

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELTEM AŞAN

119 858

Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANLAMA MERKEZİ

GENETİK MÜHENDİSLİĞİ TEKNİKLERİ
İLE YEM KATKISI KANATLI
PROBİYOTİKLERİNİN OLUŞTURULMASI

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2002



ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENETİK MÜHENDİSLİĞİ TEKNİKLERİ
İLE YEM KATKISI KANATLI
PROBİYOTİKLERİNİN OLUŞTURULMASI

MELTEM AŞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZOOTEKİNİ ANABİLİM DALI

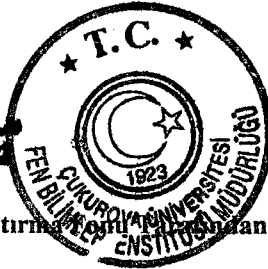
Bu tez 22/01/2002 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....*Numan Özcan*..... İmza.....*H. Rüştu Kutlu*..... İmza.....*M. Sait Ekinci*.....
Doç.Dr. Numan ÖZCAN Prof.Dr. H. Rüştu KUTLU Yrd.Doç.Dr. M. Sait EKİNCİ
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu tez Enstitümüz Zootekni Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No: 1949

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM ENSTİTÜSÜ
REKÖMANTASYON MERKEZİ



Melih Borçalı
Prof. Dr. Melih BORAL
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma ve Destekleme Birliği tarafından Desteklenmiştir.
Proje No:FBE.2000.YL.94

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GENETİK MÜHENDİSLİĞİ TEKNİKLERİ
İLE YEM KATKISI KANATLI
PROBİYOTİKLERİNİN OLUŞTURULMASI**

MELTEM AŞAN

Çukurova Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Numan ÖZCAN

Yıl: 2002, Sayfa: 77

Jüri: Doç. Dr. Numan ÖZCAN

Prof. Dr. Hasan Rüştü KUTLU

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Lactobacillus acidophilus A-161 bakterisine ait içerisinde karışık bağlı $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni de taşıyan bir entegrasyon vektörü (pLA1L) geliştirilmiştir: *Lactobacillus acidophilus* A-161 genomuna ait 3 kb büyüklüğünde rastgele bir EcoRI-EcoRI fragmenti bir *Escherichia coli* replikatif vektörü olan pBR325 plazmidinin Kloramfenikol direnç geni içerisine takılarak pLA1 entegratif plazmidi oluşturulmuştur. Buna ilave olarak, pL1Hc plazmidi üzerinde bulunan bir rumen bakterisi olan *Streptococcus bovis* JB1'e ait $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzimini kodlayan 1,8 kb büyüklüğündeki HindIII-BamHI DNA parçası pLA1 vektörünün Tetrasiklin direnç geni bölgesine transfer edilerek pLA1L vektörü oluşturulmuştur. Bu vektör, muhtemelen tam olarak optimize edilememiş elektrotransfomasyon koşulları nedeniyle *Lactobacillus acidophilus* A-161'in kromozomuna entegre edilememiştir.

Escherichia coli / *Streptococcus* mekik vektörü pTRW10 ve karışık bağlı $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geninden oluşan TL1R vektörü *Streptococcus thermophilus* FI8976 ve *Lactococcus lactis* IL1403 suşlarına elektrotransfomasyonla aktarılarak bu enzimin üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. SDS-Likenan-PAGE jellerin incelenmesi sonucu 26 kDa'luk enzim proteinine ait herhangi bir proteazla parçalanma belirtisi göstermediği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterileri, Probiyotik, Beta-glukanaz, Sub-klonlama

ABSTRACT

MSc THESIS

CONSTRUCTION OF FEED ADDITIVE PROBIOTICS FOR POULTRY BY USING GENETIC ENGINEERING TECHNIQUES

MELTEM AŞAN

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE
INSTITUTE OF NATUREL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Doç. Dr. NUMAN ÖZCAN

Year: 2002, Pages: 77

Jüri: Doç. Dr. Numan ÖZCAN

Prof. Dr. Hasan Rüştü KUTLU

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

An integration vector (pLA1L) of *Lactobacillus acidophilus* A-161 carrying mixed linkage $\beta(1,3-1,4)$ -glucanase were developed. 3 kbp EcoRI-EcoRI random fragment of *Lactobacillus acidophilus* A-161 genome were cloned in Chloramphenicol resistant gene of an *Escherichia coli* replicative vector of pBR325 to construct pLA1 integrative plasmid. In addition, 1,8 kbp HindIII-BamHI fragment of a rumen bacterium *Streptococcus bovis* JB1 encoding $\beta(1,3-1,4)$ -glucanase enzyme, located in pL1Hc vector, were transferred into Tetracycline resistance gene of pLA1 to create pLA1L. Probably, because of unoptimized electroporation conditions, it could not integrated into *Lactobacillus acidophilus* A-161 chromosome by electrotransformation.

TL1R construct, consisted of *Escherichia coli* / *Streptococcus* shuttle vector pTRW10 and mixed linkage $\beta(1,3-1,4)$ -glucanase gene, was succesfully electrotransformed and expressed into *Streptococcus thermophilus* FI8976 and in *Lactococcus lactis* IL1403 strains. SDS-Lichenan-PAGE jels showed no sing of protease degredation, in both strains of 26 kDa enzyme protein.

Key Words: Lactic Acid Bacteria, Probiotics, Beta-glucanase, Subcloning

TEŞEKKÜR

Öncelikle, her zaman olduğu gibi, tez çalışmam süresince de beni yönlendiren ve sorunların çözümlenmesinde her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Doç.Dr. Numan ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Ayrıca tez çalışmama katkılarından dolayı Prof.Dr. H. Rüştü KUTLU'ya ve bakterilerin temininde ve çalışmalarımda bana yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. M. Sait EKİNCİ'ye (K.S.Ü. Zootekni Bölümü) teşekkürlerimi arz ederim.

Labaratuvar çalışmalarımda ve tez yazımı sırasında yardımlarından ve desteklerinden dolayı arkadaşlarım Arş.Gör. Adem ALTINALAN ve Arş.Gör. B. Devrim ÖZCAN'a teşekkür ederim. Ayrıca labaratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Arş.Gör. A. İrfan GÜZEL'e (Ç.Ü. Tıbbi Biyoloji Bölümü), bölümümüz master öğrencisi A. Selen AKINALP ve lisans öğrencisi Lutfiye ÖZKAN'a da teşekkür ederim.

Her türlü yardımlarını benden esirgemeyen aileme de teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Probiyotikler ve Hayvan Beslenmesindeki Önemi.....	2
1.2. Kanatlı Rasyonlarında Enzim Kullanımı	4
1.3. Enzimlerin Genel Özellikleri	7
1.4. $\beta(1,3-1,4)$ -Glukanaz (Likenaz) Enzimi	7
1.4.1. Bakteriyel $\beta(1,3-1,4)$ -Glukanazların Moleküler Biyolojisi.....	9
1.4.2. $\beta(1,3-1,4)$ -Glukanazların Fiziksel Özellikleri	11
1.5. Tezin Amacı ve Kapsamı	12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Likenaz Enzimi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	14
2.2. Kanatlılarda Tahıl Ağırlıklı Rasyonlara β -Glukanaz Enzimi İlavesi İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	18
2.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactococcus lactis</i> Bakterilerine Ait Elektrotransformasyon İle İlgili Önceki Çalışmalar	21
2.4. Kanatlılarda Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanılması İle İlgili Önceki Çalışmalar	24
3. MATERYAL VE METOD.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları	27
3.1.2. Kimyasallar.....	28
3.1.3. Aletler	28
3.2. Metod	29

3.2.1. <i>E. coli</i> 'den pBR325 Plazmid DNA'sının İzolasyonu	29
3.2.2. pBR325 Plazmid DNA'nın Kesme Enzimiyle Kesilmesi	31
3.2.3. pBR325 Plazmid DNA'nın Kesme Enziminden Arındırılması.....	32
3.2.4. <i>L. acidophilus</i> 'dan Kromozomal DNA İzolasyonu	32
3.2.5. <i>L. acidophilus</i> 'a Ait Kromozomal DNA'nın Kesme Enzimiyle Kesilmesi.....	34
3.2.6. <i>L. acidophilus</i> 'a Ait İnsörtün Agaroz Jelden Saflaştırılması.....	34
3.2.7. pBR325 ve İnsört (<i>L. acidophilus</i> Kromozomal DNA Fragmentleri) DNA'ların Ligasyonu ve pLA1 Plazmidinin Oluşturulması	35
3.2.8. <i>E. coli</i> Hücrelerinin Transformasyon İçin Hazırlanması.....	36
3.2.9. <i>E. coli</i> 'de Transformasyon	36
3.2.10. Likenaz ($\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz) Geninin pLA1 Plazmidine Takılması ve pLA1L Plazmidinin Oluşturulması.....	37
3.2.11. Rekombinant pLA1L Plazmidinin <i>L. acidophilus</i> Bakterisine Elektrotansformasyon Tekniği İle Aktarılması	38
3.2.11.1. <i>L. acidophilus</i> Bakterisinde Elektrotansformasyon Protokolü 1	38
3.2.11.2. <i>L. acidophilus</i> Bakterisinde Elektrotansformasyon Protokolü 2	39
3.2.12. Rekombinant TL1R Plazmidinin <i>S. thermophilus</i> Bakterisine Elektrotansformasyon Tekniği İle Aktarılması	40
3.2.12.1. TL1R'nin <i>S. thermophilus</i> 'a Elektrotansformasyon Protokolü 1	40
3.2.12.2. TL1R'nin <i>S. thermophilus</i> 'a Elektrotansformasyon Protokolü 2	41
3.2.13. Rekombinant TL1R Plazmidinin <i>Lactococcus lactis</i> Bakterisine Elektrotansformasyon Tekniği İle Aktarılması.....	41
3.2.14. Elektrotansformasyon Uygulaması	42
3.2.15. Bakteriyel Likenaz Aktivitesinin Kalitatif Olarak Saptanması	43
3.2.16. SDS-PAGE VE SDS-Likenan-PAGE Jel Elektrofrezisi	43
3.2.16.1. Hücre İçi ve Dışı Proteinlerin TCA İle	

Çökertilmesi ve Proteinlerin Jel İçin Hazırlanması	43
3.2.16.2. SDS-PAGE Jelin Hazırlanması	44
3.2.16.3. Elektroforez Tankının Hazırlanması	45
3.2.16.4. Elektroforez Aletinin Çalıştırılması	45
3.2.16.5. Toplam Proteinlerin Jellerde Belirlenmesi	46
3.2.16.6. SDS-Likenan-Page Jelde Likenaz Aktivitesinin Belirlenmesi	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Bulgular	47
4.1.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> Kromozomal Entegrasyon Vektörünün (pLA1L) Oluşturulması	47
4.1.2. Rekombinant pLA1L Plazmidinin <i>Lactobacillus acidophilus</i> 'a Aktarılması	51
4.1.3. <i>Streptococcus thermophilus</i> Bakterisine Likenaz Geninin Aktarılması	51
4.1.4. <i>Lactococcus lactis</i> Bakterisine Likenaz Geninin Aktarılması	53
4.1.5. Rekombinant Bakterilerin SDS-Likenan-PAGE'de Likenaz Aktivitesi Tayini ve SDS-PAGE'de Toplam Proteinleri Bakımından İncelenmesi	54
4.2. Tartışma	57
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
5.1. Sonuçlar	60
5.2. Öneriler	60
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	75
EKLER	76
1.1. Besi Ortamları için Antibiyotiklerin Hazırlanması	76
a) Ampisilin (25 mg/ml)	76
b) Tetrasiklin (12.5 mg/ml)	76
c) Kloramfenikol (34 mg/ml)	76
d) Eritromisin (10 mg/ml)	77

1.2. RNaz (10 mg/ml).....	77
1.3. Lizozim Solüsyonu (5 mg/ml).....	77



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. pBR325 plazmid DNA'nın kesme enzimleriyle kesilmesi	31
Çizelge 3.2. <i>L. acidophilus</i> kromozomal DNA'sının kesme enzimleriyle tam kesimi	34
Çizelge 3.3. pBR325 ve insört (<i>L. acidophilus</i> kromozomal DNA fragmentleri) DNA'ların ligasyonu	35
Çizelge 3.4. pL1Hc plazmid DNA'sı için hazırlanan kesim reaksiyonu.....	37
Çizelge 3.5. pLA1 plazmidi ve likenaz geni için hazırlanan ligasyon reaksiyonu	38
Çizelge 3.6. Ayırıcı jel için farklı poliakrilamid düzeyleri	44
Çizelge 3.7. Toplayıcı jelin hazırlanması için kullanılan kimyasal solüsyonlar.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Arpa β -glukanının $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar ile enzimatik depolimerizasyonu.....	8
Şekil 3.1. pL1Hc plazmidinin yapısı	27
Şekil 3.2. TL1R plazmidinin yapısı.....	27
Şekil 3.3. pBR325 plazmidinin yapısı.....	28
Şekil 4.1. pLA1L plazmidinin oluşturulması	48
Şekil 4.2. Değişik enzimlerle kesilmiş pL1Hc, pBR325, pLA1 ve pLA1L entegrasyon plazmid vektörünün agaroz jelde görüntüsü	49
Şekil 4.3. <i>E. coli</i> /pL1Hc'nin likenanlı plaklarda Kongo-Red boyaması sonuçları ..	50
Şekil 4.4. <i>E. coli</i> içerisindeki pLA1L plazmidinin likenanlı besi yerinde likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	51
Şekil 4.5. <i>E. coli</i> / TL1R'nin likenanlı plaklarda Kongo-Red boyaması sonuçları...	52
Şekil 4.6. A: M17-likenan-Agar besi yerinde üreyen rekombinant (<i>S. thermophilus</i> FI8976/TL1R ve <i>L. lactis</i> IL1403/TL1R) ve orijinal suşların (<i>S. thermophilus</i> FI8976 ve <i>L. lactis</i> IL1403) Kongo-Red boyaması ile likenaz aktivitesinin belirlenmesi.....	53
B: M17-likenan-Agar-Eritromisin besi yerinde üreyen rekombinant suşların Kongo-Red boyaması ile likenaz aktivitesinin belirlenmesi.....	53
Şekil 4.7. Değişik bakterilerin SDS-Likenan-PAGE'de likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması	55
Şekil 4.8. Değişik bakterilere ait protein profillerinin SDS-PAGE'de karşılaştırılması	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Amp	Ampisilin
bç	baz çifti
Cam	Kloramfenicol
cDNA	complementary DNA (tamamlayıcı DNA)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNS	Dinitro Salicilik Acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
Erm	Eritromisin
g/l	gram/litre
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic
kb	Kilo baz
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Broth
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site (Çoklu Klonlama Bölgesi)
mg	Miligram (1/1000 g)
ml	Mililitre (1/1000 l)
mM	Milimolar (1/1000 M)
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
µF	Mikrofarat
µg	Mikrogram (1/1000 mg)
µl	Mikrolitre (1/1000 ml)
µm	Mikrometre (1/10 ⁶ m)
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
Ω	Ohm
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
RNA	Ribonucleic Acid
Rpm	Rotor per minute (dakikadaki devir sayısı)
SDS	Sodium Dedoxy Sulphate

TCA	Trichloroacetic acid
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetrasiklin
TNE	Tris-NaCl-EDTA
U	Unit (Ünite)
UV	Ultra Viole (mor ötesi)
V	Volt
v/v	volume/volume (Hacim/Hacim)
w/v	weight/volume (Ağırlık/Hacim)



1. GİRİŞ

Günümüz entansif yetiştirme koşullarında, kuluçkadan çıkan civcivler ebeveynlerinden ayrı tutulmakta, dolayısıyla ebeveynlerinin sindirim sistemlerini düzenleyen yararlı mikroorganizmaların civcivlere geçişi engellenmektedir. Bunun doğal sonucu olarak da *Salmonella* gibi patojenik mikroorganizmalar genç hayvanların sindirim sisteminde hızla kolonize olmaktadır. *Salmonella* ile enfekte hayvanlar çok ender hasta olmakta ve çoğunlukla performanslarında önemli bir düşme görülmemektedir. Buna karşılık *Salmonella* kanatlı ürünlerini kontamine etmekte ve insanda gıda zehirlenmesine neden olmaktadır. Yumurtadan yeni çıkmış civcivlere yetişkin kanatlılarının körbağırsak içeriğinin yedirilmesi ile *Salmonella* enfeksiyonlarında önemli azalmalar olduğu bildirilmiştir (Nurmi ve Rantala, 1973). Başta bazı *Escherichia coli*'ler olmak üzere diğer patojenik enfeksiyonlar ise kanatlılarda önemli performans kayıplarına neden olmaktadır (Nousiainen ve Setela, 1993).

Sindirim sisteminde patojenik mikroorganizmaların ve ishalin kontrolü amacıyla yemlere antibiyotik takviyesi oldukça sık uygulanan bir yöntemdir. Fakat antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı entero-patojenlerin sözkonusu bu antibiyotiklere direnç kazanarak bağırsakta dominant mikroflora durumuna gelmesine neden olabilmektedir (Rosen, 1995). Bunun yanısıra antibiyotik kullanımının doğal sonucu olarak kanatlı ürünlerinde sıkça rastlanan antibiyotik kalıntıları insan sağlığını da ciddi şekilde tehdit edebilmektedir (Prescott ve ark., 1999). Antibiyotiklerin bu sakıncalarından dolayı probiyotik kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır.

Öte yandan sindirim sisteminin doğal bir mikroflorası olan laktik asit bakterileri; bağışıklık sistemini uyarıcı etkilerinin yanısıra bağırsakta hızla kolonize olabilmeleri, mide ve safra asitlerine olan dirençleri ve laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriosin üretme yeteneklerinden dolayı kanatlı probiyotik karışımlarında önemli bir yere sahiptirler (Stavrik ve Kornegay, 1995; Nousiainen ve Setela, 1993).

1.1. Probiyotikler ve Hayvan Beslenmesindeki Önemi

Hayvan yetiştiriciliğinde hayvanın sağlıklı ve iyi bir performansa sahip olmasının büyük önemi vardır. Hayvanın büyüme hızı, yemden yararlanması ve sağlığı sindirim kanalının fonksiyonuyla yakından ilgilidir. Yıllardan beri büyütme faktörü olarak hayvan yemlerine katılmakta olan antibiyotikler ve büyüme uyarıcı maddeler bağırsaklarda patojen bakterilerle birlikte yararlı mikroorganizmaların da çoğalmasını engellemektedirler. Antibiyotik ve büyüme uyarıcı maddelere karşı patojen bakterilerin direnç kazanmaları sonucunda bu maddelerin etkilerinde zamanla azalma oluşmakta ve bağırsak florasının tahrip edilmesi nedeniyle iyileşme de gecikmektedir. Bunun yanı sıra insanlar tarafında tüketilmekte olan bu hayvansal ürünlerdeki kalıntıların halk sağlığını tehdit ettiği gerekçesi ile büyütme faktörü olarak kullanılan antibiyotik ve büyüme uyarıcı maddelerin kullanımında sakıncalar oluşmaktadır. Bu nedenle Avrupa Birliği, kümes hayvanlarının karma yemlerinde büyümeyi uyarıcı olarak kullanılan avoparcin (avoparcin-vancomycin dirençli *Enterococcus faecium* oluşumunda artışa neden olduğu gerekçesiyle), tylosin fosfat, virginiamycin, zinc bacitracin, spiramycin gibi antibiyotiklerin kullanımını yasaklamıştır (Anonymous, 1999a). Ülkemizde de Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından 30.06.1996 tarihinden itibaren zinc bacitracin, virginiamycin, tylosin fosfat, avoparcin, spiramycin, carbodox ve clanquodox büyütme faktörleri listesinden çıkarılmıştır (Anonymous, 1999b). Bu nedenlerden dolayı antibiyotiklerin yerine kullanılacak yem katkı maddeleri üzerinde pek çok çalışma yürütülmekte olup organik asitler, prebiyotikler, probiyotikler ve çeşitli bitki ekstraktları gibi alternatif yem katkı maddeleri üzerinde durulmaktadır.

Probiyotikler, hayvanların sindirim kanalındaki mikrofloranın ekolojik dengesini düzene sokmak, mikroflora içerisindeki potansiyel patojen mikroorganizmaların zararlı hale gelmesini önlemek ve hayvanların yemden yararlanmalarını arttırmak gibi amaçlarla içme suyu ya da yem içerisine karıştırılarak verilen bir grup canlı bakteri, maya ve mantar kültürleri içeren biyolojik ürünlerdir (Fuller, 1989; Hooper, 1989; Aytuğ, 1989). Probiyotikler, birçok ülkede büyütme faktörü olarak sığır, koyun, keçi, domuz, kanatlı, at ve küçük ev hayvanlarının rasyon

veya diyetlerinde 1970'li yıllardan beri kullanılmaktadır (Nemeskery, 1983; Mc Cormick, 1984; Fuller, 1989; Vanbelle ve ark., 1990).

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar genellikle *Lactobacillus* türleri (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*), *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* (*S. salivarius* subsp. *thermophilus*), *S. faecium*, *S. diacetilactis* ile *Bacillus subtilis*, *B. toyli* ve *B. licheniformis* gibi Basiller ve *Aspergillus oryzae*, *Bifidus bifidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis candida* gibi mantar ve maya kültürleridir (Jonsson, 1985; Wu, 1987; Aytuğ, 1989; Fuller, 1989, 1990).

