Diazo-blue B: %0.125'lik Diazo-blue B tartılarak saf su içerisinde çözüldü.

Coomassie Brilliant Blue Boyası (1 litre):

2 gr Coomassie brilliant blue (%0.2 w/v)

500 mL Metanol (%50 v/v)

100 mL Glasiyal asetik asit (%10 v/v)

400 mL saf su

Yukarıda verilen miktarlardaki kimyasallar bir erlen içerisinde alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde iyice homojenize edildi.

Destain Solüsyonu (Yıkama Solüsyonu) (1 litre)

50 mL Metanol (%5 v/v)

70 mL Glasiyal asetik asit (%7 v/v)

880 mL saf su

Yukarıda verilen miktarlardaki kimyasallar bir erlen içerisine alınarak manyetik karıştırcı üzerinde iyice homojenize edildi.

Fatma MATPAN BEKLER

Doğum Tarihi: 14/07/1981

Doğum Yeri: Diyarbakır/Türkiye

Medeni Hali: Evli

İletişim Bilgileri: Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 21280, Diyarbakır

Telefon: +90 412 2488550 (dahili: 3229)

e-mail: fatmatpan@hotmail.com



EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Program	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dicle Üniversitesi	Fen Bilimleri Enstitüsü	Biyoloji	Doktora	2007-2012
Türkiye	Dicle Üniversitesi	Fen Bilimleri Enstitüsü	Biyoloji	Yüksek Lisans	2005-2007
Türkiye	Dicle Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi	Biyoloji	Lisans	1999-2003

YÜKSEK LİSANS TEZ BAŞLIĞI VE TEZ DANIŞMANI:

“Diyadin (Ağrı) Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu ve Bazı Enzimleri Üzerinde Çalışmalar”

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal GÜVEN

DOKTORA TEZ BAŞLIĞI VE TEZ DANIŞMANI:

“Termofilik *Bacillus licheniformis* KG9’a Ait β -Galaktosidaz Geninin *Escherichia coli*'ye Aktarılması ve Enzimin Karakterizasyonu”

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal GÜVEN

AKADEMİK DENEYİM

Görevi	Kurum/Kuruluş	Yıl
Arş. Gör.	Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi	2005-devam ediyor

YURT DIŞI MESLEKİ EĞİTİM

Eğitim Konusu	Kurum/Kuruluş	Yıl
Gen Klonlama ve Ekspresyon	Copenhagen University, Faculty of Life Science, Department of Agriculture and Ecology, Section of Genetics and Microbiology Copenhagen/Denmark	16 Mayıs-16 Ağustos 2010

YURT İÇİ MESLEKİ EĞİTİM

Eğitim Konusu	Kurum/Kuruluş	Yıl
9. Enzim Saflaştırmada Temel Metodlar	TÜBİTAK MAM GMBAE Gebze/Türkiye	03-07 Temmuz-2006
Ekoloji Temelli GAP Doğa Eğitimi	TÜBİTAK Şanlıurfa/Türkiye	22 Mayıs-02 Haziran 2006