İyi bir probiyotikte bulunması gereken özellikler aşağıdaki gibi özetlenebilir (Nousiainen ve Setälä, 1993):

1. Patojen olmamalıdır.
2. Mide ve duodenum'dan geçişi sırasında buradaki yüksek asitliğe toleranslı olmalıdır: Düşük pH; bir çok mikroorganizma için zararlıdır. İdeal probiyotikler bu asitlikten etkilenmemeli, canlılıklarını koruyabilmelidirler.
3. İnce bağırsağın üst kısmından geçişi sırasında safra tuzlarına karşı dirençli olmalıdır: Karaciğer tarafından üretilen safra yüzeysel gerilimi düşürerek bağırsaktaki yağları emülsiyon hale getirir ve bu etkisini bakteri hücre duvarı yapısında bulunan lipid ve yağ asitleri üzerinde de gösterir (Tuncer, 2000).
4. Çeşitli organik asitleri üreterek bağırsağın pH'sını düşürmelidir: Probiyotikler ürettikleri organik asitler ile ortamın pH'sını düşürerek nötr ya da bazik ortamlarda yaşayabilen ve genelde hayvanlar için zararlı etkisi olan bakterilerin üremelerini durdurduğu bildirilmektedir (Nemeskery, 1983; Jonsson, 1985; Lyons, 1987; Hughes, 1988; Fuller, 1989; Hooper, 1989; Hooper, 1990; Vanbelle ve ark., 1990).
5. Bağırsak epitel hücrelerinde kısa sürede kolonize olup çoğalmalıdır: Probiyotikler bağırsak epitel hücrelerine bağlanarak patojen bakterilerin bağlanmasını ve içeri girmesini önlemektedirler (Tuncer, 2000).
6. Antimikrobiyal maddeler üreterek patojen mikroorganizmaların sindirim sisteminde barınmalarını önlemelidir (Competitive Exclusion): Laktik asit

bakterilerinin çoğu hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriosin gibi antimikrobiyal maddeler üretmektedirler (Daeschel, 1989).

7. Peletleme sırasında yüksek sıcaklığa toleranslı olup canlılığını sürdürmelidir.
8. Yemlerde kullanılan antimikrobiyal maddelere dirençli olmalıdır: Bu durum antibiyotiklerin yemlerde kullanımının yasaklanması nedeniyle şu anda önemsizdir.
9. Depolanma süresince canlılığını ve stabilitesini korumalıdır. Sporlu bakteriler bu bakımdan avantajlı sayılırlar.
10. Seçilen probiyotik konukçuya spesifik olmalıdır: Bir türün bağırsaklarından izole edilen probiyotikler diğer türün bağırsaklarında kolonize olamamaktadır.
11. Antikor üretimini teşvik ederek bağışıklık sistemini güçlendirmelidir (Tuncer, 2000).

Probiyotikler, antibiyotiklerin bazı olumsuz etkilerini; hastalıklara karşı direnç sağlayarak ve bağırsak florasının normale dönmesini hızlandırarak hayvanın kendisini toparlamasına ve yemden yararlanmanın artırılarak sağlıklı gelişmenin sağlanmasına yardımcı olarak önlerler.

Laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus acidophilus* bakterisi bağışıklık sistemini uyarır ve güçlendirir (Pal, 1999), karsinogen madde üretiminde rol alan mikrobiyal enzim aktivitesini baskı altına alır (Goldin ve Gorbach, 1984), çiftlik hayvanlarının gelişimini hızlandırır (Tortuero, 1973b), civcivleri *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı korur (Watkins ve Miller, 1983). *Streptococcus thermophilus* bakterisi ise yem dönüşüm oranının ve canlı ağırlığın artışına neden olur (Meluzzi ve ark., 1986) ve ürettikleri antimikrobiyal maddelerle canlıyı patojen Gram(-) bakterilere karşı korur (Herrick, 1972). *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *S. faecalis* bakterileri beraber verilince *Salmonella*'ya karşı civcivlerin direncini artırır (Nisbet ve ark., 1993; Corrier ve ark., 1994).

1.2. Kanatlı Rasyonlarında Enzim Kullanımı

Hayvansal üretimde amaç birim masraf başına daha fazla ürün üretmektir. Kanatlı eti ve yumurtası üretiminde tüm masrafların yaklaşık %65-70 gibi büyük

kısmını yem giderleri oluşturmaktadır. Yem maliyetinin önemli bir kısmını oluşturan ve kanatlı karma yemlerinde %60-70 düzeylerinde yer alan yem hammaddeleri mısır, buğday, arpa, çavdar, yulaf gibi tahıllardır. Ancak mısır dışındaki tahıllar içerdikleri sindirilmeyen besin maddeleri nedeniyle kanatlı karma yemlerinde sınırlı olarak kullanılmaktadır (Polat ve ark., 1999).

Kanatlı rasyonlarında (özellikle broyler) çok miktarda kullanılan mısırın istenildiği zaman ve şartlarda temin edilememesi, ancak gereksinimin bir kısmının ithalat yolu ile karşılanması, yağ, nişasta vb. sanayi kollarının hammaddesini oluşturması, üretimi mısıra göre daha fazla olan buğday ve arpanın mısır yerine kullanılabilmesini ortaya koymuştur. Ayrıca mısır, hasattan önce veya sonra yağmurlara maruz kalmasından dolayı fungus üremesinin doğal bir sonucu olarak mikotoksinleri barındırdığı bilinmektedir. Meydana gelen mikotoksinlerle bulaşık mısırın rasyonda kullanılması ise hayvanlarda zehirlenmelere yol açabilmektedir (Demirel ve Gürbüz, 1999). Bununla birlikte Türkiye'nin coğrafi yapısının arpa ve buğday tarımına daha elverişli olması sebebiyle zamana bağlı olarak arpa ve buğday fiyatlarının mısıra göre daha ucuz olması ve istenildiği miktarda bulunabilmesi broyler rasyonlarında fazla miktarda arpa ve buğday kullanım imkanının araştırılmasını gerektirmektedir. Ancak kanatlı yemlerinde fazla miktarda arpa ve buğday kullanıldığında bağırsakta viskozite artmakta ve yapışkan dışkı (sticky dropping) denilen fizyolojik bir rahatsızlık oluşmaktadır (Bedford, 1991). Bu olumsuzluklara sebep olan ve özellikle arpada %2-8 oranında bulunan $\beta(1,3-1,4)$ -glukan (Hesselman ve ark., 1981; Hesselman ve Thomke, 1982) ve buğdayda bulunan arabinoksilanlardır. Tek mideli olan kanatlı hayvanlar selüloz, arabinoksilanlar, beta glukanlar, pektinler gibi nişasta tabiatında olmayan polisakkaritleri enzimatik olarak sindiremezler ve bu maddelerce zengin yemlerden bu sebeple yeterli düzeyde yararlanamazlar. Bunun sonucunda canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanmanın düşmesi nedenleriyle etlik piliç rasyonlarında arpa ve buğday sınırlı düzeyde kullanılmaktadır (Bedford, 1991).

Broyler beslenmesinde yemden yararlanma oranını iyileştirmek için rasyonlara çeşitli katkı maddeleri ilave edilmektedir. Bu katkı maddelerinden antibiyotik kullanımı uyandırdığı antipati nedeniyle gerek üretici gerekse tüketici

bazında kullanımını oldukça sınırlandırılmak zorunda kalınmıştır. Bu sınırlandırmalar yemden yararlanma oranının artırılması ve yem hammaddelerinin maksimum düzeyde değerlendirilmesi için alternatif katkı maddeleri elde etmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu alternatif katkı maddeleri ise bakteri ve mayalardan elde edilen enzimlerdir. Hayvanları kendi sindirim enzimlerini destekleyip yemlerden daha etkin yararlanmanın sağlanması için karma yemlere tek enzim preparatları yanında birçok enzimi birarada bulunduran enzim karışımları da katılmaktadır (Demirel ve Gürbüz, 1999).

Karma yeme enzim ilavesi hayvanların sindirim sisteminde faaliyetin normale göre daha erken başlamasını veya tamamen yeni sindirim yeteneği kazanmasını sağlar. Hiçbir kanatlı hayvan yemlerde yaygın olarak kullanılan bitkisel kökenli hammaddelerdeki hücre çeperini parçalayacak enzimlere sahip değildir (Anonymous, 1987). Selülitik enzimlerin bu tür rasyonlara karıştırılıp belli bir süre inkübasyona bırakılmasından sonra bu yemlerin hayvana yedirilmesi halinde, endosperm hücre duvarının yumuşaması ve buradaki polisakkaritlerin ince bağırsakta kısmi olarak parçalanıp yemde mevcut nişasta ve proteinlerin daha iyi sindirilmelerine ve etkili şekilde ete çevrilmesine sebep olacaktır (Hesselman ve Aman, 1986). Ayrıca karışık bağı β-glukanaz enziminin kullanımı da kanatlılarda yapışkan dışkı oluşumunu ortadan kaldırarak bu tür yemlerin kanatlı rasyonlarında daha güvenli bir şekilde kullanılmasına imkan vermektedir (Havenstein ve ark., 1992).

Arpa içeren rasyonlara β-glukanaz eklenmesi etlik piliçlerde yem çevrim etkinliğini ve canlı ağırlık artışını geliştirmekte, yumurtacılar da ise altlık nemliliğini azaltmaktadır. Arpa içeren rasyonlara enzim eklenmesiyle rasyonun sindirilebilirliği buğday kontrol rasyonuna eşit veya daha fazla olmaktadır. β-glukanaz ilavesiyle tanenin hücre duvarı daha hızlı eridiğinden nişasta ve protein sindirimi ince bağırsağın daha ön kısımlarında meydana gelmektedir (Bedford, 1991). Kanatlı rasyonlarında buğday %40'a kadar kullanılırken, enzim ilavesi ile bu oran %70'e kadar çıkabilir. Enzim ilavesiyle arpanın yemlerde kullanımını %60'a kadar çıkabilmektedir (Demirel ve Gürbüz, 1999). Arpa ve buğdayın enzim ilavesiyle kanatlı rasyonlarında fazla miktarda kullanılması mısır ithalatını azaltacak, buğday

ve arpadan daha fazla protein sağlandığı için soyadan tasarruf edilecek, ayrıca mısırın iyi kurutulmaması nedeniyle ortaya çıkan küflenmeden kaynaklanan problemlerin önüne geçilebilecektir (Demirel ve Gürbüz, 1999).

1.3. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler yaşayan hücreler tarafından üretilen ve belirli kimyasal reaksiyonları katalize eden organik kimyasal bileşiklerdir. Enzimler organik maddelerde olgunlaşma, fermentasyon ve sindirim gibi değişimleri gerçekleştirirler. Enzimler protein yapısında olup canlı organizmadan ayrıldıktan sonra da aktivitelerini korurlar. Enzimler polipeptid zincirinin belirli bir kısmında özel bir katlanma ile oluşur ve aktif merkez vasıtasıyla katalitik etki gösterirler. Denatürasyon sonucu konformasyon bozulduğu için katalitik etkinlik kaybolur. Enzimlerin katalitik etkilerinin üzerinde ortamın pH'sı, sıcaklık, enzim ve substrat yoğunluğu ile bazı fiziksel etmenler etkilidir. Enzimlerin çoğu 30-50°C arasında faaliyet gösterirler (Demirel ve Gürbüz, 1999).

Peletleme sırasında genellikle 70-75°C'lik ısınma sağlanmakla birlikte bazen bu sıcaklık 85-90°C'ye kadar çıkabilmektedir. Yemlerde kullanılan enzimlerin bu sıcaklıklara dayanabilecek bir teknolojiyle üretilmesi gerekmektedir. Genellikle enzimler 60°C'yi geçen sıcaklıklarda etkinliğini kaybederler.

Bu nedenle pelet yemlerde kullanılacak enzimlerin termostabil (sıcaklığa dirençli) olması, optimum çalışma sıcaklıklarının ise kanatlı sindirim sistemiyle uyumlu olması, buna ilave olarak yemlere katılacak enzimlerin mide asitliğinden etkilenmemesi ve bağırsak pH'sında optimum aktivite göstermesi gerekir. Ayrıca, kullanılan enzimlerin mide bağırsak ortamında enzimatik parçalanmayla ve/veya yem ya da safra kaynaklı kimyasal maddeler ile inaktif hale geçmemesi gerekir (Cowan, 1996).

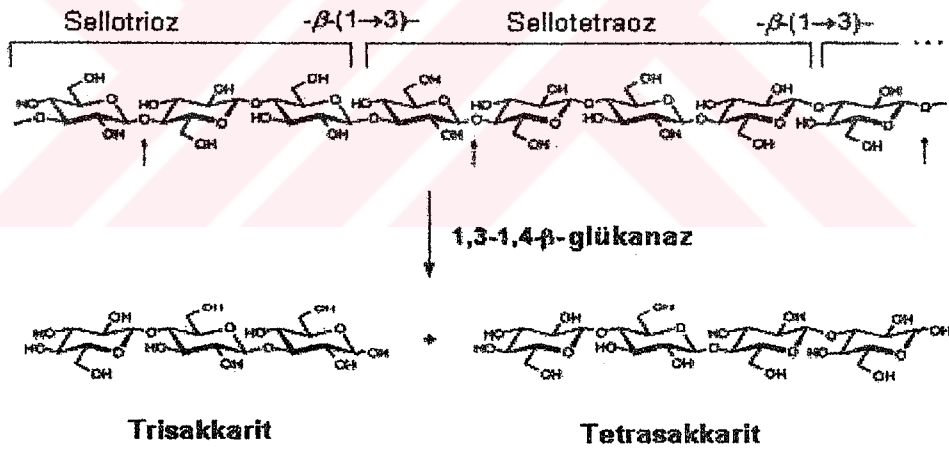
1.4. $\beta(1,3-1,4)$ -Glukanaz (Likenaz) Enzimi

$\beta(1,3-1,4)$ -glukanlar, *Poaceae* familyası bitkilerinin hücre duvarı polisakkarit bileşikleri olup *Graminae* familyasının özellikle ticari öneme sahip arpa, sorgum,

pirinç, buğday ve çavdar gibi tahılların endosperm hücre duvarında bulunur (Stone ve ark., 1992).

β -glukanlar genel olarak β -1,4 ana zincirine β -1,3 yan zincirlerinin bağlanmasıyla oluşmuştur. Arpa ve yulafın yapısında bulunan β -glukanın %85'inde 2 veya 3 adet β -1,4 bağı ile bağlı ana zinciri 1 adet β -1,3 yan zinciri takip ederken, geriye kalan %15'inde çok sayıda β -1,4 bağına sahip ana zinciri 1 adet β -1,3 bağı izlemektedir (Classen ve Bedford, 1991).

Endo- β (1,3-1,4)-glukanaz, nişastalı tohumların endosperm duvarında bulunan karışık bağı β (1,3-1,4)-glukanları hidrolize eden enzimdir (Lloberas ve ark., 1991). Arpa β -glukanının β (1,3-1,4)-glukanaz ile hidrolizi sonucunda bir trisakkarit (3-O- β -cellobiosyl-D-glucopyranose) ve bir tetrasakkarit (3-O- β -cellotriosyl-D-glucopyranose) oluşmaktadır (Planas, 2000). (Şekil 1.1.)



Şekil 1.1. Arpa β -glukanının β (1,3-1,4)-glukanazlar ile enzimatik depolimerizasyonu (Planas, 2000)

Bitkilerin yanı sıra bakteri, fungus gibi birçok mikroorganizma da önemli düzeyde β (1,3-1,4)-glukanaz kaynağıdır. Ancak bitki ve mikrobiyal kaynaklı enzimler birbirlerinden aminoasit sıraları ve üç boyutlu yapıları gibi birtakım özellikler bakımından farklılıklar gösterirler. Bitki enzimleri glycosyl hidrolaz 17

familyasına ait iken, mikrobiyal enzimler glycosyl hidrolaz 16 familyasına aittir (Henrissat, 1991a, Henrissat ve Bairoch, 1993, 1996).

Bakteriyel $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar bira sanayinde de önemli bir yere sahiptir. Malt yapımı sırasında endogen (içsel) $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar sıcaklıkla inaktif olurlar ve fazla miktardaki yüksek moleküler ağırlığa sahip β -glukanlar bira yapımının son aşamasında jelatinimsi görünümün yanısıra düşük filtrasyon oranı ve ekstrakt veriminin düşmesi gibi önemli sorunlara neden olabilmektedirler. Bu nedenle sıcaklığa karşı dirençli bakteriyel $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar mashing (bira yapımında ezilmiş arpa ile su karışımı aşaması) sırasında viskoziteyi azaltmak için oldukça sık kullanılmaktadır (Stone ve ark., 1992; Godfrey, 1983). Hayvan yemlerine özellikle broyler ve domuz yemlerine bakteriyel β -glukanazları içeren enzimatik karışımların eklenmesiyle arpaya dayalı yemlerde sindirilebilirlik artmakta ve sağlıkla ilgili problemler (yapışkan dışkı oluşumu) azalmaktadır (Stone ve ark., 1992; White ve ark., 1983).

1.4.1. Bakteriyel $\beta(1,3-1,4)$ -Glukanazların Moleküler Biyolojisi

Birçok *Bacillus* türü likenaz enzimi üretmekte olup bunlardan *Bacillus subtilis* (Cantwell ve McConnell, 1983; Murphy ve ark., 1984; Hinchliffe, 1984), *Bacillus amyloliquefaciens* (Hofemeister ve ark., 1986), *Bacillus macerans* (Borriss ve ark., 1988, 1990), *Bacillus circulans* (Bueno ve ark., 1990a, 1990b), *Bacillus polymyxa* (Gosalbes ve ark., 1991), *Bacillus licheniformis* (Lloberas ve ark., 1991), *Bacillus brevis* (Louw ve ark., 1993) ve alkalifilik *Bacillus sp.* N137 (Taberner ve ark., 1994) bakterilerine ait likenaz enzim genleri klonlanmış ve karakterize edilmiştir.

$\beta(1,3-1,4)$ -glukanazları kodlayan genler *Bacillus* olmayan türlerden de izole edilmiştir. Bunların ürettiği enzimlerin katalitik bölgeleri ile *Bacillus* kökenli enzimlerin katalitik bölgeleri arasında yüksek homoloji bulunurken, değişik fonksiyonlara sebep olan ek bölgelere de sahiptirler. *Ruminococcus flavefaciens*'deki *xynD* genini taşıyan DNA fragmenti ksilanaz (N ucunda) ve $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (C ucunda) alt ünitelerinden oluşan bifonksiyonel enzimi kodlar (Flint ve ark., 1989,

1993). *Clostridium thermocellum licB* geni *Bacillus* enzimleriyle homoloji gösteren katalitik bölgeye sahip bir likenaz enzimi üretir (Schimming ve ark., 1991; Zverlov ve ark., 1994). *Fibrobacter (Bacterioides) succinogenes* likenaz gen ürününün katalitik bölgesi *Bacillus* ve *Clostridium thermocellum* likenazları ile benzer amino asit sırasına sahiptir (Irvin ve Teather, 1988; Erfle ve ark., 1988; Teather ve Erfle, 1990).

Ayrıca *Streptococcus bovis* bakterisinden, *Bacillus* enzimleriyle yüksek derecede benzerlik gösteren $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni klonlanmıştır (Ekinci ve ark., 1997a). Bu çalışmada kullanılan *S. bovis* β -glukanaz enzimi, amino asit analizi sonucunda bakteriyel endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanların oluşturduğu glukosid hidrolaz 16 familyasına ait olup familya 17'e ait bitki glukanazlarından farklıdır (Henrissat, 1991b; Henrissat ve Bairoch, 1993). Familya 16 $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlarını kodlayan genlerin rumen bakterisi *Fibrobacter succinogenes* (Teather ve Erfle, 1990) ve *Ruminococcus flavefaciens* (Flint ve ark., 1993)'den klonlandığı bildirilmiştir.

β -glukan endohidrolazların üç tipi; endo-1,4- β -glukanaz veya karboksimetilselülaz (EC.3.2.1.4), endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz veya likenaz (EC.3.2.1.73) ve β -glukan endohidrolaz veya endo-1,3(4)- β -glukanaz (EC.3.2.1.6)'dir. Bunların hepsi $\beta(1,3-1,4)$ -glukanlarını indirgeyebilir ancak substrat spesifiteleri arasında farklılıklar bulunur. *S. bovis*'in endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazının substrat spesifitesi ise likenan ya da arpa β -glukanı gibi karışık bağlı β -glukanları ile sınırlıdır (Ekinci, 1997b).

Son zamanlarda funguslarda da $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzimi belirlenmiştir. Likenaz'ı kodlayan ilk fungal gen anaerobik fungus *Orpinomyces*'den 1997 yılında klonlanmıştır (Chen ve ark., 1997). Tahıl β -glukanları üzerine etkili üç enzim fungal bitki patojeni *Cochliobolus carbonum*'da belirlenmiştir (Gorlach ve ark., 1998). Bunlarda ikisi aynı gen (*MLG1*) tarafından üretilmekte olup karışık bağlı β -glukanların yanısıra 1,3- β -glukanlar üzerine de etkilidir. Üçüncü enzim muhtemelen likenaz olup bu genin klonlanması üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bakteriyel $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar *E. coli*, *Bacillus* suşları, *Saccharomyces cerevisiae* ve transgenik arpa ve tütün bitkileri gibi çeşitli canlılarda eksprese

edilmiştir (Planas, 2000). Bunlardan *S. bovis* $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni *E. coli* ve tekrar *S. bovis*'de klonlanarak eksprese edilmiştir (Ekinci, 1997b). Başlıca enzim aktivitesi *E. coli*'de hücre içindeyken gram pozitif bakterilerde hücre dışındadır. Bu gen aynı zamanda *Enterococcus faecalis*'e de aktarılmıştır (Ekinci, 1997b).

Transgenik bitkiler termostabil bakteriyel likenazların ekspresyonunda konakçı olarak kullanılmıştır. *B. amyloliquefaciens* ve *B. macerans*'dan yeşil maltın fırında kurutulması esnasında yüksek sıcaklıktan zarar görmemesi amacıyla bir hibrid $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzim geni de arpa bitkilerinde klonlanarak ve eksprese edilmiştir (Jensen ve ark., 1996; Hovarth ve ark., 2000).

1.4.2. $\beta(1,3-1,4)$ -Glukanazların Fiziksel Özellikleri

Bacillus likenazları 25-30 kDa moleküler ağırlığında olup izoelektrik noktası pl 7.5-9.1, pH optimumu ise *B. brevis* (pH 9.0) ve alkalophilik *Bacillus* sp. N137 (%80'den fazla aktivitesini pH 7.0-12.0) enzimleri dışında nötr (pH 6.0-7.5) seviyesindedir.

Enzimlerin sıcaklık optimumu bakteriler arasında farklılık göstermekte olup *B. polymyxa* likenazında 45°C (Borris ve Zemek, 1981), *B. subtilis* (Olsen ve ark., 1991), *B. amyloliquefaciens* (Olsen ve ark., 1991), *B. licheniformis* (Lloberas ve ark., 1988) kökenlilerde 55°C, *B. macerans* (Olsen ve ark., 1991), *B. brevis* (Louw ve Watson, 1993), *Bacillus* sp. N137 (Tabernero ve ark., 1994) kökenlilerde 65°C'dir. Spesifik aktivite 1200-4500 $\mu\text{mol/dak/mg}$ (arpa beta glukanının hidrolizindeki indirgenen şeker miktarı) ve K_m değerleri arpa β -glukanı için 1,2-1,5 mg/ml ve likenan için 0,8-2 mg/ml'dir.

Bacillus kökenli olmayan $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazlar farklı fonksiyonlar gösteren ek bölgelerin bulunması nedeniyle, *Bacillus* enzimlerinden daha büyük olmasına rağmen benzer biyokimyasal özellikler gösterirler: *Ruminococcus flavefaciens* (90 kDa) (Flint ve ark., 1993), *Clostridium thermocellum* (38 kDa, pH optimumu 6.6-10.0, sıcaklık optimumu 80°C) (Schimming ve ark., 1991), *Fibrobacter succinogenes* (37 kDa, pH optimumu 6.0, sıcaklık opt. 50°C) (Erfle ve ark., 1988). Fungal likenazlar da *Orpinomyces* (26 kDa, pH optimumu 6.0, sıcaklık optimumu

45°C) (Chen ve ark., 1997) ve *Talaromyces emersonii* (40.7 kDa, pH optimumu 4.8, sıcaklık optimumu 80°C) (Planas, 2000) karakterize edilmiştir.

S. bovis likenaz gen ürünü yaklaşık 26 kDa'dur. Enzim aktivitesi 50°C'ye kadar stabil iken bu sıcaklığın üzerine çıktıkça enzim aktivitesinde önemli derecede azalma meydana gelmektedir. Enzimin pH optimumu ise 6.5'dir. *S. bovis* β -glukanazı *Clostridium thermocellum*, *Bacillus subtilis* ve *Ruminococcus flavefaciens* β -glukanazları ile sırasıyla %53.3, %55 ve %50.7 oranında benzerlik göstermektedir (Ekinci, 1997b).

1.5. Tezin Amacı ve Kapsamı

Bu tez çalışmasının amacı ve kapsamı aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Probiyotik olarak kullanılan *L. acidophilus* A-161 suşunun kromozomuna entegre olacak karışık bağlı $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (likenaz) enzim genini içeren bir rekombinant vektör oluşturmak.
2. Oluşturulan bu entegrasyon vektörünü *L. acidophilus* A-161 suşuna transforme etmek.
3. Likenaz enzim genini taşıyan TL1R plazmidini termofilik bir bakteri olan *S. thermophilus* FI8976'ya transforme etmek ve enzimi bu bakteride üretmek.
4. Likenaz enzim genini taşıyan TL1R plazmidini kontrol olarak kullanmak amacıyla *Lactococcus lactis* IL1403 suşuna aktarmak.
5. Rekombinant *S. thermophilus* FI8976 ve *Lactococcus lactis* IL1403 bakterilerinin ürettiği enzimleri SDS-PAGE ve SDS-Likenan-PAGE jellerde sırasıyla moleküler ağırlık ve enzim aktiviteleri bakımından karşılaştırmak.

Bu tez kapsamında ise; bir rumen bakterisi olan *Streptococcus bovis* JB1'den Ekinci ve arkadaşları (1997a) tarafından pTRW10 (*E. coli*/*Streptococcus*) mekik vektörüne takılıp oluşturulan TL1R plazmidini ile *L. lactis* IL2661 ve *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis*'de eksprese edilen $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni *Streptococcus thermophilus* FI8976 suşuna elektrotransformasyonla aktarılıp eksprese etmekten ibarettir. *E. coli* klonu şeklinde sağlanan TL1R plazmidini bu amaçla önce *S. thermophilus* FI8976 suşuna aktarılmış, daha sonra da kontrol amacıyla *L. lactis*

IL1403 suşuna aktarılarak bu suşlardan elde edilen rekombinant enzimleri SDS-PAGE ve SDS-Likenen-PAGE jellerde karşılaştırılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Likenaz Enzimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Borriss ve ark. (1980), *B. subtilis*, *B. macerans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. pumilus* ve *B. polymyxa*'nın ürettiği endo-beta-glukanazlar ile substrat spesifitelerinin ilişkisini araştırmışlardır. *B. macerans*'ın beta-glukanaz'ı dışındaki tüm enzimlerin likenan ve arpa beta-glukanını hidrolize ederken laminarin ve CM-selüloz üzerine aktivite göstermediğini ortaya çıkarmışlardır. *B. macerans*'ın beta-glukanaz enziminin laminarin ve $\beta(1,3-1,4)$ -glukanı parçaladığını ve bunun da laminarinaz (1-3- β -D-glukan glukanohidrolaz, E.C. 3.2.1.6) olarak sınıflandırıldığını, diğer *Bacillus* suşlarının ürettiği glukanazların ise likenaz ($\beta(1,3-1,4)$ -D-glukan glukanohidrolaz, E.C. 3.2.1.73) olarak sınıflandırıldığını bildirmişlerdir.

Cantwell ve ark. (1983), endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz'ı kodlayan bir *B. subtilis* genini bakteriyofaj lamda ve plazmid vektörler kullanarak *E. coli*'ye aktarmışlardır. İlgili genin 1,6 kb'lık EcoRI-PvuI DNA fragmenti içinde bulunduğunu ve *E. coli*'de arpa glukani ve likenanını indirgeyen beta-glukanazı kodladığını bildirmişlerdir.

Hincliffe (1984), *Bacillus subtilis* NCIB 8565 suşuna ait yüksek miktarda endo- $\beta(1,3-1,4)$ -D-glukanaz enzimi salgılayan geni EcoRI enzimiyle keserek pBR325 plazmidi ile klonlamıştır. Daha sonra rekombinant klonu *Escherichia coli* K12 suşuna aktarmış ve enzimi beta-glukan, laminarin ve karboksimetil selüloza karşı denemiştir. Araştırmacı enzimin laminarin ve karboksimetil selüloza karşı etkili olmadığını fakat β -glukanı hidrolize ettiğini bildirmiştir.

Hofemeister ve ark. (1986), *B. amyloliquefaciens* BE20/78 suşundan oldukça fazla miktarda salgılanan endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (EC 3.2.1.73) enzimini kodlayan 1583 bç'lik DNA fragmentinden oluşan *bg1A* geninin nükleotid dizisini belirlemişlerdir. Bu genin ORF bölgesinin *B. subtilis* C120'nin β -glukanazı ile %90 benzerlik gösterdiği de bildirilmiştir.

Cantwell ve ark. (1986), *Bacillus subtilis* kökenli endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz genini birkaç değişik maya ekspresyon vektöründe ve maya promotörü kontrolü altında klonlamışlardır. Daha sonra hibrid plazmidleri *Saccharomyces cerevisiae*'ye

transforme etmişlerdir. Araştırmacılar *B. subtilis* β -glukanaz enzim geninin başlama kodununun bulunması, mayada genin ekspresyonunu azalttığını, buna karşılık enzim üretiminin ADH1 promotörü kullanıldığında CYC1 promotörüne kıyasla 1000 kat arttığını bildirmişlerdir.

Erfle ve ark. (1988), *Bacteroides succinogenes*'den *Escherichia coli*'de klonlanan $\beta(1,3-1,4)$ -D-glukanaz (likenaz, $\beta(1,3-1,4)$ -D-glukan 4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.73) enzimini 600 kat saflaştırmışlardır. Klonlanan enzimin likenan ve yulaf beta-D-glukanı, CM(carboxymethyl)-selüloz, CM-pachyman, laminarin yada ksilan'ı hidrolize edebildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar enzimin pH optimumunu 6.0, sıcaklık optimumu ise 50°C olarak bulmuşlardır. Likenan substrat olarak kullanıldığında ana hidrolitik ürünler trisakkarit (%82) ve pentasakkarit (%9.5), yulaf β -D-glukan'ının hidroliz majör ürünleri ise trisakkarit (%63.5) ve tetrasakkarit (%29.6) olarak gözlenmiştir. Araştırmacılar klonlanan gene ait enzimin kromatografik sonuçlarının *Bacillus subtilis*'den izole edilen karışık bağılı β -D-glukanaz ile büyük benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bates ve ark. (1989), *Clostridium thermocellum*'a ait $\beta(1,4)$ -endoglukanaz enzimini kodlayan celE genini taşıyan pM25 rekombinant plazmidini elektrotransformasyon metodu ile *L. plantarum*'a transforme etmişlerdir. pM25 plazmidini taşıyan suşlar kültür ortamında predominant olarak bulunan sıcaklığa karşı dirençli endoglukanazı sentezlemişlerdir. Araştırmacılar pGK12 ve pSA3 plazmidlerini ise stabilitelelerini karşılaştırmak amacıyla *L. plantarum*'a transforme etmişlerdir.

Borriss ve ark. (1990), *B. macerans*'dan 852 bç moleküler ağırlığa sahip genin kodladığı sıcaklığa karşı dirençli $\beta(1,3-1,4)$ -glukanazı araştırmışlardır. *BglM* geninin sentezlediği enzimin sonundaki amino asitlerin, *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'deki mezofilik $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz'lar ile %70 oranında benzerlik göstermiştir. *B. macerans*'ın sinyal peptidininin *E. coli*'de enzimin periplazmik boşlukta birikmesinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tüm glukanaz aktivitesinin %50'den fazlasının periplazmik boşlukta ve süpernatantda biriktirdiği bildirilmiştir.

Lloberas ve ark. (1991), endo- β (1,3-1,4)-glukanaz'ı kodlayan bir *B. licheniformis* genini *E. coli*'de klonlamışlardır. Sinyal peptid *E. coli*'de de fonksiyonel olup enzim aktivitesinin %60'ından fazlasının ekstraselüler ya da periplazmik olduğu görülmüştür. Araştırmacılar bu enzimin bildirilen diğer *Bacillus* beta-glukanazları ile oldukça yüksek benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır.

Schimming ve ark. (1991), *Clostridium thermocellum*'dan moleküler ağırlığı yaklaşık 35.000 Dalton olan termoaktif β (1,3-1,4)-glukanaz (likenaz) enzimini kodlayan bir geni (*licB*) *Escherichia coli*'de 1,5 kb'lık DNA fragmenti üzerinde klonlamış ve eksprese etmişlerdir. Bu enzimin arpa beta glukani ve likenanda olduğu gibi beta-1,3 ve beta-1,4 glukani üzerine etkili iken, sadece 1,3 ya da sadece 1,4 glukosidik bağlar içeren beta glukanolar üzerine etkili olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar enzimin sıcaklık optimumunun 80°C olduğunu ve pH 5-12 arasında aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Gosalbes ve ark. (1991), *Bacillus polymyxa*'da ksilanaz ve endo- β (1,3-1,4)-glukanaz (likenaz)'ı kodlayan *xynD* ve *gluB* genlerini *E. coli* ve *B. subtilis*'de klonlamışlardır. Bu iki genin 4,466 kb'lık bir DNA fragmenti üzerinde olduğu ve genlerin birbirinden 155 bp ile ayrıldığı bildirilmiştir. Ayrıca *xynD* geninin 67,8 kDa (*xynD*) ve *gluB* geninin ise 27 kDa (*gluB*)'luk proteini kodladıkları ve Zymogram analizleri sonucunda her iki peptidin de ksilanaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir.

Schimming ve ark. (1992), *Clostridium thermocellum*'dan termoaktif β (1,3-1,4)-glukanaz enzimini kodlayan *licB* geninin nükleotid sırasını belirlemişlerdir. *licB* geninin ilk translasyon ürününün moleküler ağırlığını 37,896 kDa olarak saptamışlardır. Enzimi oluşturan amino asitlerin farklı segmentlere ayrıldığı ve bunların N-terminal sinyal peptid, bir katalitik bölge ile Proline ve Threonine amino asitlerince zengin bölge olduğu, katalitik bölgenin *Bacillus* (%52-58) ve *Fibrobacter succinogenes* (%35) likenazları ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir.

Louw ve Watson (1993), *Bacillus brevis*'e ait endo- β (1,3-1,4)-glukanaz enzimini kodlayan bir geni *Escherichia coli*'de klonlamışlardır. Enzimin optimum pH'sını 8-10, optimum sıcaklığı ise 65-70°C olarak bulmuşlardır. Enzimin moleküler

ağırlığını SDS-PAGE yöntemi ile 29 kDa olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar enzimi 75°C'de 1 saat inkübe ettiklerinde aktivitesinin %75'ini koruduğunu bildirmişlerdir.

Tabernero ve ark. (1994), alkalifilik *Bacillus sp.* suşu olan N137'den alkalik endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz (likenaz) enzimini kodlayan *bgaA* genini izole etmişler ve kendi promotörü ile *E. coli*'de klonlamışlardır. *bgaA* genini taşıyan 1,416 kbç'den oluşan DNA fragmentinin nükleotid sırasını belirlemişlerdir. BgaA geninin likenaz aktivitesinin pH 6-12 arasında stabil kaldığını, sıcaklık optimumunun da 60-70°C olduğunu ve enzimin 70°C'de 1 saat inkübasyonundan sonra aktivitesinin %65'ini koruyabildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu proteinin *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. polymyxa* ve *B. subtilis* gibi *Bacillus* likenazları ile benzer olduğunu da bildirmişlerdir.

Wolf ve ark. (1995), *B. subtilis* 168 suşunun kromozomal DNA'sından 770 baz çiftinden oluşan ekstraselüler ksilanaz (*xynA*)'ı kodlayan geni PCR ile çoğaltmışlardır. Endo- β -1,4-glukanaz (*eglS*) ve endo- β (1,3-1,4)-glukanaz (*bglS*)'ı kodlayan genleri *B. subtilis* 168'in genomik kütüphanesinden izole etmişlerdir. Araştırmacılar *XynA* ve *eglS* genlerinin baz dizilerinin *B. subtilis* PAP115'in ksilanaz ve selülaz genlerinin baz dizileri ile aynı olduğunu bildirmişlerdir. Ksilan, karboksimetilselülaz ve karışık bağlı β (1,3-1,4)-glukanaz aktivitesine sahip olmayan suşlar için *B. subtilis* 168'in *xynA*, *eglS* ve *bglS* genlerini içeren entegratif plazmid oluşturmuşlardır.

Ekinci ve ark. (1997a), *Streptococcus bovis* JB1'in β -(1,3-1,4)-glukanlara karşı aktif olan 25 kDa'luk ekstraselüler bir enzim ürettiğini bulmuşlardır. 16 glukosid hidrolaz familyasına ait olan β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimini kodlayan bu geni izole etmişler ve plazmid vektör pTRW10 ya da pIL253 aracılığıyla tekrar *S. bovis* JB1'e aktarmışlardır. Araştırmacılar rekombinant *S. bovis*'in süpernatantındaki β -glukan aktivitesinin 4-10 kat arttığını bildirmişlerdir. pTRW10 plazmidine bu genin takılmasıyla oluşturulan rekombinant pTRWL1R plazmidini *Lactococcus lactis* IL2661 ve *Enterococcus faecalis* JH2-SS'e aktarmışlar ve geni eksprese etmişlerdir. Ancak enzimin ekstraselüler aktivitesinin *S. bovis*'e göre 8-50 kat daha azaldığını gözlemişlerdir.

Chen ve ark. (1997), 971 bazlık cDNA'dan oluşan ve funguslardan izole edilen ilk likenaz geni olan *licA* ($\beta(1,3-1,4)$ -D-glukanaz; EC 3.2.1.73) genini *Orpinomyces* sp. suşu PC-2'den *E. coli*'de bir genomik kütüphane oluşturarak saptamışlardır. *E. coli*'nin ürettiği β -glukanazı kültür ortamından saflaştırmışlar ve SDS-poliakrilamid jelde moleküler ağırlığını 27 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin sonundaki amino asit sırasının bakteriyel beta glukanazlar ile yüksek derecede homoloji gösterirken bitki beta-glukanazları ile homoloji göstermediğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar *licA*'yı kodlayan genomik DNA bölgesinin intron içermediğini de belirtmişlerdir. Öte yandan araştırmacılar bu sonuçlar ile *Orpinomyces*'e ait *licA* geninin bakteriyel orijine sahip olduğunu da ortaya çıkarmışlardır.

Heng ve ark. (1997), bağırsakta bulunan bakterilerden *L. reuteri*'ye *B. macerans*'ın endo- $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz genini (*bgIM*) plazmid ile elektrotransforme etmişler, *Lactobacilli*'nin enzimi ifade ettiğini ve sentezlediğini bildirmişlerdir.

Bang ve ark. (1999), *Phaffia rhodozyma*'dan β -glukanaz ve aspartik proteaz enzimlerini belirlemiş ve klonlamışlardır. *P. rhodozyma* CBS6938'den cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve endo-1,3(4)- β -glukanaz (*bgI*) ve aspartik proteaz (*prI*)'i kodlayan cDNA ile *Saccharomyces cerevisiae*'de klonlamışlardır.

2.2. Kanatlarda Tahıl Ağırlıklı Rasyonlara β -Glukanaz Enzimi İlavesi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Broz ve Frig (1986), %64 arpa temeline dayalı etlik piliç karmalarına β -glukanaz enzimi ilavesinin organik besin maddelerinin sindirilebilirliği, azot birikimi ve metabolik enerji üzerine etkilerini incelemişler ve enzim ilavesinin kurumadde, organik madde ve yağın sindirilebilirliğini artırdığını ve gerçek metabolik enerji değerini de yükselttiğini bildirmişlerdir.

Elwinger ve Saterby (1987), %65 arpa ve %65 yulaf temeline dayalı etlik piliç karmalarına β -glukanaz enzimi ilavesinin pazarlama ağırlığı ve verim kriterleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Enzim ilavesinin canlı ağırlık ve yemden

yararlanmayı iyileştirdiğini ayrıca yapışkan dışkıyı hayvan sayısını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

Broz ve Frig (1990), yaptıkları diğer bir çalışmada %60 yulaf içeren karma yemlere selüloz ve β -glukanaz aktivitesine sahip enzim ilavesinin besin maddelerinden yararlanma ve metabolik enerji üzerine etkilerini araştırmışlardır. Enzim ilavesi ile hayvan organizmasının yararlandığı besinmaddesi miktarında ve yemlerin metabolik enerji değerinde önemli artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Inberr (1990), yaptığı çalışmada toz ve pelet yeme β -glukanaz enzimi ilavesinin etkilerini araştırmıştır. Hem toz hem de pelet yeme β -glukanaz enzimi ilavesinin canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanmayı önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmiştir.

Salih ve ark (1991), arpa temeline dayalı etlik piliç karmalarına β -glukanaz enzimi ilavesinin etkilerinin yaşa bağlı olarak değişimini incelemişlerdir. Araştırmada, enzim ilavesiz buğday temeline dayalı etlik piliç karmaları ile enzim ilaveli arpa temeline dayalı etlik piliç karmalarını da karşılaştırmışlardır. Arpa temeline dayalı etlik piliç karmalarına β -glukanaz enzimi ilavesiyle canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanmanın iyileştiğini ve hayvanların enzim ilavesiyle, enzim ilavesiz buğday temeline dayalı karmaları tüketen etlik piliçlerin performansına ulaştıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca enzim ilavesinin verim kriterleri üzerine etkisinin 4. haftaya kadar daha belirgin olduğunu, 4. haftadan sonra bu etkinin azaldığını gözlemişlerdir.

Jeroch ve ark. (1992), tarafından yürütülen bir çalışmada farklı arpa varyetelerini içeren etlik piliç karmalarına β -glukanaz aktivitesine sahip enzim ilavesinin etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları araştırma sonucunda farklı arpa varyetelerini içeren arpa temeline dayalı karmaları tüketen etlik piliçlerde enzim ilavesiyle canlı ağırlık ve yemden yararlanmada iyileşmenin sağlandığını, su tüketiminin de azaldığını bildirmişlerdir.

Aksoy ve ark. (1995), etlik piliçlerde yürüttükleri bir çalışmada arpa içerikli rasyonlara enzim (arabinoksilanaz ve β -glukanaz) katkısının canlı ağırlık kazancını %12 ve yem dönüşüm oranını %3.2 oranında yükselttiğini, buğday içerikli

rasyonlarda ise aynı enzim katkısının canlı ağırlık kazancı, yem tüketimi ve yemden yararlanma düzeyini etkilemediğini bildirmişlerdir.

Almirall ve ark. (1995), β -glukan içeriği yüksek arpalı rasyonlara enzim ilavesiyle ince bağırsak içeriği viskozitesinin önemli oranda düştüğünü, nişasta, protein ve yağ sindirilebilirliklerinde ve bunlara bağlı olarak verimde önemli artışlar olduğunu saptamışlardır.

Canoğulları ve Okan (1995), etlik piliç karma yemlerinde enzim katkısı ile en uygun arpa kullanım oranının araştırılması amacıyla %10, 20, 30 arpa içeren karma yemlere %0.1, 0.2, 0.3 enzim (endo-beta 1,3-1,4 glukanaz, selülaz, ksilanaz, pektinaz, amilaz) ilave etmişlerdir. Karma yem gruplarında en yüksek canlı ağırlık kazançları %20 ve %30 arpa içeren karma yem gruplarında olduğunu, yemden yararlanma düzeyleri ve yem tüketim miktarlarının benzer olduğunu yani enzimin arpa ve buğday enerjisinden yararlanmayı artırdığını, yürütülen çalışma süresince sulu dışkı problemi ile karşılaşmadıklarını ve en yüksek kuru madde içeriğinin %30 arpa düzeyinde %0.3 enzim katkılı grubun sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar tüm bu sonuçlara göre etlik piliç karma yemlerinde arpanın %30 düzeyine kadar %0.1-0.3 enzim katkısı ile kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Cowan ve Hastrup (1995), hindi ve ördeklerde arpaya dayalı rasyonlara beta-glukanaz ve ksilanaz enzimlerinin ilavesi ile canlı ağırlıklarında önemli artışlar (ördeklerde %5.2, hindilerde %3) olduğunu bildirmişlerdir.

Francesch ve ark. (1995), arpaya dayalı rasyonlara değişik düzeylerde beta-glukanaz içerikli enzim ilavesi (0-20-40-60 ppm/kg) ile yem tüketiminde azalmanın olduğunu, su tüketimi ve yapışkan dışkı oluşumunun azaldığını, protein ve yağın parçalanmasının önemli derecede arttığını ve en iyi sonucun 60 ppm/kg yem enzim ilavesinin verdiğini bildirmişlerdir.

Günel ve ark. (1995), etlik piliçlerde mısır yerine %40 düzeyinde çavdarın ticari bir enzim kokteyli (selülaz, endo-1,3-1,4- β -glukanaz, ksilanaz, pektinaz ve amilaz) ile birlikte kullanıldığında enzim katkısının canlı ağırlık kazancını ve yemden yararlanma oranını iyileştirdiğini ve bağırsak viskozitesini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Kutlu ve ark. (1995), mısır ve soyaya dayalı olarak hazırlanan etlik piliç rasyonlarında ticari bir enzim kokteyli (selülaz, endo-1,3-1,4- β -glukanaz, ksilanaz, pektinaz ve amilaz) katkısının etlik piliçlerin vücut gelişimini ve yem tüketimini %7 oranında arttırdığını; ancak yemden yararlanma düzeylerini etkilemediğini bildirmişlerdir.

Okan ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada etlik piliçlerde karma yemlere %0.2 enzim katkısı ile %10, 20 ve 30 düzeyinde arpa kullanımının besi performansı ve karkas özelliklerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar deneme sonuçlarına göre etlik piliç karma yemlerinde %30'a kadar arpanın %0.2 enzim katkısı ile buğday yerine kullanılabileceğini, ancak istatistiki olarak önemli olmasa da %20 arpa içeren %0.2 enzim katkılı karma yemin daha iyi gelişim ve daha iyi yemden yararlanma sağladığını bildirmişlerdir.

Patridge ve Wyatt (1995), yüksek düzeyde buğday içeren rasyona enzim ilavesi ile bağırsak viskozitesinde azalma olduğunu, enerji, protein ile bazı amino asitlerin sindirilebilirliklerinde ise önemli artışlar olduğunu bildirmişlerdir.

Simbaya ve ark. (1996), Sorensen (1996) ve Schang ve ark. (1997), mısır/soya küspesi, mısır/ayçiçeği küspesi, mısır/soya/ayçiçeği küspesi veya kanola küspesi içeren yemlere enzim (hemi-selülaz, pentozonaz, beta-glukanaz, pektinaz, amilaz, proteaz) ilavesi ile etlik piliçlerin yemden yararlanma etkinliklerinin artacağını bildirmişlerdir.

Polat ve ark. (1999), yaptıkları bir çalışmada yeme ksilanaz ve β -glukanaz enzimlerinin ilavesiyle etlik piliçlerde kontrol grubuna göre canlı ağırlık ve yem tüketiminin arttığını bildirmişlerdir.

2.3. *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactococcus lactis* Bakterilerine Ait Elektrotransformasyon İle İlgili Önceki Çalışmalar

Lunchansky ve ark. (1988), *Lactobacillus acidophilus* bakterisi için gen transfer ve klonlama sistemlerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. *L. acidophilus*'a plazmid DNA'nın elektrotransformasyonundaki faktörleri optimize etmeye çalışmışlar ve pGK12 (4,4 kb) plazmidini elektrotransformasyon ile *L. acidophilus*'a başarılı bir şekilde aktarmışlardır. Ayrıca optimize edilen koşullarla *L.*

acidophilus'a pAMB1, pC194, pGB354, pGKV1, pSA3, pTRK13 ve pTV1 gibi birçok plazmidi aktarmışlardır. Araştırmacılar *L. acidophilus*'dan izole edilen pGK12 plazmidinin kesme enzimleri ile yapılan kesimi sonucunda elektrotransformasyon sonrası herhangi bir delesyon veya yeniden düzenlenmeye rastlanmadıklarını bildirmişlerdir.

Powell ve ark. (1988), bir elektrotransformasyon protokolünü *S. cremoris* ve *S. lactis*'e uygulamışlardır. Bu protokol *S. lactis* LM0230 için optimize edilmiştir. pMU1328 plazmidi kullanıldığında transformasyon etkinliği 1×10^4 ve 5×10^5 transformant/ μg DNA olarak saptanmıştır. Ayrıca, pLS1 (4,4 kb), pMU1328 (7,4 kb) ve pAMB1 (26,5 kb) plazmidlerinin *S. lactis* LM0230 suşuna transformasyon etkinliklerinin de benzer olduğunu bildirmişlerdir.

McIntyre ve Harlander (1989a), *L. lactis subsp. lactis* LM0230 suşuna transformasyonda optimum elektrotransformasyon değerlerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Yıkanan ve deiyonize suda çözölen hücreler 300-900 V, 5-17 kV/cm ve süre olarak 100 μs ile 1 sn arasında değişen değerlerde yüksek elektrik akımı uygulamışlardır. 10^3 transformant/ μg DNA transformasyon etkinliğini bakteri durağan fazda iken son konsantrasyonu 5×10^{10} CFU/ml yoğunluğunda, 900 V ve 5 ms'de belirlemişlerdir. Bildirdikleri protokol ile 9,8-30,0 kb büyüklüğindeki plazmidlerin transforme edilebileceğini göstermişlerdir.

McIntyre ve Harlander (1989b), *L. lactis subsp. lactis* LM0230 suşuna elektrotransformasyon çalışmalarında gelişme koşullarının etkisini araştırmışlardır. %0.5 glukoz takviyeli M17 (M17-Glu) ve %0.24 DL-threonine ya da %0.5 glisin içeren FMC ve RPMI 1640 sentetik besi yerlerinde bakteriler üretilmiştir. pGB301 plazmid DNA'sı kullanıldığında elektrotransformasyon etkinliğinin FMC ya da RPMI 1640 besi yerinde (10^3 - 10^4 transformant/ μg DNA) M17-Glu (10^1 - 10^2 transformant/ μg DNA)'a göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Scheirlinck ve ark. (1989), yaptıkları ön çalışmada ticari silaj başlama suşu olan *L. plantarum*'a *B. stearothermophilus*'dan bir α -amilaz ve *Clostridium thermocellum*'dan bir endoglukanaz genini içeren plazmid DNA'yı elektrotransformasyon ile aktarmışlardır. Ancak transforme edilen plazmid DNA'nın

stabilizasyonunun düşük olması sebebiyle transforme edilen genleri homolog (benzer) rekombinasyon tekniğini kullanarak *L. plantarum*'un kromozomuna yerleştirmişlerdir. Transformantların çoğunluğunda genin alıcı hücrede ikincil bir mutasyona uğramadan stabil kaldığı ve böylece rekombinant *L. plantarum*'un selüloolitik silaj başlangıç bakterisi olarak uygun hale getirildiği bildirilmiştir.

Wei ve ark. (1995), *Lactobacillus* suşlarına yabancı plazmid DNA'ların elektrotransformasyonunu optimize ettikleri bir protokol geliştirmişlerdir. Alıcı *Lactobacillus* suşlarına lizozim, glisin ya da penisilin uygulaması ile elektrotransformasyon etkinliğinin 480 kat arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar klinik *Lactobacillus* suşlarına pSA3 plazmidinin (*E. coli* plazmidi pACYC184 ve *S. sanguis* plazmidi pGB305'den oluşturulmuştur) elektrotransformasyonla aktarılmasında kritik aşamanın elektrik akımı sonrasında hücrelerin antibiyotiksiz sıvı besi ortamında 2-3 saat üretilmesi olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar kuyruksuz rat (guinea pig)'ın vajinasından izole edilen *Lactobacillus*'da (maksimum 4.8×10^4 transformant/ μg pNZ17 (*S. lactis* plazmidi) ve insandan izole edilen *L. casei* ATCC 393'de (maksimum 3.7×10^6 transformant/ μg pNZ17) elektrotransformasyon etkinliği gözlemişlerdir.

Lin ve ark. (1996), *L. acidophilus* ADH'ın kromozomal DNA'sını HindIII enzimiyle keserek elde ettikleri bir fragmenti *E. coli* vektörü olan pBluescript II SK+'ya takarak entegratif vektör oluşturmuşlardır. 1,9 kb büyüklüğündeki kromozomal DNA fragmentinin ortasına yakın bir yerde SauI kesim noktasının bulunması *L. bulgaricus* β -galaktosidaz (EC 3.2.1.23) geninin bu vektöre Sau3A kesim noktası içerisine klonlanmasını mümkün kılmıştır. Kromozomal DNA fragmentinin β -galaktosidaz (*βgal*) geninin homolog rekombinasyonu ile hem *L. acidophilus* hem de *L. bulgaricus*'un kromozomuna entegre olduğu ve bunun sonucunda da transformantların β -galaktosidaz aktivitesinin 200 kat arttığı bildirilmiştir. Ayrıca *βgal* geninin antibiyotik içermeyen besi yerinde 30 aktarım süresince stabil kaldığı da gözlenmiştir.

Walker ve ark. (1996), *L. helveticus* CNRZ32'ye ait elektrotransformasyon protokolünü modifiye etmişler ve yeni protokol ile süt teknolojisinde kullanılan *L.*

acidophilus ATCC4356 ve NCFM-N2'ye pGK12 plazmidi başarılı bir şekilde aktarmışlardır.

O'Sullivan ve ark. (1999), bir standart elektrotransfomasyon protokolünü gram-pozitif plazmid vektörlerini *S. thermophilus*'un dokuz endüstriyel suşuna aktarmada kullanmışlardır. Tüm suşlara en az iki vektör aktarmışlar ancak elektrotransfomasyon etkinliğinin hem suşa hem de aktarılan plazmid DNA'nın yapısına bağlı kaldığını gözlemişlerdir. Genelde küçük halkasal plazmidleri yüksek etkinlikte (10^2 - 10^5 transformant/ μ g DNA) ve daha fazla sayıda suşa aktarılabilirdiği bildirilmiştir. Ayrıca bu plazmidlerin varlığı bakterinin besi ortamında gelişme süresini etkilemediği ve transformantların %85-100'ünün 105 generasyon stabil kaldığı bildirilmiştir.

2.4. Kanatlılarda Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanılması İle İlgili Önceki Çalışmalar

Tortuero (1973a), broyler ve yumurtacı civcivlere ilk beş günlük yaştan sonra beş gün boyunca verilen *L. acidophilus*'un canlı ağırlık artışını arttırdığı ve yem değerlendirme sayısı üzerine olumlu etkileri olduğunu bildirmiştir.

Couch (1978), broylerlerin yemlerine *L. acidophilus* katkısının erkek civcivlerde %7-10, dişi civcivlerde ise %5-6 oranında gelişimlerini arttırdığını bildirmiştir.

Arends (1981), broylerlere safra tuzlarına dayanıklı bir *L. acidophilus* suşunu (10^8 *Lactobacilli*/gün) içme suyuna karıştırılarak vermiştir. 30 gün süren deneme sonunda *L. acidophilus* verilen grupta kontrol grubuna göre canlı ağırlığın %6 ve yem dönüşüm oranının %3 oranında artış sağlanmıştır.

Meluzzi ve ark. (1986), 0-60 gün boyunca yürüttükleri denemede civcivlerin yemlerine %2 oranında *L. lactis* ve *S. thermophilus* bakterilerinin karışımının eklenmesiyle canlı ağırlık artışının ve yem dönüşüm oranının arttığını bildirmişlerdir.

Perdigon ve ark. (1990), *Lactobacilli*'nin genç hayvanlarda bağırsak iltihaplarına neden olan antijenlere karşı bağışıklık sisteminin gelişmesine yardımcı olduğunu belirtmişlerdir.

Chateau ve ark. (1993), ticari bir probiyotik preparatından izole edilen *Lactobacillus* türlerinin bakteriyosin benzeri maddeler üreterek *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Salmonella enteritis*'e karşı etkin bir inhibasyon gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Nahashon ve ark. (1993, 1996a, b), *Lactobacillus*'ların yumurta tavuklarında performans üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada melas ile yoğunlaştırılmış mısır ve soya kütlesi hammaddelerinden hazırlanan 1100 veya 2200 mg/kg *Lactobacillus* katkılı yemle beslenen yumurtacı tavuklarda, yumurta büyüklüğü ve ağırlığının arttığını bildirmişlerdir.

Nisbet ve ark. (1993), Corrier ve ark. (1994), *S. faecalis*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus* karışımının laktoz ile birlikte katkısının civcivlerin *Salmonella* kolonizasyonuna karşı dirençlerini arttırdığını bildirmişlerdir.

Chiang ve Hsieh (1995), karma yeme *L. acidophilus*, *S. faecium* ve *B. subtilis* karışımını içeren probiyotik katkısının etlik piliçlerde dışkıdaki amonyak konsantrasyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Tortuero ve Fernandez (1995), *L. acidophilus* ve *L. casei* kültürleri karışımı içeren yumurta yemiyle beslenen yumurta tavuklarında yumurta verimi, yemden yararlanma oranı, yumurta ağırlığı ve albumen kalitesinin arttığını bildirmişlerdir.

Abdulrahim ve ark. (1996), *L. acidophilus* bakterisinin önemli düzeyde yumurta üretimi ve yem dönüşüm oranını arttırdığını, yumurta sarısındaki kolestrolü düşürdüğünü ancak yumurta sarısındaki yağ ve trigliseriti azaltmadığını bildirmişlerdir.

Mohan ve ark. (1996), *L. acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum* ve *Aspergillus oryzae* karışımının karma yeme katkısının (100 mg/kg) canlı ağırlık kazancını %5'den %9'a kadar arttırdığını bildirmişlerdir.

Nahashon ve ark. (1996a), *Lactobacillus* katkılı yumurta yemiyle beslenen (%15 ham proteinli) 20-59 haftalık yaştaki yumurta tavuklarında kontrol grubuyla (*Lactobacillus* katkısız yemle beslenen) karşılaştırıldığında yumurta büyüklüğünün arttığını bildirmişlerdir.

Jin ve ark. (2000), *Lactobacillus* kültürleri ilave edilen yemlerle beslenen broylerlerde, performans kriterleri ve ince bağırsakta sindirim enzimleri (amilolitik,

proteolitik, lipolitik) ile ince bağırsakta ve gübrede bakteriyel β -glukosidaz ve glukoronidaz enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı ve yem değerlendirme sayısı açısından, *L. acidophilus* ve karışık *Lactobacillus* kültürlerinden oluşan grupların kontrol grubuna göre daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir ($P<0.05$). İnce bağırsak enzim aktivitelerinde ise proteolitik ve lipolitik aktivite bakımından bir fark bulunmamasına karşın amilolitik aktivite bakımından *Lactobacillus* kültürlerinden oluşan gruplar kontrol grubuna göre üstünlük sağladığını belirtmişlerdir. β -glukosidaz aktivitesi açısından ince bağırsak içeriğinde bir fark bulunmadığını, dışkı içeriğini incelediklerinde ise; *L. acidophilus* içeren grupların kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

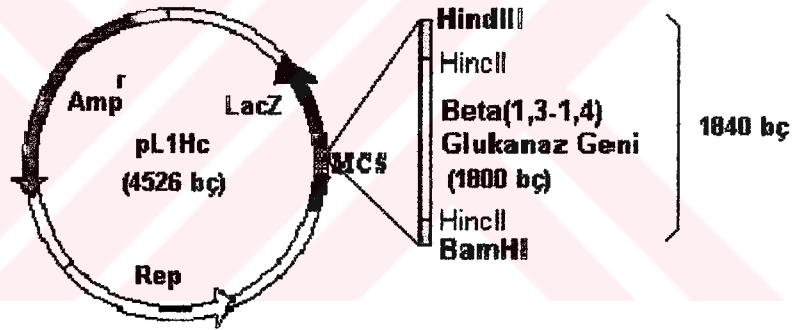
3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

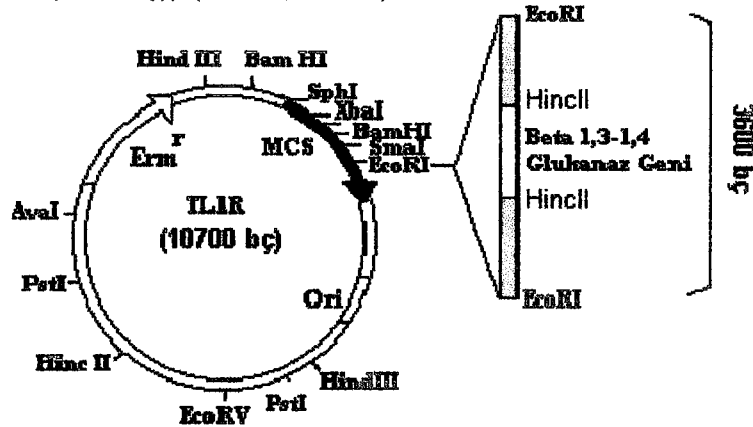
3.1.1. Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları

Bu çalışmada kullanılan *Lactobacillus acidophilus* A-161 suşu Ankara'daki Refik Saydam Hıfzısıhha Araştırma Merkezi'nden, *Lactococcus lactis* IL1403 suşu, *Streptococcus thermophilus* FI8976 suşu, *E. coli* içindeki pL1Hc ve TL1R plazmidleri Yrd.Doç.Dr. M. Sait Ekinici (K.S.Ü Ziraat Fakültesi Zooteknik Bölümü)'den, konakçı bakteri (*Escherichia coli* DH5 α) Stratagene'den, pBR325 plazmidi Sigma'dan satın alınmıştır.

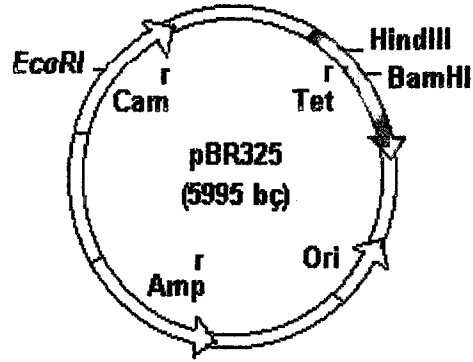
Araştırmada kullanılan plazmidlerin yapısı Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'de ayrıntılı şekilde verilmiştir.



Şekil 3.1. pL1Hc plazmidinin yapısı (pUC18 plazmidi (2686 bç)+Likenaz (β (1,3-1,4)-glukanaz) geni (1800 bç)) (Ekinici, 1997b)



Şekil 3.2. TL1R plazmidinin yapısı (pTRW10 plazmidi (7100 bç)+Likenaz geni insörtü (3600 bç)) (Ekinici, 1997b)



Şekil 3.3. pBR325 plazmidinin yapısı (Prentki ve ark., 1981)

Escherichia coli suşları %10 v/v gliserol içeren sıvı LB (%1 w/v Bacto tryptone, %0.5 Yeast extract, %0.5 w/v NaCl, pH 7.5) ortamında, *Lactobacillus acidophilus* bakterisi MRS (55 g/l) ve *Streptococcus thermophilus* ve *Lactococcus lactis* bakterileri M17 (42.5 g/l) besi ortamında yine aynı oranda gliserol içerisinde ve gene-bank'larda (Prolab, 20 Mural Street, Unit#4, Richmend Hill Ont. L4B K3, Canada) -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Bakteriler sıvı ve katı besi yerlerinde (LB-agar; %1.5 w/v agar; MRS-agar ve M17-agar; %1 w/v agar) üretilmişlerdir. Likenaz aktivitesinin belirlenmesinde ise katı besi yerlerine %0,1 w/v likenan ilave edilerek hazırlanmış test plakları kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasal ve kesme enzimlerinin büyük bir kısmı aksi belirtilmediği sürece Sigma, Merck, Promega, MBI Fermentas, Bohringer Mannheim, Carlo Erba, Fluka, Stratagene ve Difco'dan satın alınmıştır.

3.1.3. Aletler

Bu çalışmada kullanılan teknik malzemeler; santrifüjler Hettich (D-78532, Tuttlingen, Almanya), spektrofotometre Pharmacia-Biotech (Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4FJ, İngiltere), Gene Quant, jel görüntüleme cihazı Vilber Lourmat (B.P. 66 Torey-Z.I. SUD 77202 Marne La Valee-Codex, Fransa), otoklavlar Nüve, OT4060 (Kumrular Sok. 26/2, Kızılay, Ankara), hassas terazi Ohaus (29 Hanover Road, Florham Park, NJ 07932, ABD), su banyosu

Memmert (P.O. Box 17 20, 91107 Schwabach, Almanya), inkübatörler Nüve (Kumrular Sok. 26/2, Kızılay, Ankara), otomatik pipetler Biohit ve Gilson, hassas terazi Ohaus (29 Hanover Road, Florham Park, NJ 07932, ABD), vortex ve manyetik karıştırıcı CAT (M. Zipperer GmbH, D-7813 Staufen-Etzenbach, Almanya), elektroporator Invitrogen (3985 B Sorrento Valley Blvd., San Diego, CA 92121), sonikatör aleti Vilsonic 300, steril kabin Bilser (İzmir), çalkalayıcı Ika (Janke&Kunkel GmbH&Co KG, 79219 Staufen, Almanya), DNA ve protein jel elektroforez aletleri ATTO Corporation (2-3, Hongo 7-chome Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japonya) ve pH metre Nel (Sümer Sok., 42/1, Yenışehir, Ankara)'den temin edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. *E. coli*'den pBR325 Plazmid DNA'sının İzolasyonu

Entegratif vektör oluşturmada *E. coli* vektör plazmidi pBR325 kullanılmıştır. *E. coli*'den plazmid DNA izolasyonu Birnboim ve Doly (1979)'den değiştirilerek yapılmıştır:

1. LB besi yerine steril şartlarda bakteri ekilir ve uygun konsantrasyonlarda antibiyotik ilave edilir (antibiyotiklerin hazırlanması ve besi ortamlarındaki konsantrasyonları Ek 1.1'de verilmiştir) ve 37°C'de çalkalanarak bir gece üretilir.
2. İçinde bakteri kültürü bulunan erlen +4°C'ye (buzdolabına) alınarak soğutulur.
3. Kültür ortamı 5 ml'lik steril tüplere paylaştırılır ve 4500 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir.
4. Pelet üzerindeki süpernatant dökülür ve pelet 5 ml soğuk TNE tamponu (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) ile çözüldükten sonra 4500 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir.
5. Santrifüjden sonra tüplerdeki süpernatant dökülür ve pelet 200 µl lizozim solüsyonu (10 mg/ml) (Ek 1.3.) ile çözülerek ependorf tüplere aktarılır ve buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakılır.

6. Süre sonunda karışım üzerine 400 µl taze hazırlanmış SDS solüsyonu (%1 SDS, 0.2 M NaOH) ilave edilir, parmakla hafifçe vurularak karışması sağlanır ve buz üzerinde 5 dakika inkübasyona devam edilir.
7. Karışım üzerine 300 µl sodyum asetat (pH 4.8) ilave edilerek karıştırılır ve buz üzerinde 30 dakika daha bekletilir.
8. Süre sonunda 14000 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir ependorf tüpüne aktarılır.
9. Süpernatant üzerine 1 hacim fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edilir ve emülsifiye oluncaya dek tüpler alt üst edilerek yavaş yavaş karıştırılır.
10. Ependorf tüpler 14000 dev/dak'da 5 dakika santrifüjlenir ve üst faz (süpernatant) iki faz arasında biriken protein tabakasını almadan dikkatli bir şekilde alınır ve yeni bir ependorf tüpüne aktarılır.
11. Süpernatant üzerine 1 hacim kloroform:izoamil alkol ilave edilerek dikkatlice karıştırılır ve yukarıdaki gibi santrifüjlenir.
12. Üst faz dikkatli bir şekilde alınır ve yeni bir ependorfa aktarılır. Üzerine 2-2.5 hacim soğuk etanol (%99'luk) ilave edilir, vortekslenir ve -20°C'de en az 1 saat bekletilir.
13. Süre sonunda ependorf tüpler 15000 dev/dak'da oda sıcaklığında 15 dakika santrifüjlenir.
14. Pelet üzerindeki alkol dökülür, tüpler kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek pelet 5-10 dakika kurutulur ve 100 µl TE ilave edilerek nükleik asitlerin çözünmesi beklenir.
15. Nükleik asitler TE solüsyonu içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml stok RNaz solüsyonundan (Ek 1.2.) 1µl ilave edilir ve 37°C'de 1 saat su banyosunda tutularak RNA elemine edilir.
16. Süre sonunda DNA solüsyonu üzerine 1/10 v/v oranında sodyum asetat (pH 5.2) ilave edilir ve hacim 400 µl olacak şekilde üzeri su ile tamamlanır.

17. RNaz enzimini solüsyondan uzaklaştırmak için karışımın üzerine 1 hacim fenol:kloroform:izoamil alkol konarak hafifçe elde karıştırılır ve 15000 dev/dak'da 5 dakika santrifüjlenir.
18. Üst faz (süpernatant) dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir ependorf tüpüne aktarılır ve üzerine 1 hacim kloroform:izoamil alkol (24:1) ilave edilerek homojenize edilir, sonra yukarıdaki gibi santrifüjlenir.
19. Üst faz yine dikkatlice yeni bir tüpe alınarak üzerine 2 hacim soğuk etanol (%99'luk) ilave edilir ve hafifçe karıştırıldıktan sonra 15.000 dev/dak'da 15 dakika santrifüjlenerek DNA elde edilir.
20. Pelet 1 ml %70'lik alkolle yıkandıktan sonra tüpler ters çevrilerek 15-20 dakika kurutulur.
21. Peletin büyüklüğüne göre 25-100 µl TE ilave edilerek bir gece +4°C'de iyice çözüldükten sonra spektrofotometrik ölçümü yapılarak kullanılır.

3.2.2. pBR325 Plazmid DNA'nın Kesme Enzimiyle Kesilmesi

E. coli'den izole edilen vektör plazmid DNA pBR325'in EcoRI kesme enzimiyle kesilmesi işleminde Çizelge 3.1'e göre reaksiyon hazırlanmıştır. 1 ünite enzimin 1 µg DNA'yı 1 saatte kestiği düşünülerek reaksiyonda uygun miktarda DNA (10 µg) ve 1 µl enzim (10 U) kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan enzimin %50 oranında gliserol içermesi nedeniyle son hacmin 1/10'unu geçmeyecek şekilde en az 10 kat sulandırılması esas alınmıştır. Geriye kalan hacim ise toplam reaksiyon hacmine su ile tamamlanmış ve reaksiyon enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.1. pBR325 plazmid DNA'nın kesme enzimleriyle kesilmesi

REAKSİYON BİLEŞENLERİNİN;		
Cinsi	Stok konsantrasyon	Alınan Miktar
dH ₂ O	-	30 µl
DNA	2 µg/µl	5 µl
Reaksiyon Tamponu	10 X	4 µl
Enzim (EcoRI)	10 U/µl	1 µl
Toplam		40µl

3.2.3. pBR325 Plazmid DNA'nın Kesme Enziminden Arındırılması

Kesim reaksiyonundan sonra pBR325 plazmid DNA'yı klonlamada kullanabilmek için kullanılan enzim ve diğer bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için reaksiyon ürününü aşağıdaki protokole göre fenolle deproteinasyon yapıp etanolle çöktürülmüştür:

1. Reaksiyon karışımı üzerine 40 µl (1/10 hacminde) 3 M sodyum asetat (pH 4.8) ve 320 µl saf su ilave edilerek son hacim 400 µl'ye çıkartılır.
2. Bu reaksiyon karışım üzerine bir hacim (400 µl) fenol:kloroform:isoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek 3-5 dakika süreyle yavaş yavaş karıştırılır. Böylece enzimler deproteinize edilmiş olur.
3. Karışım 15000 dev/dak'da 5 dakika santrifüjlenir ve süpernatant (üst faz) dikkatli bir şekilde alınarak başka bir tüpe aktarılır.
4. Süpernatant üzerine bir hacim kloroform:isoamil alkol (24:1) ilave edilerek 3-5 dakika süreyle yavaş yavaş karıştırıldıktan sonra 15000 dev/dak'da 5 dakika santrifüjlenir ve süpernatant dikkatli bir şekilde alınarak başka bir tüpe aktarılır.
5. Süpernatant üzerine 2-2.5 hacim etanol ilave edilir, vortekslenir ve bir gece -20°C'de bekletilir.
6. Süre sonunda tüpler oda sıcaklığında 15000 dev/dak'da 15 dakika santrifüjlenir ve süpernatant atılır.
7. Tüpler ters çevrilir ve oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilerek pelet kurutulur.
8. Pelet üzerine 15-20 µl TE tamponu ilave edilir ve bir gün bekletilerek iyice çözünmesi sağlanır.

3.2.4. *L. acidophilus*'dan Kromozomal DNA İzolasyonu

Gram (+), sporsuz, aero-tolerant olan *L. acidophilus* bakterisi MRS besi yerinde (55 g/l) ve 37°C'de üretilmiştir.

L. acidophilus bakterisinden kromozomal DNA izolasyonu *Bacillus* türü bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu protokolü (Cutting ve Van Der Horn, 1990) değiştirilerek aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1. 10 ml'lik MRS besi yerine steril şartlarda *L. acidophilus* ekilir ve 37°C'de anaerobik koşullarda bir gece inkübe edilir.
2. Bakteri kültürü steril tüplere paylaştırılır ve 4500 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir.
3. Süpernatant dökülür ve pelet 10 ml lisis tamponu (50 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 7.5) ile çözülür ve 4500 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant dökülür ve pelet 400 µl 0.5 M süktroz ile çözülerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
5. Karışım üzerine 1 ml lisis tamponundan konulur ve son konsantrasyon 3.5 mg/ml olacak şekilde 5 mg lizozim de ilave edilerek sallanmadan 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
6. Karışım üzerine 300 µl %20 w/v sarkosil eklenerek 30 dakika daha inkübasyona devam edilir.
7. Karışım, 400 µl olacak şekilde ependorf'lara paylaştırılarak üzerine 1 hacim fenol konulur ve emülsifiye oluncaya kadar yavaş yavaş karıştırılır.
8. 15000 dev/dak'da 5 dakika santrifüjlenir ve üst faz dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir tüpe aktarılır.
9. Süpernatant üzerine 1 hacim fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) veya kloroform:izoamil (24:1) alkol konularak dikkatlice karıştırılır ve tekrar 15000 dev/dak'da 5 dakika santrifüjlenir.
10. Üst faz iki faz arasındaki proteinlere kadar dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir tüpe aktarılır ve üzerine 0.1 hacim 3 M pH 5.2 sodyum asetat ve 2.5 hacim soğuk etanol (%99'lük) koyularak tüpler alt üst edilmek suretiyle yavaşça homojenize edilir.
11. Beyaz yumak şeklinde görülebilen kromozomal DNA ya cam çubukla ya da santrifüjlenerek elde edilir.
12. 1 ml % 70'lik etanol konularak pelet yıkanır ve tüp kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek pelet kurutulur.
13. Üzerine 100 µl pH 7.6 TE (10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0) solüsyonundan konularak pelet çözülür.

14. Son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml stok RNaz solüsyonundan 1µl ilave edilerek 3.2.1'deki gibi RNaz işlemine devam edilir.

3.2.5. *L. acidophilus*'a Ait Kromozomal DNA'nın Kesme Enzimiyle Kesilmesi

İzole edilen *L. acidophilus* kromozomal DNA'sı EcoRI enzimi kullanılarak tam kesimi yapılmıştır. Reaksiyonda kromozomal DNA'nın tam kesimi amacıyla 1 µg kromozomal DNA kesimi için 2 ünite enzim kullanılmıştır. Reaksiyon 10 µg kromozomal DNA kullanılarak hazırlanmış ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon %0.4 w/v'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve 1,5-3 kb büyüklüğündeki kromozomal DNA fragmentleri (insört) agaroz jelden arındırılmıştır.

Çizelge 3.2. *L. acidophilus* kromozomal DNA'sının kesme enzimleriyle tam kesimi

REAKSİYON BİLEŞENLERİNİN;		
Cinsi	Stok konsantrasyon	Alınan Miktar
dH ₂ O	-	31.5 µl
<i>L. acidophilus</i> kromozomal DNA	4 µg/µl	2.5 µl
Reaksiyon Tamponu	10 X	4 µl
Enzim (EcoRI)	10 U/µl	2 µl
Toplam		40µl

3.2.6. *L. acidophilus*'a Ait İnsörtün Agaroz Jelden Saflaştırılması (Promega, DNA Purification System)

L. acidophilus'un 1,5-3,0 kb büyüklüğündeki kromozomal DNA fragmentleri (insört) daha sonra klonlamada kullanabilmek için elektroforezden sonra agaroz jelden aşağıdaki protokole göre saflaştırılmıştır:

1. DNA molekülü uygun konsantrasyondaki bir agaroz jelde yeteri kadar yürütülerek bantlar oluşturması sağlanır.
2. Jel, UV lamba üzerine konur. İstenilen DNA bandı keskin bir jiletle agarozu mümkün olduğu kadar az almaya dikkat ederek jelden ayrılır ve darası alınan bir ependorf tüpe konarak tartılır.

3. 300 µl (300 mg) agaroz için 1 ml Resin ilave edilerek 65°C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda agaroz tamamen eriyinceye kadar inkübe edilir.
4. Şırınga yardımı ile erimiş agaroz minikolum'dan geçirilir.
5. Şırınga içine 2 ml %80'lik isopropanol alkol konulduktan sonra yavaş bir şekilde boşaltılarak kolum yıkanır.
6. Minikolum 10000 dev/dak'da 2 dakika santrifüjlenir.
7. Minikolum içine 50 µl su veya TE konularak 1 dakika beklenir.
8. DNA fragmentlerinin elde edilmesi için minikolum 10000 dev/dak'da 20 saniye santrifüjlenir.
9. DNA'yı içeren sıvı +4°C veya -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edilir.

3.2.7. pBR325 ve İnsört (*L. acidophilus* Kromozomal DNA Fragmentleri) DNA'ların Ligasyonu ve pLA1 Plazmidinin Oluşturulması

pBR325 ve insört (*L. acidophilus* kromozomal DNA fragmentleri) DNA'ların ligasyonu için Çizelge 3.3'deki reaksiyon hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. pBR325 ve insört (*L. acidophilus* kromozomal DNA fragmentleri) DNA'ların ligasyonu

REAKSİYON BİLEŞENLERİNİN;		
Cinsi	Stok konsantrasyon	Alınan Miktar
dH ₂ O	-	14.5 µl
Vektör DNA (pBR325/EcoRI)	0.1 µg/µl	1µl
İnsört DNA (<i>L. acidophilus</i> kromozomal DNA/EcoRI)	0.05 µg/µl	2 µl
Ligaz Tamponu	10 X	2µl
Enzim (T4 DNA Ligaz)	5 U/µl	0.5 µl
Toplam		20µl

Hazırlanan ligasyon reaksiyonu 22°C'de 1 saat tutulduktan sonra +4°C'de 1 gece (yaklaşık 10 saat) inkübasyona devam edilmiştir. Ligasyon sonunda oluşan pLA1 plazmidi (pBR325+ *L. acidophilus* kromozomal DNA fragmenti) *E. coli*'ye transforme edilmiştir.

3.2.8. *E. coli* Hücrelerinin Transformasyon İçin Hazırlanması

E. coli DH5 α suşu CaCl₂ yöntemi ile kompetent hale getirilmiştir (Hanahan, 1983).

1. Bakteri sıvı LB besi yerine ekilir ve 37°C'de 1 gece üretilir.
2. Üremiş olan kültürden %1 oranında yeni besi ortamına inokülasyon yapılır ve 37°C'de OD_{500nm}≈0.4 oluncaya kadar (~2.5 saat) üretilir.
3. İnkübatörden alınan bakteri buz üzerinde 15 dakika soğutulduktan sonra buz üzerine konan 4 adet ependorfa 1'er ml kültür sıvısı konur.
4. Bakteri 6000 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
5. Pelet üzerindeki süpernatant dökülür ve pelet 1 ml soğuk MgCl₂ (0.1 M) ile nazik bir şekilde pipetlenerek çözülür.
6. Tekrar bakteri 6000 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
7. Süpernatant dökülür ve pelet 1 ml CaCl₂ (0.1 M) ilave edilerek nazik bir şekilde pipetlenerek çözülür.
8. Hücre süspansiyonu buz üzerinde en az 20 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyondan sonra hücreler 6000 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
10. Süpernatant dökülür ve pelet 200 μ l soğuk CaCl₂ (0.1 M) ile tekrar çözülür.
11. Tüplerdeki sıvılar birleştirilir, nazikce pipetlenir ve ependorf tüplere paylaştırılarak buz üzerine konulur.

Bu işlemler sonunda bakteri ortamdaki DNA moleküllerini hücre içine alabilecek duruma gelmiştir.

3.2.9. *E. coli*'de Transformasyon

Bakteri kompetent hale getirildikten sonra ligasyon reaksiyonundan belli bir miktar alınarak pLA1 plazmidi bakteriye transforme edilmiştir (Hanahan, 1983).

1. Buz üzerinde bulunan kompetent hale getirilmiş bakteri içeren tüplere ligasyon sıvısından 5 μ l ilave edilerek dikkatli bir şekilde pipetlenir ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edilir.
2. Karışım 42°C'de 90 saniye tutulduktan sonra tekrar buz üzerine alınır.

3. Tüpteki sıvının tamamı 1ml'lik sıvı besi yerine ekilerek 37°C'de 1 saat üretilir.
4. Daha sonra 100-200 µl alınarak steril kabinde katı besi yerine (ampisilin içeren) bagetle iyice yayılır ve 1 gece 37°C'de bir gece inkübe edilir.

3.2.10. Likenaz ($\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz) Geninin pLA1 Plazmidine Takılması ve pLA1L Plazmidinin Oluşturulması

E. coli bakterisi içinde bulunan pL1Hc plazmidinin (pUC18+ $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni) izolasyonu için bakteri 50 µg/ml Ampisilin antibiyotiğini içeren sıvı LB besi yerinde 37°C'de 1 gece çalkalanarak üretilmiş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır.

İzole edilen pL1Hc plazmidinde bulunan likenaz geninin pLA1 entegrasyon vektörüne takılması için pL1Hc plazmidi HindIII ve BamHI enzimleri ile yaklaşık bir saat 37°C'de kesim reaksiyonuna alınmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. pL1Hc plazmid DNA'sı için hazırlanan kesim reaksiyonu

REAKSİYON BİLEŞENLERİNİN;		
Cinsi	Stok Konsantrasyon	Alınan Miktar
dH ₂ O	-	27,5 µl
pL1Hc plazmid DNA'sı	4 µg/µl	2.5 µl
Reaksiyon Tamponu (Universal Tampon)	10 X	4 µl
Enzim (HindIII+BamHI)	10 U/µl	1 µl HindIII+1 µl BamHI
Toplam		40µl

Kesimden sonra reaksiyon %0.8 w/v'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve yaklaşık 1,8 kb büyüklüğündeki likenaz genini içeren insört agaroz jelden arındırılmıştır (Metod 3.2.6).

Oluşturulan rekombinant pLA1 plazmidine saflaştırılan likenaz geninin takılması için pLA1 plazmidi Cam direnç geni içinde bulunan HindIII ve BamHI noktalarından kesilmiştir. (Şekil 4.1) Bu amaçla reaksiyon Çizelge 3.4'e göre hazırlanmış ve 37°C'de bir saat süreyle inkübe edilmiştir.

Daha sonra kesim reaksiyonu deproteinasyon yapılarak enzim inaktive edilmiş ve rekombinant vektör plazmid DNA etanolle çöktürülmek suretiyle saflaştırılmıştır (Metod 3.2.3).

pLA1 plazmidi ve likenaz genini taşıyan insört DNA aynı kesme enzimleri ile kesilmek suretiyle hazırlandıktan sonra bu DNA'ların ligasyonu işlemine geçilmiştir (Çizelge 3.5). Ligasyon reaksiyonu hazırlandıktan sonra 4°C'de 1 gece (yaklaşık 10 saat) inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.5. pLA1 plazmidi ve likenaz geni için hazırlanan ligasyon reaksiyonu

REAKSİYON BİLEŞENLERİNİN;		
Cinsi	Stok konsantrasyon	Alınan Miktar
dH ₂ O	-	15.5 µl
Vektör DNA (pLA1/HindIII+BamHI)	0.2 µg/µl	0.5 µl
İnsört DNA (Likenaz geni)	0.1 µg/µl	1 µl
Ligaz Tamponu	10 X	2µl
Enzim (T4 DNA Ligaz)	4 U/µl	0.5 µl
Toplam		20µl

Ligasyondan sonra oluşan pLA1L plazmidini (pLA1 plazmidi+likenzaz geni) *E. coli*'ye transforme etmek için ligasyon sıvısından belli bir miktar alınarak *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine transforme edilmiştir (Metod 3.2.8 ve 3.2.9).

3.2.11. Rekombinant pLA1L Plazmidinin *L. acidophilus* Bakterisine Elektrotransformasyon Tekniği İle Aktarılması

L. acidophilus bakterisine rekombinant pLA1L plazmidinin aktarılmasında aşağıdaki elektrotransformasyon protokolleri değiştirilerek uygulanmıştır.

3.2.11.1. *L. acidophilus* Bakterisinde Elektrotransformasyon Protokolü 1 (Wei ve ark., 1995):

1. Alıcı *Lactobacillus* suşu 16-18 saat üretildikten sonra glisin (%1 w/v) içeren sıvı MRS besi yerine steril şartlarda %2 oranında inoküle edilir.
2. Kültür OD₆₆₀ 0.2-0.3 oluncaya kadar (yaklaşık 3 saat) üretilir.

3. Kültür ortamı 10 ml'lik steril tüplere paylaşılır ve 4850 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant dökülür ve pelet iki defa soğuk yıkama solüsyonu (5mM sodyum fosfat, pH 7.4, 1mM MgCl₂) ile yıkanarak 4850 dev/dak'da santrifüjlenir.
5. Pelet orijinal hücre hacminin %1'i kadar soğuk elektrotransformasyon solüsyonu (0.9 M sükroz, 3 mM MgCl₂, pH 7.4) ile çözülerek süspansiyon haline getirilir.
6. 40 µl soğuk hücre süspansiyonu içine 5 µg plazmid DNA (maksimum 5 µl olacak şekilde) konularak karıştırılır ve en az 2 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
7. Önceden soğutulmuş 0.1 cm'lik elektrotransformasyon küvetine bu karışım konularak elektrik akımı (1250 V, 50 µF, 200 Ω) uygulanır.
8. Elektrotransformasyondan sonra hücre süspansiyonu 1 ml'lik 0.5 M sükroz içeren sıvı MRS besi yerine ekilerek 37°C'de 2-3 saat inkübe edilir.
9. İnkübasyondan sonra bu hücre süspansiyonu uygun antibiyotik (7.5 µg/ml Ampisilin) içeren 10 ml sıvı MRS besi ortamına ekilerek 48 saat daha inkübasyona devam edilir. Böylece plazmidi alan tek bir koloninin bile kaybedilmesi önlenmiş olmaktadır. Gerekirse koloniler katı besi yerine transfer edilebilir.

3.2.11.2. *L. acidophilus* Bakterisinde Elektrotransformasyon Protokolü 2 (Walker ve ark., 1996):

1. %1 glisin içeren MRS besi yerinde 15 saat üremiş hücre kültüründen %1 oranında %1 glisin içeren besi yerine inoküle edilir.
2. Bakteri OD₅₉₀ 0.25-0.30 oluncaya kadar üretildikten sonra 5 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
3. Bakteri 10 ml'lik steril tüplere alınarak 4850 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant dökülür.
4. Pelet buz üzerinde tutularak 3 defa elektrotransformasyon solüsyonu (0.1 mM HEPES, 0.5 M sükroz, pH 7.0) ile yıkanarak 4850 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir.

5. Orijinal hücre hacminin %1'i hacminde soğuk elektrotransformasyon solüsyonuyla pelet çözülür ve buz üzerinde bekletilir.
6. Hücre süspansiyonundan 40 µl alınarak 10 µg plazmid DNA (maksimum 5 µl olacak şekilde) karıştırılır ve buz üzerinde 5 dakika daha inkübe edilir.
7. Önceden soğutulmuş 0.1 cm'lik elektrotransformasyon küvetine bu karışımın tamamı konularak elektrik akımı (1250 V, 50 µF, 200 Ω) uygulanır.
8. Elektrotransformasyon küveti hemen buz üzerine alınarak 5 dakika inkübe edilir.
9. Bu hücre kültürünün tamamı 10 mM CaCl₂ ve 0.5 M sükröz içeren 10 ml sıvı MRS besi yerine transfer edilir ve 37°C'de 3 saat inkübe edilir.
10. İnkübasyondan sonra bu hücre süspansiyonunun tamamı uygun antibiyotiği (7.5 µg/ml Amp) içeren sıvı MRS besi ortamına transfer edilerek inkübasyona devam edilir. Böylece plazmidi alan tek bir koloninin bile kaybedilmesi önlenmiş olmaktadır. Gerekirse koloniler katı besi yerine transfer edilebilir.

3.2.12. Rekombinant TL1R Plazmidinin *Streptococcus thermophilus* Bakterisine Elektrotransformasyon Tekniği İle Aktarılması

Gram (+), sporsuz ve fakültatif anaerobik olan *Streptococcus thermophilus* bakterisi M17 besi yerinde (42.5 g/l), 42°C'de üretilmiştir. Katı besi yeri olarak da M17-agar (%1 w/v agar) kullanılmıştır.

Rekombinant TL1R plazmidinin (pTRW10+Likenaz geni) *Streptococcus thermophilus* FI8976 suşuna aktarılmasında aşağıdaki elektrotransformasyon protokolleri değiştirilerek uygulanmıştır.

3.2.12.1. TL1R'nin *Streptococcus thermophilus*'a Elektrotransformasyon Protokolü 1 (Slos ve ark.,1991)

1. M17 besi yerinde üretilmiş hücre kültüründen %1 oranında %1 glisin içeren besi yerine inoküle edilir.
2. Bakteri OD₆₀₀ 0.2-0.5 oluncaya kadar (yaklaşık 2-2.5 saat) üretilir.
3. Kültür steril tüplere konularak 4850 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant dökülür.

4. Pelet soğuk elektrotransformasyon solüsyonu (7 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, pH 6.0) ile iki defa yıkanarak 4850 dev/dak'da 7 dakika santrifüjlenir.
5. Pelet soğuk elektrotransformasyon solüsyonuyla başlangıçtaki hücre hacminin %1'i olacak şekilde çözülür.
6. Hücre süspansiyonundan 40 µl alınarak 5 µg plazmid DNA (maksimum 5 µl olacak şekilde) ile karıştırılır.
7. Önceden soğutulmuş 0.1 cm'lik elektrotransformasyon küvetine bu karışım konularak elektrik akımı (1250 V, 50 µF, 200 Ω) uygulanır.
8. Elektrotransformasyondan sonra bu hücre kültürünün tamamı 1 ml soğuk M17 besi yerine ekilir ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyona 37°C'de 3 saat devam edilir.
10. İnkübasyondan sonra bu hücre süspansiyonunun tamamı uygun antibiyotiği (2.5µg/ml eritromisin) içeren sıvı M17 besi ortamına ekilerek inkübasyona devam edilir. Böylece plazmidi alan tek bir koloninin bile kaybedilmesi önlenmiş olmaktadır. Gerekirse koloniler katı besi yerine transfer edilebilir.

3.2.12.2. TL1R'nin *Streptococcus thermophilus*'a Elektrotransformasyon Protokolü 2 (Wei ve ark., 1995)

L. acidophilus bakterisine gen aktarmada kullanılan elektrotransformasyon protokolü (Metod 3.2.11.1) *Streptococcus thermophilus* FI8976 suşuna TL1R plazmidinin elektrotransformasyonu için aynen kullanılmıştır. Ancak besi yeri olarak bu kez M17 besi yeri kullanılmıştır.

3.2.13. Rekombinant TL1R Plazmidinin *Lactococcus lactis* Bakterisine Elektrotransformasyon Tekniği İle Aktarılması

Gram (+), sporsuz ve anaerobik olan *Lactococcus lactis* bakterisi M17 besi yerinde (42.5 g/l) ve 37°C'de üretilmiştir. Katı besi yeri olarak da M17-agar (%1 w/v agar) kullanılmıştır.

Likenaz genini taşıyan TL1R plazmidinin *Lactococcus lactis* IL1403 suşuna aktarılmasında McIntyre ve Harlander, 1989b ve Holo ve Nes, 1989'den değiştirilen aşağıdaki elektrotransformasyon protokolü uygulanmıştır.

1. M17 sıvı besi yerinde bir gece üretilmiş olan bakteriden %1.5 oranında taze besi yeri inoküle edilir.
2. Bakteri OD₆₅₀ 1.0 oluncaya kadar (yaklaşık 8-12 saat) üretilir.
3. Kültür 10 ml'lik steril tüplere konularak 4850 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant dökülerek pelet 1 hacim soğuk deiyonize suyla iki defa yıkanarak 4850 dev/dak'da 10 dakika santrifüjlenir.
5. Pelet orijinal kültürün 1/50 hacminde elektrotransformasyon solüsyonu (0.5 M sükröz) ile süspansiyon haline getirilir.
6. Hücre süspansiyonundan 40 µl alınarak 5 µg plazmid DNA (maksimum 5 µl olacak şekilde) ile karıştırılır.
7. Önceden soğutulmuş 0.1 cm'lik elektrotransformasyon küvetine bu karışım konularak elektrik akımı (1250 V, 50 µF, 200 Ω) uygulanır.
8. Elektrotransformasyondan sonra bu hücre kültürü 0.5 M sükröz içeren 1 ml soğuk M17 besi yerine ekilir ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyona 37°C'de 2 saat devam edilir.
10. İnkübasyondan sonra bu hücre süspansiyonu uygun antibiyotiği (2.5 µg/ml eritromisin) içeren sıvı M17 besi ortamına ekilerek 2 gün inkübasyona devam edilir.

3.2.14. Elektrotransformasyon Uygulaması

Bakterilerin elektrotransformasyonunda Invitrogen elektroporator aleti üretici firma talimatlarına göre aşağıdaki şekilde kullanılmıştır:

Kompetent hale getirilmiş bakteri içerisine (40 µl) uygun miktarda DNA koyularak karışım elektroporator küvetine alınır ve küvet buz üzerine konur. Elektroporator güç kaynağının yanına kuru bir zemine yerleştirilir ve "pulse" pozisyonuna getirilir. Güç kaynağı kapalı tutularak kordonları güç kaynağına bağlanır. Elektroporatorün "armed/disarmed" düğmesi disarmed'a getirilir. Kapasitansı 50 µF, load resistansı 200 Ω'a getirilir. Güç kaynağı set düğmesi vasıtasıyla 1250 volt ve 25 mA'e ayarlanır. "Out" düğmesine basılarak elektroporatorü elektrik akımı verilir. Elektroporatorün "charge/discharge" düğmesi

charge pozisyonuna getirilir ve “charge” lambasının yanması beklenir. İçerisinde bakteri ve DNA bulunan küvetler elektroporatör aletine yerleştirilir. “Armed/disarmed” düğmesi armed pozisyonuna getirilir ve armed lambasının yanması beklenir. “Charge/pulse” düğmesi pulse’a getirilir (pulse lambası ani olarak yanıp sönmelidir). 30 saniye kadar beklenir ve küvet çıkarılarak hemen buz üzerine alınır. Bu şekilde 5 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra bakteriler uygun besi yerlerine ekilir.

3.2.15. Bakteriyel Likenaz Aktivitesinin Kalitatif Olarak Saptanması

Bakterilerin likenaz aktivitesinin tayini için Kongo-Red boyaması yapılmıştır (Teather ve Wood, 1982). Likenan (%0.1 w/v) içeren katı besi yeri üzerinde (LB, MRS veya M17) üreyen bakteriler üzerine %0.1 w/v oranında hazırlanmış Kongo-Red boyası dökülmüş, 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonundan sonra boya uzaklaştırılarak plağın üzerine 1 M NaCl solüsyonu ilave edilmiş ve 15 dakika daha beklenerek fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Kongo-Red likenanlı ortamı kırmızıya boyayacağından kırmızıya boyanan zeminde, etrafında sarı halka oluşan koloniler likenaz pozitif olarak saptanmıştır.

3.2.16. SDS-PAGE VE SDS-Likenan-PAGE Jel Elektroforezi

3.2.16.1. Hücre İçi ve Dışı Proteinlerin TCA İle Çökertilmesi ve Proteinlerin Jel İçin Hazırlanması

pL1Hc plazmidini taşıyan *E. coli* sıvı LB besi yerinde, TL1R plazmidini taşıyan *Streptococcus thermophilus* ve *Lactococcus lactis* bakterileri sıvı M17 besi yerinde bir gece üretildikten sonra bakteri kültürü 4850 dev/dak’da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre dışı sıvısı (süpernatant) tüplere alındıktan sonra geri kalan pelet 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) ile çözülmüş ve buz üzerine alınmıştır. Hücre süspansiyonu buz üzerinde iken 2 dakika süreyle (30 saniye sonikasyon, 30 saniye buzda inkübasyon) sonikasyon aletiyle (Vilsonic 300, output power %60) hücreler patlatılmıştır (Özcan, 1992). Sonikasyon sonrasında patlamış olan bakteri kültürü 4900 dev/dak’da 20 dakika santrifüjlenerek üst sıvı alınmıştır. Süpernatant ve sonikasyon sonrası sıvı üzerine eşit hacimde TCA (%20 w/v) ilave

edildikten sonra iyice homejenize edilmiş ve bir gece oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün karışım 4850 dev/dak'da 10 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürülmüş ve süpernatant döküldükten sonra pelet 15-20 dakika süreyle oda sıcaklığında kurutulmuştur. Peletin büyüklüğüne göre 50-200 µl 1 M Tris-Cl (pH 8.0) ile pelet sulandırılmıştır. Üzerine hacmin yarısı kadar kaynatma solüsyonu (1 ml %30 spacer jel solüsyonu (0.5 M Tris-HCl pH 7.6, %10 w/v SDS), 0.8 ml %25 SDS, 0.5 ml Bethamercaptoethanol, 1 ml gliserol, birkaç bromphenol blue kristali) ilave edilmiş ve homojenize edilerek kaynayan suda 3 dakika inkübe edilmiştir.

3.2.16.2. SDS-PAGE Jelin Hazırlanması

SDS-PAGE ayırıcı jel ve toplayıcı jel olmak üzere iki farklı kısımdan oluşur. Ayırıcı jel protein bantlarının moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayrıldığı ve bantlar oluşturduğu jeldir. Laemli (1970)'e göre hazırlanan jel yoğunluğu Çizelge 3.6'ya göre %12'lik ve %0.2 w/v likenan içeren SDS-Poliakrilamid jellere uygulanmıştır.

Çizelge 3.6. Ayırıcı jel için farklı poliakrilamid düzeyleri (Laemli, 1970)

Stok Solüsyon	% Poliakrilamid Jel					
Akrilamid (ml)	5	6	7	10	12	15
2 M Tris, pH 8.8 (ml)	5.62	5.62	5.62	5.62	5.62	5.62
%10 SDS (ml)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Saf su (ml)	19.10	18.10	17.10	14.10	12.10	9.10

Solüsyon hazırlandıktan sonra polimerizasyonu sağlamak için üzerine 200 µl %1'lik amonyum persülfat ve 20 µl TEMED ilave edilmiş ve daha önce hazırlanan iki cam levhadan oluşan düzenek arasındaki boşluğa pastör pipeti yardımıyla üstten 4-5 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür. Üzerine ince bir katman oluşturacak şekilde bütanol ilave edilmiş ve jelin donması için 45 dakika beklenmiştir.

Toplayıcı jel ise ayırıcı jele göre daha az yoğunlukta olup proteinleri ince bir çizgi haline getirerek ayırıcı jele birlikte girmelerini sağlamaktadır. Toplam hacim

15 ml olacak şekilde hazırlanan toplayıcı jel, Çizelge 3.7'de verilen oranlarda solüsyonların kullanılması ile hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7. Toplayıcı jelin hazırlanması için kullanılan kimyasal solüsyonlar (Laemli, 1970)

Stok Solüsyon	Kullanılan Miktar (ml)
Akrilamid	1.80
0.5 M Tris-base, pH 6.8	3.65
%10 SDS	0.15
Saf Su	9.40

Solüsyon hazırlandıktan sonra polimerizasyonu sağlamak için üzerine 100 µl %1'lik amonyum persülfat ve 10 µl TEMED ilave edilmiştir. Toplayıcı jelin üstündeki bütanol bir teksir kağıdı yardımıyla alındıktan sonra üzerine su ilave edilerek kalan bütanol de uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bir pastör pipeti yardımıyla hazırlanan ayırıcı jel solüsyonu dökülmüştür. Üstten jelin tarağı yerleştirilerek donması için 45 dakika beklenmiş, jel donduktan sonra tarak çıkarılmıştır.

3.2.16.3. Elektroforez Tankının Hazırlanması

Jelin donması esnasında elektroforez tankı hazırlanmıştır. Elektroforez tankının yarısına kadar elektrot solüsyonu (0.05 M Glisin, 0.05 M Tris, %0.1 SDS) konulmuş ve jel donduktan sonra cam levhalar kısa olanı iç tarafa gelecek şekilde, diğer iki levha da eğer jel için kullanılmıyor ise uzun olanı iç tarafa gelecek şekilde tanka yerleştirilmiştir. Daha sonra iki levha arasında kalan boşluğa jelin üzerindeki tarağın açtığı kuyuları da örtecek şekilde elektrot solüsyonu ilave edilmiştir.

3.2.16.4. Elektroforez Aletinin Çalıştırılması

Üç dakika süreyle inkübe edilen protein örnekleri kuyulara yerleştirilerek elektroforez tankının kapağı kapatılmış ve birer uçları güç kaynağına bağlı olan kabloların diğer uçları da elektroforez tankına bağlanmıştır. Güç kaynağı, proteinler toplayıcı jelde ilerlerken 25 mA ve 100 V'da, ayırıcı jelde ilerlerken 60 mA ve 100 V'da çalıştırılmıştır. Çift jel kullanıldığında ise güç kaynağı toplayıcı jelde 60 mA ve 100 V, ayırıcı jelde 100 mA ve 200 V'da çalıştırılmıştır.

3.2.16.5. Toplam Proteinlerin Jellerde Belirlenmesi

Proteinler jelin sonuna geldikten sonra güç kaynağından gelen elektrik akımı kesilerek cam levhalar jele zarar vermeden çıkarılmıştır. Arasında jel bulunan iki cam dikkatlice birbirinden ayrılarak jel bir kabın içerisine konulmuş ve üzerine örtecek kadar boya (%0.25 w/v Coomassie Blue, %50 v/v metanol, %10 v/v glasiyal asetik asit) ilave edilerek jel bu boyada 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında jel elde hafifçe sallanarak jelin boyayı iyice alması sağlanmıştır. Jel boyama solüsyonundan alınarak yıkama solüsyonu (%7 v/v glasiyal asetik asit, %5 v/v metanol) içerisine konulmuş ve bir gece hafifçe çalkalanmaya bırakılmıştır.

3.2.16.6. SDS-Likenan-Page Jelde Likenaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Likenaz aktivitesinin belirlenmesi için SDS-PAGE jele son konsantrasyonu %0.2 olacak şekilde daha önceden otoklavlanarak hazırlanan %2'lik likenandan 3 ml eklenerek SDS-Likenan-PAGE jel hazırlanmıştır. Proteinler jelde yürütüldükten sonra likenaz enziminin aktifleşmesi için jel renatürasyon solüsyonu (50 mM NaH_2PO_4 ve 50 mM Na_2HPO_4 karıştırılarak pH 6.5'a ayarlanmış, %20 izopropanol alkol) ile 1 saat çalkalanarak SDS'in uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra jel tekrar sodyum fosfat solüsyonuyla (50 mM NaH_2PO_4 ve 50 mM Na_2HPO_4 karıştırılarak pH 6.5'a ayarlanmış, buna 5 mM beta-merkapt etanol ve 1 mM EDTA ilave edilmiştir) muamele edilerek +4°C'de 1 gece tutulmuştur. Ertesi gün jel bu solüsyondan beta-merkapt etanol ve EDTA içermeyen sodyum fosfat solüsyonuna alınarak +4°C'de 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Jel sodyum fosfat solüsyonundan çıkarılarak sıvı kaybını önlemek üzere streç filme iyice sarılmış ve 4-5 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda jel Kongo-Red boyama solüsyonuyla (%2 Kongo-Red, 5 mM NaOH) yaklaşık 1 saat boyanmıştır. Daha sonra jel boyama solüsyonundan alınarak 1 M NaCl ve 5 mM NaOH ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmıştır. Bütün jel kırmızıya boyandığı halde etrafı boyanmayarak sarı renkte kalan likenaz enziminden sorumlu bant ortaya çıkmıştır.

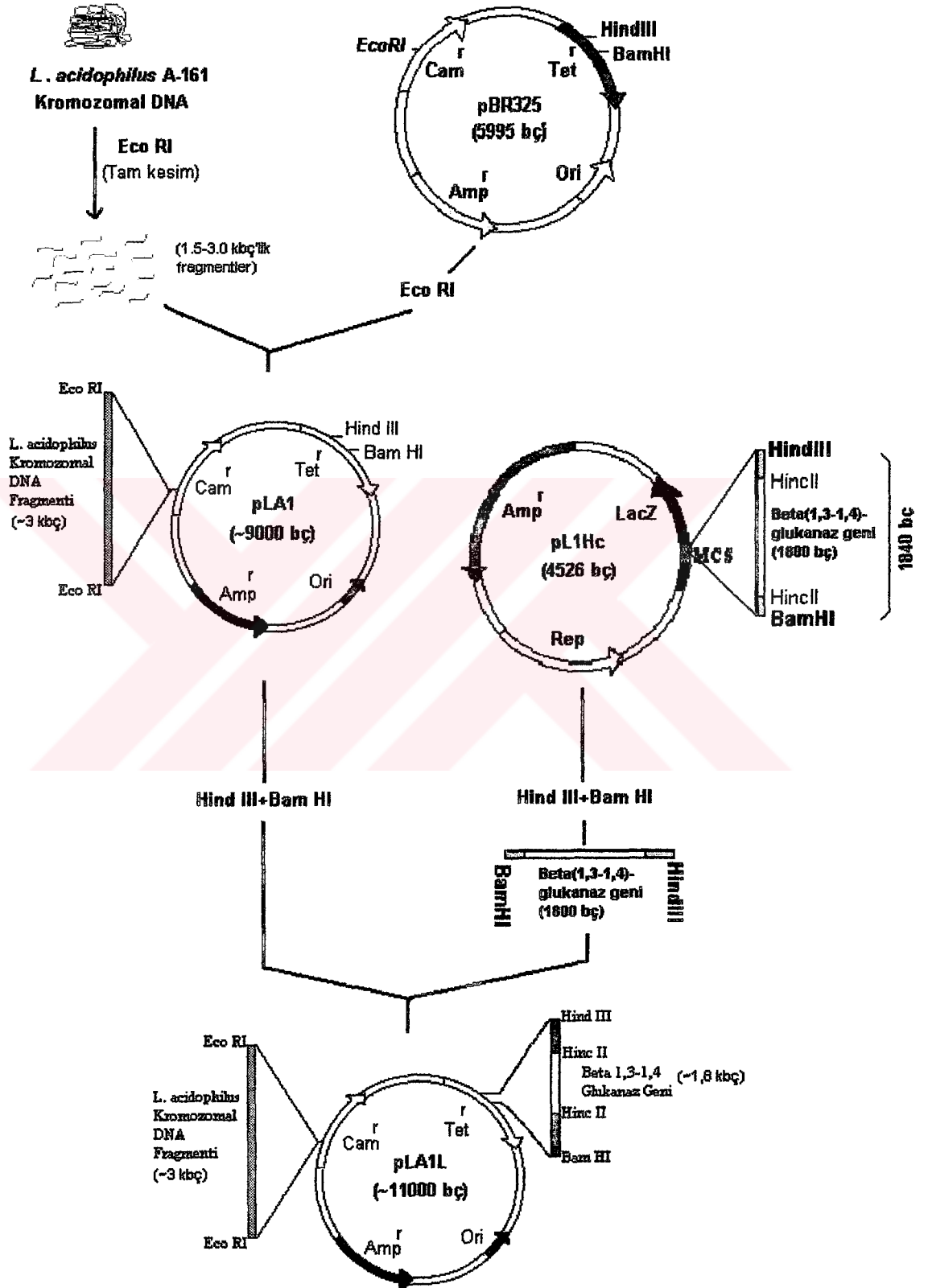
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. *Lactobacillus acidophilus* Kromozomal Entegrasyon Vektörünün (pLA1L) Oluşturulması

Bir *E. coli* replikatif vektörü olan ve yapısında üç farklı antibiyotik direnç geni (Cam^{rt} , Amp^{rt} , Tet^{rt}) taşıyan pBR325 plazmidi *L. acidophilus* için entegrasyon vektörü geliştirmede uygun bir vektör olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla pBR325 plazmidinin Cam^r geni içerisine *L. acidophilus*'un kromozomuna entegrasyon sağlamak amacıyla *L. acidophilus*'un kromozomuna ait yaklaşık 3 kb büyüklüğündeki EcoRI-EcoRI fragmenti, Tet^r geni içerisine de yaklaşık 1,8 kb büyüklüğündeki *S. bovis* JB1'e ait likenaz ($\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz) genini taşıyan HindIII-BamHI insörtü takılmıştır. Geriye kalan Amp^r geninin de *L. acidophilus*'a bu vektörün transformasyonunda marker olarak kullanılması düşünülmüştür. (Şekil 4.1)

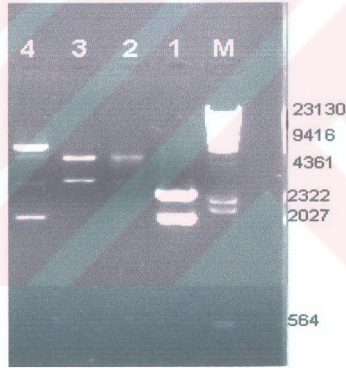
L. acidophilus A-161 suşundan kromozomal DNA izole edildikten sonra EcoRI enzimi ile tam (complete) kesime tabi tutulmuştur. %0.4 w/v'lik agaroz jelden saflaştırılan yaklaşık 3 kb büyüklüğündeki *L. acidophilus* A-161 suşuna ait kromozomal DNA fragmentleri ile yine EcoRI enzimi ile Cam^r geni içerisinden kesilen pBR325 plazmidinin ligasyonu yapılarak pLA1 vektör plazmidi oluşturulmuştur. (Şekil 4.1) pLA1'in oluşturulmasının nedeni yapısındaki 3 kb büyüklüğündeki *L. acidophilus*'a ait kromozomal DNA parçasının bu bakteri genomuyla homolog bölge oluşturarak entegrasyonun sağlanmasıdır.



Şekil 4.1: pLA1L plazmidinin oluşturulması

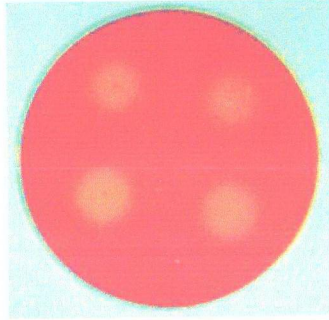
pLA1 plazmidini taşıyan *E. coli* kolonilerinin seçimi için ligasyon sıvısı *E. coli* DH5 α suşuna CaCl₂ metoduna göre transforme edilmiştir. Transformantlar önce 50 μ g/ml Ampisilin ve 12.5 μ g/ml Tetrasiklin antibiyotiklerini içeren LB-Agar besi yerinde üretilmiştir. Bu besi yerinde üreyen Amp⁺ ve Tet⁺ koloniler daha sonra 30 μ g/ml Kloramfenikol içeren LB-Agar besi yerine transfer edilerek Cam^r fenotipte olan koloniler pLA1 plazmidini alan rekombinant koloniler olarak seçilmiştir.

Elde edilen pLA1 vektör plazmidinin EcoRI enzimi ile kesilmesi sonucunda agaroz jelde; beklenildiği gibi biri 6 kb büyüklüğündeki pBR325 vektör DNA'sı (geride kalan bant) ve diğeri yaklaşık 3 kb büyüklüğündeki *L. acidophilus* A-161 suşuna ait kromozomal DNA fragmenti (öndeki bant) olmak üzere iki bant oluşmuştur. (Şekil 4.2-Sütun 3)



Şekil 4.2. Değişik enzimlerle kesilmiş pL1Hc, pBR325, pLA1 ve pLA1L entegrasyon plazmid vektörünün agaroz jelde görüntüsü
M: λ DNA/HindIII marker **1.:** pL1Hc/HindIII+BamHI kesimi **2.:** pBR325/EcoRI kesimi **3.:** pLA1/EcoRI kesimi **4.:** pLA1L/HindIII+BamHI kesimi

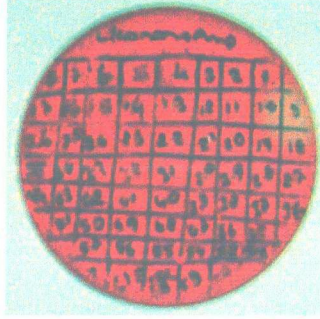
pUC18 plazmidini üzerinde *S. bovis* JB1 orijinli likenaz genini taşıyan pL1Hc plazmidini içeren *E. coli* kolonileri öncelikle likenaz enzim aktivitesi bakımından içerisinde likenan bulunan katı LB ortamında Kongo-Red boyaması ile test edilmiştir. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. *E. coli*/pL1Hc'nin likenanlı plaklarda Kongo-Red boyaması sonuçları

Bu kolonilerden izole edilen pL1Hc (pUC18+Likenaz geni) plazmidi HindIII ve BamHI enzimleri ile kesildikten sonra %0.8 w/v'lik agaroz jelde birisi 2686 bp büyüklüğünde pUC18 vektör DNA'sı (geride kalan bant) diğeri de 1840 bp büyüklüğünde olan likenaz gen insörtüne (öndeki bant) ayrıştırılmıştır. (Şekil 4.2-Sütun 1) Agaroz jelden saflaştırılan likenaz aktivitesinden sorumlu olan 1840 bp büyüklüğündeki HindIII-BamHI insörtünün yine aynı enzimlerle (HindIII-BamHI) Tet^r geni içerisinde kesilen pLA1 vektörüne ligasyonu yapılarak pLA1L plazmidi oluşturulmuştur. (Şekil 4.1)

pLA1L plazmidini alan *E. coli* kolonilerinin seçimi amacıyla ligasyon sıvısı *E. coli* DH5 α suşuna CaCl₂ metoduna göre transforme edilmiştir. pLA1L plazmidini alan transformant bakteriler önce katı LB-Amp besi yerinde üretilmiş sonra likenaz enzim aktivitesini test amacıyla da LB-Likenan-Agar plaklarına transfer edilmişlerdir. Likenaz aktivitesine sahip pLA1L plazmidini taşıyan koloniler Kongo-Red boyamasıyla belirlenmişlerdir. (Şekil 4.4)



Şekil 4.4. *E. coli* içerisindeki pLA1L plazmidinin likenanlı besi yerinde likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

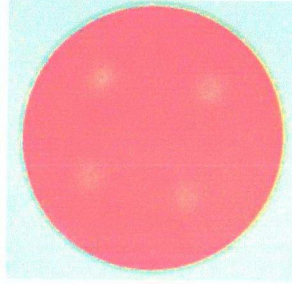
Bu kolonilerden çıkarılan pLA1L plazmidi HindIII ve BamHI enzimleriyle kesilip %0.8 w/v'lik agaroz jelde incelendiğinde beklenildiği gibi biri yaklaşık 9 kb büyüklüğünde olan pLA1 plazmidi (geride kalan bant) ile diğeri 1840 bp büyüklüğündeki likenaz gen insörtü (öndeki bant) olmak üzere iki adet DNA bandı gözlenmiştir. (Şekil 4.2-Sütun 4)

4.1.2. Rekombinant pLA1L Plazmidinin *Lactobacillus acidophilus*'a Aktarılması

Rekombinant pLA1L plazmidinin *L. acidophilus*'a aktarılmasında değişik elektrotransformasyon protokolleri (Metod 3.2.11.1 ve 3.2.11.2) uygulanmıştır. Plazmidi alan tek bir koloninin bile kaybedilmemesi için elektrotransformasyon sonrasında 37°C'de 2-3 saat üretilen hücre kültürü 7.5µg/ml ampisilin içeren sıvı ve katı MRS besi ortamına ekilerek 48 saat inkübe edilmiştir. Ancak yapılan transformasyonlar sonunda antibiyotik içeren sıvı ve katı besi yerlerinde bakteri gelişimi gözlenmemiştir.

4.1.3. *Streptococcus thermophilus* Bakterisine Likenaz Geninin Aktarılması

Likenaz genini ($\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz) içeren TL1R plazmidini (pTRW10+likenz gen) taşıyan *E. coli* bakterisinin likenanlı (%0.1 w/v) katı M17 besi yerinde Kongo-Red boyamasıyla likenaz aktivitesi test edilmiş ve bu kolonilerin likenaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. *E. coli*/ TL1R'nin likenanlı plaklarda Kongo-Red boyaması sonuçları

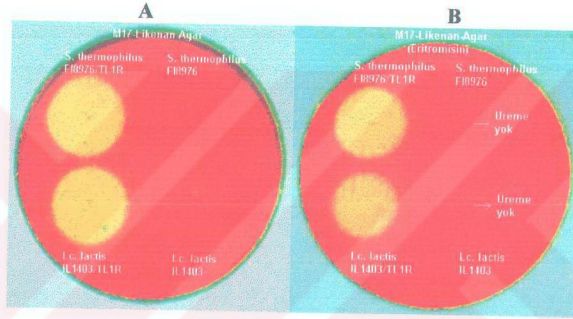
Likenaz enzim aktivitesi gösteren bakteriden TL1R plazmidinin izolasyonu yapıldıktan sonra *S. thermophilus* FI8976 suşuna aktarılmasında değişik elektrotransformasyon protokolleri (Metod 3.2.12.1 ve 3.2.12.2) uygulanmıştır. İlk elektrotransformasyon protokolünün (Metod 3.2.12.1) uygulanmasından sonra 2.5 µg/ml eritromisin antibiyotiğini içeren sıvı besi yerinde bakteri gelişimi gözlenmezken *L. acidophilus* bakterilerine gen transferinde kullanılan elektrotransformasyon protokolü (Metod 3.2.11.1) ve besi yeri olarak da M17 kullanıldığında *S. thermophilus* bakterisine elektrotransformasyonu sonrasında aynı miktarda eritromisin antibiyotiği (TL1R plazmidi üzerinde eritromisin direnç geni bulunduğundan) içeren besi yerinde bakteri gelişimi gözlenmiştir.

Daha sonra üreyen rekombinant (*S. thermophilus* FI8976/TL1R) ve orijinal (*S. thermophilus* FI8976) bakteriler M17-Agar ve M17-Agar-Eritromisin besi yerine transfer edilmişlerdir. Orijinal ve rekombinant bakteriler antibiyotiksiz katı besi yerinde ürerlerken eritromisinli katı besi yerinde yalnız rekombinant bakterilerde üreme gözlenmiştir. (Şekil 4.6. A, B) Bu da *S. thermophilus* FI8976 bakterisine TL1R plazmidinin aktarıldığını doğrulamıştır.

Aynı rekombinant bakterilerin likenaz aktivitesi taşıdığıının tespiti için ise, likenan içeren (%0.1 w/v) katı M17 besi yerine orijinal (kontrol) ve rekombinant bakteriler transfer edilmişlerdir. Kongo-Red boyaması sonucunda sadece rekombinant bakterilerin likenaz aktivitesi gösterip zon oluşturduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.6.A)

Aynı işlem eritromisin antibiyotigi içeren M17-Likenan-Agar besiyerinde tekrarlanmış ve yalnızca *S. thermophilus* FI8976/TL1R'nin bu besiyerinde üreyip likenaz enzimi salgıladığı gözlenmiştir. (Şekil 4.6.B)

Bu sonuçlar bize yapısında eritromisin direnç geni taşıyan TL1R plazmidinin *S. thermophilus* FI8976 bakterisinde başarılı bir şekilde replike olduğunu ve bu plazmid üzerinde bulunan *S. bovis* JB1 orijinli likenaz geninin de bu bakterilerce eksprese edilerek üretildiğini göstermiştir.



Şekil 4.6. A: M17-Likenan-Agar besiyerinde üreyen rekombinant (*S. thermophilus* FI8976/TL1R ve *L. lactis* IL1403/TL1R) ve orijinal suşların (*S. thermophilus* FI8976 ve *L. lactis* IL1403) Kongo-Red boyaması ile likenaz aktivitesinin belirlenmesi, **B:** M17-likenan-Agar-Eritromisin besiyerinde üreyen rekombinant suşların Kongo-Red boyaması ile likenaz aktivitesinin belirlenmesi

4.1.4. *Lactococcus lactis* Bakterisine Likenaz Geninin Aktarılması

L. lactis IL1403 suşuna Likenaz genini içeren TL1R plazmidinin aktarılmasında verilen elektrotransfeksiyon protokolü (Metod 3.2.13) uygulanmıştır. Elektrotransfeksiyon sonrasında 2.5 µg/ml eritromisin antibiyotigi içeren sıvı besiyerinde üreme gözlenmiştir.

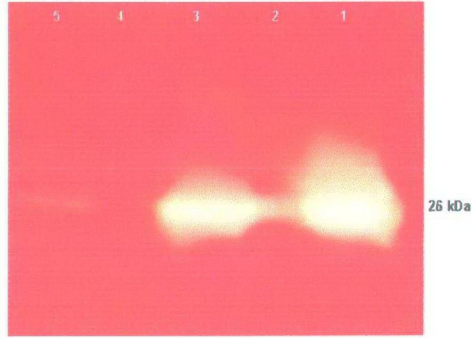
Rekombinant (*L. lactis* IL1403/TL1R) ve orijinal (*L. lactis* IL1403) bakteriler antibiyotiksiz katı M17 besiyerinde ürerlerken eritromisin antibiyotigi içeren besiyerinde sadece bu antibiyotige dirençli olan rekombinant bakteriler üremişlerdir.

Rekombinant bakteride likenaz aktivitesinin tespiti için yine eritromisin antibiyotigi içeren veya içermeyen likenanlı katı M17 besi yerlerinde Kongo-Red boyaması yapılmıştır. Rekombinant bakteride likenaz aktivitesi gözlenirken orijinal sušta aktivite görülmemiştir. (Şekil 4.6.A ve B) Yine orijinal bakteriler eritromisinli besi yerinde üremezken rekombinantlar üremişlerdir.

Bu sonuçlar da TL1R plazmidinin elektrotransfomasyonla *L. lactis* IL1403 suşuna aktarıldığının ve taşıdığı *S. bovis* JB1 orijinli Likenaz geninin bu bakterice eksprese edilerek üretildiğinin açık bir kanıtı olmuştur.

4.1.5. Rekombinant Bakterilerin SDS-Likenan-PAGE’de Likenaz Aktivitesi Tayini ve SDS-PAGE’de Toplam Proteinleri Bakımından İncelenmesi

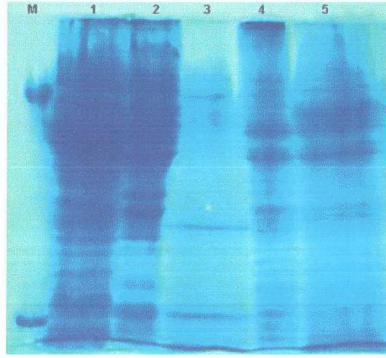
E. coli/pL1Hc sonikasyon proteinleri, *S. thermophilus* FI8976/TL1R sonikasyon ve süpernatant proteinleri ile *L. lactis* IL1403/TL1R sonikasyon ve süpernatant proteinleri SDS-Likenan-PAGE’de likenaz enzim aktiviteleri bakımından karşılaştırılmışlardır. *E. coli*/pL1Hc sonikasyon sıvısına ait likenaz bantı (26 kDa) ile *S. thermophilus* FI8976/TL1R sonikasyon ve süpernatant sıvısında gözlenen likenaz bantlarının SDS-Likenan-PAGE’de aynı moleküler ağırlığa sahip olduğunun görülmesi (aynı hizada bulunması); likenaz enziminin *S. thermophilus*’da hücre içi ve hücre dışı (süpernatant) ortamında bir proteolitik parçalanmaya maruz kalmadan aktivitesini koruduğunu göstermiştir. (Şekil 4.7) Ayrıca jele kontrol amaçlı olarak koyulan *L. lactis* IL1403/TL1R bakterisinin süpernatantında da yine bir proteolitik parçalanma olmadan diğer bakterilerdeki (*E. coli* ve *S. thermophilus*) likenaz bantı ile aynı seviyede bir moleküler ağırlığa sahip likenaz aktivitesi gözlenmiştir. *L. lactis* IL1403/TL1R sonikasyon ürününde likenaz bantının gözlenmemesi ise sonikasyon sıvısındaki enzim aktivitesinin az olmasının yanısıra bizim görüntüleme sistemimizin yetersizliğinin de bir sonucu olmuştur.



Şekil 4.7. Değişik bakterilerin SDS-Likenan-PAGE’de likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması

1: *E. coli*/pL1Hc bakterisinin sonikasyon proteinleri, **2:** *S. thermophilus* FI8976/TL1R bakterisinin sonikasyon proteinleri, **3:** *S. thermophilus* FI8976/TL1R bakterisinin süpernatant proteinleri, **4:** *L. lactis* IL1403/TL1R bakterisinin sonikasyon proteinleri, **5:** *L. lactis* IL1403/TL1R bakterisinin süpernatant proteinleri

Ayrıca aynı örnekler (*E. coli*/pL1Hc sonikasyon proteinleri, *S. thermophilus* FI8976/TL1R sonikasyon ve süpernatant proteinleri ve *L. lactis* IL1403/TL1R sonikasyon ve süpernatant proteinleri) SDS-PAGE’de toplam protein profilleri bakımından da incelenmiştir. (Şekil 4.8) Fakat bu jelde karşılaştırılan aynı bakterilere ait sonikasyon sıvısı ve süpernatantlarda belirgin likenaz aktivitesinden sorumlu bir protein bandına rastlanmamıştır.



Şekil 4.8. Değişik bakterilere ait protein profillerinin SDS-PAGE’de karşılaştırılması
1: *E. coli*/pL1Hc bakterisinin sonikasyon proteinleri, 2: *S. thermophilus* FI8976/TL1R bakterisinin sonikasyon proteinleri, 3: *S. thermophilus* FI8976/TL1R bakterisinin süpernatant proteinleri, 4: *L. lactis* IL1403/TL1R bakterisinin sonikasyon proteinleri, 5: *L. lactis* IL1403/TL1R bakterisinin süpernatant proteinleri

Sonuç olarak bu çalışma; *L. lactis* IL2661/TL1R suşuna ait likenaz aktivitesinin 26 kDa büyüklüğünde olduğunu bildirilmesi (Ekinci, 1997b) ve SDS-Likenan-PAGE jelde *S. thermophilus* FI8976/TL1R suşuna ait süpernatant ve sonikasyon sıvısında gözlenen likenaz aktivitesi ile *L. lactis* IL2661’e son derece benzer olan kontrol olarak kullandığımız *L. lactis* IL1403/TL1R suşuna ait likenaz aktivitesinin aynı moleküler büyüklükte (26 kDa) olduğunu göstermiştir. Bu enzimin yeni suşta bir proteolitik parçalanmaya maruz kalmamasının doğal bir sonucudur.

4.2. Tartışma

Arpa gibi β -glukan'ı yüksek yemlerin kanatlılar tarafından sindirimini kolaylaştırmak amacıyla bir bağırsak bakterisi olan *L. acidophilus* A-161 suşuna bir rumen bakterisi olan *S. bovis* JB1 suşuna ait karışık bağlı (mixed-linkage) $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (likenaz) genini aktarmak ve bu enzimi kanatlı bağırsağında üretecek bir probiyotik bakterinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Replikatif plazmidler tarafından kodlanan özelliklerin antibiyotik gibi selektif basınç uygulamama durumunda kararlı olmaması ve bakterilerin genelde bu plazmidleri kaybetmesi nedeniyle bu genin bir entegratif vektör yardımıyla bakteri kromozomuna entegre edilmesi en uygun yol olarak bildirilmiştir (Posno ve ark., 1991; Lin ve ark., 1996). Biz de bu çalışmada bir *E. coli* vektörü olan pBR325'e *L. acidophilus*'un kromozomuna homolog rekombinasyon sağlayabilmek amacıyla *L. acidophilus*'un kromozomuna ait 3 kb'lık EcoRI-EcoRI DNA parçasını Cam^r geni içerisine takarak pLA1 entegratif plazmidini oluşturduk. (Şekil 4.1) Daha sonra Ekinci ve ark. (1997a) tarafından bir *E. coli* vektörü olan pUC18'de klonlanan *S. bovis* JB1 orijinli 1,8 kb'lık likenaz geni, oluşturulan bu plazmidten (pL1Hc) HindIII-BamHI enzimleriyle kesilip pLA1 vektörünün Tet^r geni içerisine takılarak rekombinant pLA1L vektörü geliştirildi. (Şekil 4.1)

Aynı amaçla, Lin ve ark. (1996), *L. acidophilus* ADH için bir *E. coli* vektörü olan pBluescript II SK+ plazmidine bu bakteriden 1,9 kb büyüklüğünde HindIII-HindIII kromozomal DNA parçası takarak bir entegrasyon vektörü oluşturmuşlardır. *L. bulgaricus*'a ait β -galaktosidaz geni 1,9 kb'lık bu DNA parçası içerisine Saul bölgesine yerleştirilerek *L. acidophilus* ADH'nin kromozomuna çift nokta rekombinasyonu (replacement rekombinasyon) ile aktarılmış ve vektörün (pBluescriptII SK+) kromozoma entegre olmaması sağlanmıştır. Yine Scheirlnck ve ark. (1989), *B. stearothermophilus* bakterisine ait α -amilaz ve *Clostridium thermocellum*'a ait β -glukanaz genini *L. plantarum* 80'nin kromozomuna homolog rekombinasyon (tek nokta) yolu ile vektörle birlikte aktarmışlardır.

pLA1L plazmidinin elektrotransfeksiyonla *L. acidophilus* A-161 suşuna transfeksiyonu olayında ise herhangi bir entegrasyon olayı gerçekleşmemiştir. Elektrotransfeksiyon etkinliği aynı bakterinin değişik suşlarına göre farklı

olabileceği gibi (O'sullivan ve Fitzgerald, 1999), kullanılan solüsyonlar, plazmidler ve bakterilerin penisilin, lizozim, glisin gibi kimyasallarla muamelesi ile elektrotransformasyon parametreleri (akım, Ω) de bunda etkili olduğu düşünülmektedir (Wei ve ark., 1995).

Ayrıca, entegratif plazmidlerin, replikatif plazmidlere oranla transformant bakteri oluşturma etkenliği de en az 100 kat daha düşüktür (Özcan, 2001). pLA1L plazmidini alan herhangi bir *L. acidophilus* bakterisine rastlanmamasının bir nedeni de muhtemelen bu durumdur. *L. acidophilus* A-161 suşunda replike olabilen bir replikasyon vektörü ile elektrotransformasyon şartlarının yeniden optimize edilmesi ve bu yeni şartlarda pLA1L plazmidinin transformasyonunun denemesi gerekecektir.

Pelet yemlere katılmak üzere sıcaklığa dirençli probiyotik geliştirme çabalarımızın diğer bir sonucu olarak; Ekinci ve ark. (1997a) tarafından pTRW10'da (*E. coli* / *Streptococcus* mekik vektörü) klonlanan rumen orijinli *S. bovis* JB1 bakterisine ait $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geni burada ilk kez *S. thermophilus* FI8976 suşuna aktararak Likenaz enziminin bu bakterice üretimi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan bu rekombinant probiyotik bakterinin kanatlı bağırsağında kolonize olmayacağı fakat arpa içeren kanatlı pelet yemlerine katılması durumunda; peletleme sıcaklığı olan 70-90°C'ye varan sıcaklıktan etkilenmeden varlığını koruyacağı ve kanatlı sindirim sistemine bir miktar enzim salgılayacağı düşünülmektedir. Ya da peletleme öncesi bakteri sitoplazmasında bulunan ve sonikasyonla elde edilebilen $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enziminin peletleme sonrasında sitoplazmada korunacağı ve tavuk bağırsaklarında bakterilerin sindirim enzimleriyle parçalanması ile ortama yayılarak β -glukanları parçalayacağı tahmin edilmektedir. Çünkü *S. thermophilus* FI8976/TL1R suşunun $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzimini büyük ölçüde dışarı salgılamasına rağmen önemli miktarda sitoplazmasında bulundurduğu hücrelerin sonikatörle parçalanıp SDS-Likenan-PAGE jellerde incelenmesiyle ortaya çıkarılmıştır. (Şekil 4.7-Sütun 2)

S. thermophilus FI8976/TL1R suşuna ait $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz aktivitesinin SDS-Likenan-PAGE jellerde *E. coli*/pL1Hc ve *L. lactis* IL1403/TL1R ile

karşılaştırılması sonucu aynı moleküler ağırlıkta (26 kDa) olduğu ve hücrelerin *E. coli* ve *L. lactis* IL1403 bakterilerinde olduğu gibi herhangi bir proteolitik parçalanmaya maruz kalmadığının en önemli göstergesi olmuştur. (Şekil 4.7) Çünkü Ekinci ve ark. (1997a) TL1R plazmidini *L. lactis* IL1403'ün çok yakın genetik benzeri olan *L. lactis* IL2661'e aktararak eksprese etmişler ve SDS-Likenan-PAGE jellerde bu enzimin moleküler ağırlığını 26 kDa olarak belirlemişlerdir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. *L. acidophilus* A-161 suşunun kromozomuna homolog rekombinasyonla entegre olacak $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) geni taşıyan bir vektör (pLA1L) geliştirilmiştir: 3 kb büyüklüğündeki *L. acidophilus* A-161 suşuna ait EcoRI-EcoRI kromozomal DNA fragmenti aynı enzimle kesilen *E. coli* pBR325 plazmidinin Cam^r geni içerisine yerleştirilerek önce pLA1 entegrasyon vektörü oluşturulmuş, sonra da bu vektörün Tet^r geni içerisine *S. bovis* orijinli $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz (Likenaz) geni taşıyan HindIII-BamHI DNA fragmenti takılarak pLA1L plazmidi geliştirilmiştir. Fakat pLA1L plazmidi elektrotransformasyonla *L. acidophilus* A-161 bakterisinin kromozomuna entegre edilememiştir.
2. *S. bovis* JB1'den *E. coli*/Streptococcus mekik vektörü olan pTRW10'a klonlanarak oluşturulan $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz genini taşıyan TL1R vektörü (Ekinci ve ark., 1997a) ilk kez *S. thermophilus* FI8976 suşuna aktarılarak bu bakterice $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enziminin üretimi sağlanmıştır.
3. TL1R plazmidi *L. lactis* IL1403 bakterisine aktarılarak üretilen $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enzimi *S. thermophilus* FI8976/TL1R bakterisinden elde edilen enzimle karşılaştırılmış ve sonuçta bu enzimin 26 kDa moleküler ağırlıkta olduğu ve *S. thermophilus* FI8976'da proteolitik bir parçalanmaya maruz kalmadığı bulunmuştur.

5.2. Öneriler

1. pLA1L plazmidinin *L. acidophilus* A-161 bakterisine aktarılması için bu bakteriye ait bir replikatif plazmid bulunarak elektrotransformasyon parametrelerinin optimize edilmesi ve bu yeni şartlarda pLA1L plazmidinin *L. acidophilus* A-161 suşuna elektrotransformasyonunun araştırılması gerekmektedir.
2. *S. thermophilus* FI8976/TL1R bakterisine ait sitoplazmik $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz enziminin bakterilerin 70-90°C sıcaklıkta değişik sürelerde inkübasyonu sonrasında sonikasyonla hücrelerin parçalanması sonrasında aktivitesinin tayin

edilmesi ve enzimin hücre içinde peletleme sıcaklığından etkilenip etkilenmediğinin araştırılması yerinde olacaktır.

3. $\beta(1,3-1,4)$ -glukanaz geninin ekmeek mayası *Saccharomyces cerevisiae*'ye aktarılarak oluşturulacak rekombinant mayanın arpa içeren kanatlı yemlerine doğrudan katılmasının yararlılığının araştırılması ve aynı mayanın biracılık sanayi için potansiyelinin test edilmesi önerilebilir.

KAYNAKLAR

- ABDULRAHIM, S.M., HADDADIN, M.S.Y., HASHIAMOUN, F.A.R. and ROBINSON, R.R., 1996. The influence of *L. acidophilus* and bacitracin on layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. *British Poultry Science*, 37:341-346.
- AKSOY, T., POLAT, C., AKYÜREK, H., AND ŞENKÖYLÜ, N., 1995. Effect of enzyme supplementation to wheat and barley diets on performance of young broilers. *Proceedings of 10th European Symposium on Poultry Nutrition*, 15-19 October 1995, Antalya-Turkey, s.362-363.
- ALMIRALL, M., FRANCESH, M., PEREZ-VENDRELL, A.H., BRUFAU, J. and ESTEVE-GARCIA, E., 1995. The differences in intestinal viscosity produced by barley and β -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. *J. Nutr.*, 125:947-955.
- ANONYMOUS, 1987. Karma Yemlerde Enzim Kullanımı. *Poultry Yutav'99*, Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı, 3-6 Haziran 1999, İstanbul-Türkiye.
- ANONYMOUS, 1999a. Animal Health Forum. Highlights Antibiotics and Agricultural Use of Antibiotics-Where We Are Going. <http://www.agric.gov.ab.ca/livestock/ahforum/v4mar99f.html>.
- ANONYMOUS, 1999b. Yem Bülteni. *Türkiyem-bir aylık bülteni*, Sayı:17.
- ARENDS, L.G., 1981. Influence of *L. acidophilus* administered via the drinking water on broiler performance. *Poultry Science*, 60:1617.
- AYTUĞ, C.N., 1989. Probiyotikler ve Yoğurt. *Animalia*, 22:13-15.
- BANG, M.L., VILLADSEN, L., SANDAL, T., 1999. Cloning and Characterization of an Endo- β -1,3(4)Glucanase and an Aspartic Protease from *Phaffia rhodozyma* cbs 6938. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 51(2):215-222.
- BATES, E.E.M., GILBERT, H.J., HAZLEWOOD, G.P., HUCKLE, J., LAURIE, J.I., and MANN, S.P., 1989. Expression of a *Clostridium thermocellum* Endoglucanase Gene in *Lactobacillus plantarum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, s.2095-2097.

- BEDFORD, M., 1991. Digestive Constraints in Feed Ingredients and Theoretical Opportunities for Supplementary Enzymes European Feed Enzyme Seminar, Finnfeeds International Ltd.Redhill, U.K..
- BIRNBOIM, H.C., and DOLY, J., 1979. Nucl. Acid Res., 7:1513-1523.
- BORRIS, R., ZEMEK, 1980. Beta 1,3-1,4-Glucanase in Sporeforming Microorganisms. Zentralbl. Bacterio. (Naturwiss), 135(8):696-703.
- BORRIS, R., ZEMEK, J., 1981. Zentralbl. Bacterio. (Naturwiss), 136:63-69.
- BORRIS, R., MANTEUFFEL, R., HOFEMEISTER, J., 1988. J. Basic Microbiol., 28:3-10.
- BORRIS, R., BUETTNER, K., MAENTSACLAC, P., 1990. Structure of the Beta-1,3-1,4-Glucanase Gene of *Bacillus macerans*: homologies to other beta-glucanases. Mol. Gen. Genet., 222:178-283.
- BROZ, J. and FRIGG, M., 1986. Effects of β -glucanase on the Feeding Value of Broiler Diets Based on Barley or Oats. Arch. Geflügelk, 50(1):41-47.
- BROZ, J. and FRIGG, M., 1990. Influence of *Trichoderma viride* enzyme complex on nutritive value of barley and oats for broiler chickens. Arch. Geflügelk 54 (1):34-37.
- BUENO, A., VAZQUEZ DE ALDANA, C.R., CORREA, J., DEL REY, F., 1990a. Nucleic Acids Res., 18:4248.
- BUENO, A., VAZQUEZ DE ALDANA, C.R., CORREA, J., VILLA, T.G., DEL REY, F., 1990b. J. Bacterio., 172: 2160-2167.
- CANOĞULLARI, S., ve OKAN, F., 1995. YUTAV Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı Bildirileri, 24-27 Mayıs, İstanbul-Türkiye, s.552-561.
- CANTWELL, B.A., McCONNELL, M.J., 1983. Gene, 23:211-219.
- CANTWELL, B.A., BRAZIL, G., MURPHY, N., McCONNELL, D.J., 1986. Comparison of Expression of the endo-beta-1,3-1,4-Glucanase Gene From *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae* from the CYC1 and ADH1 Promoters. Curr. Genet., 11(1):65-70.
- CHATEAU, N., CASTELLANOS, I., and DESCHAMPS, A.M., 1993. distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. Journal of Applied Bacteriology, 74:36-40.

- CHEN, H., LI, X.L., LJUNGDAHL, L.G., 1997. Sequencing of a 1,3-1,4-Beta-D-glucanase (Lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 Properties of the Enzyme Epressed in *Escherichia coli* and Evidence that the Gene has a Bacterial Origin. *J. Bacteriol.*, 179(19):6028-6034.
- CHIANG, S.H. and HSIEH, W.M., 1995. Effect of direct-fed microorganisms on broiler growth performance and litter ammonia level. *Asian-Australasian Animal Science*, 8:159-162.
- CLASSEN, H.L., BEDFORD, M.R., 1991. The use of enzymes to improve the nutritive value of poultry feeds. In *Recent Advances in Animal Nutrition*, Haresign, D.J.A.. Cole, Butterworth-HeiNemann.
- CORRIER, D.E., NISBET, D.J., SCANLAN, C.M., TELLEZ, G., HARGIS, B.M. AND DELOACH, J.R., 1994. Inhibition of *Salmonella enteritidis* cecal and organ colonization in Leghorn chicks by a defined culture of cecal bacteria and dietary lactose. *Food Protec*, 56:377-381.
- COUCH, J.R., 1978. Poultry researchers outline benefits of bacteria, fungistatic compounds, other feed additives. *Feedstuffs*, 50:6.
- COWAN, W.D. and HASTRUP, T., 1995. WPSA Proceedings. 10th European Symposium on Poultry Nutrition, 15-19 October, Antalya-Türkiye, s.320-321.
- COWAN, W.D., 1996. *Animal Feeds. Industrial Enzymology* (By T. Godfrey and S. West Edits.), Macmilan Pres Ltd., London.
- CUTTING, S.M., and VAN DER HORN, P.B., 1990. *Molecular Biology Methods for Bacillus* (C.R. HARWOOD and S.M. CUTTING editors), s.27-74.
- DAESCHEL, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Thecnol.*, 43:164.
- DEMİREL, R. ve GÜRBÜZ, Y., 1999. Karma Yemlerde Enzim Kullanımı. Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı, 3-6/06/99, İstanbul, s.498-495.
- EKİNCİ, M.S., MCCRAE, S.I., FLINT, H.J., 1997a. Isolation and Overexpression of a Gene Encoding an Extracellular β -(1,3-1,4)-Glucanase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3752-3756.

- EKİNCİ, M.S., 1997b. Heterologous Expression of Genes in the Anaerobic Bacterium *S. bovis*. Doktora Tezi, Aberdeen U.K., 228 s.
- ELWİNGER, K. and SATERBY, B., 1987. The use of β -glucanase in Practical Broiler Diets Containing Barley or Oats. *J. Agric. Res.*, 17:133-140.
- ERFLE, J.D., TEATHER, R.M., WOOD, P.J., IRVİN, J.E., 1988. Purification and Properties of a 1,3-1,4-beta-D-Glucanase (Lichenase, 1,3-1,4-beta-D-Glucan 4-Glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.73) from *Bacteroides succinogenes* cloned in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 255(3):833-841.
- FLINT, H.J., McPHERSON, C.A., BISSET, J., 1989. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1230-1233.
- FLINT, H.J., MARTIN, J., McPHERSON, C.A., DANIEL, A.S., and ZHANG, J.-X., 1993. A Bifunctional Enzyme, with Separate Xylanase and β (1,3-1,4)-Glucanase Domains, Encoded by the *xynD* Gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.*, 175:2943-2951.
- FRANCESCH, M., PEREZ-VENDRELL, A.M., TAILLADE, P., MORENO, F., and BRUFAU, J., 1995. WPSA Proceedings. 10th European Symposium on Poultry Nutrition, 15-19 October, Antalya-Türkiye, s.336-337.
- FULLER, R., 1989. Probiotics in Man and Animals. *J. Appl. Bact.*, 66:365-378.
- FULLER, R., 1990. Probiotics For Far Animals. Probiotics in The Nutrition of Animals. Probiotics in The Nutrition of Animals, 19-21 November 1990, Brno, s.17-25.
- GODFREY, T., 1983. *Industrial Enzymology*. (T. GODFREY and J. REINCHOLT eds.), McMillian, London, s.466.
- GOLDIN, B.R. and GORBACH, S.L., 1984. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotic, and *Lactobacillus* decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, aco dyes, and glucuronides. *Journal of National Cancer Institute*, 73:689-695.
- GORLACH, J.M., VEN DER KNAAP, E., WALTON, J.D., 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:385-391.
- GOSALBES, M.J., PEREZ GONZALEZ J.A., GONZALES, R., NAVARRO, A., 1991. Two Beta-Glycanase Genes are Clustered in *Bacillus polymyxa*:

- Molecular Cloning, Expression, and Sequence Analysis of Genes Encoding a Xylanase and an Endo-Beta-(1,3)-(1,4)-Glucanase. *J. Bacteriol.* 173(23):7705-7710.
- GÜNAL, M., CEYLAN, N., VE ÇALIŞKANER, Ş., 1995. Çavdar İçeren Broyler Rasyonlarına İlave Edilen Antibiyotik ve Enzimin Besi Performansı ve Bazı Bağırsak Parametrelerine Etkisi Üzerine Bir Araştırma. Yutav, Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı'95, 24-27 Mayıs 1995, İstanbul, Bildiriler, s.145-162.
- HANAHAH, D., 1983. Studies on Transformation of *E. coli* with Plazmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557-580
- HAVENSTEIN, G.B., CRITTENDEN, L.B., PETITTE, J.N., QURESHI, M.A., FOSTER, D.N., 1992. Application of Biotechnology in the Poultry Industry. *Animal Biotech.* 3(1), s.15-36.
- HENG, N.C.K., JENKINSON, H.F., TANNOCK, G.W., 1997. Cloning and Expression of an Endo-1,3-1,4-β-Glucanase Gene from *Bacillus macerans* in *Lactobacillus reuteri*. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 63(8):3336-3340.
- HENRISSAT, B., 1991a. A Clasification of Glycoside Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities. *Biochem. J.*, 280:309-316.
- HENRISSAT, B., 1991b. A Clasification of Glycoside Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities. *Biochem. J.*, 280:211-216.
- HENRISSAT, B., BAIROCH, A.,1993. New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolyses Based on Amino Acid Similarities. *Biochem. J.* 293:781-788.
- HENRISSAT, B., BAIROCH, A.,1996. *Biochem. J.*, 316:695-696.
- HERRICK, J.B., 1972. Therapeutic nutrition using *Lactobacillus* species. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinic*, 67:1249.
- HESSELMAN, K., ELWINGER, K., NILSSON, M., THOMKE, S., 1981. The effect of β-glucanase supplementation, stage of ripeness and storage treatment of barley in diets fed to broiler chickens. *Poultry Sci.*, 60:2664-2671.

- HESELNAN, K., THOMKE, S., 1982. Influence of some factors on development of viscosity in the water extract of barley. *Swed. J. Agric. Res.*, 12:17-22.
- HESELNAN, K., and AMAN, P., 1986. The Effect of β -glucanase on the Utilization of Starch and Nitrogen by Broiler Chickens Fed Low-and High-Viscosity Barley. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 147:83-89.
- HINCLIFFE, E., 1984. Cloning and expression of a *Bacillus subtilis* endo-1,3-1,4-beta-D-glucanase gene in *Escherichia coli* K12. *Journal of General Microbiology*, 130:1285-1291.
- HOFEMEISTER, J., KURTZ, A., BORRIS, R., KNOWLES, J., 1986. The Beta-Glucanase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* Shows Extensive Homology with that of *Bacillus subtilis*. *Gene*, 49(2):177-187.
- HOOLO, H., and NES, I.F., 1989. High-frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:3119-3123.
- HOOOPER, P., 1989. The Role of Probiotics (Intestinal Inoculants) in Production Animals. *World Association of Veterinary Food Hygienists Xth (Jubilee) International Symposium in Stockholm, 2-7 July*, s.27-30.
- HOOOPER, P., 1990. Probiotics. *Intestinal Inoculants For Production Animals. Probiotics in the Nutrition of Animals, 19-21 November 1990, Brno*, s.69-86.
- HOVARTH, H., HUANG, J., WONG, O., KOHL, E., OKITA, T., KANNANGARA, C.G., Von WETTSETIN, D., 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97:1914-1919.
- HUGHES, J., 1988. Calf Heifer and Beef Nutrition: Designing Tomorrow's Natural Feeds. *Biotechnology in the Feed Industry* (T.P. LYONS editor), *Proceedings of Alltech's Fourth Annual Symposium, Alltech Technical Publications, Kentucky*, s.68-78.
- INBORR, J., 1990. Practical Application of Feed Enzymes. *Feed Compounder*, 10:41-49.
- IRVIN, J.E., TEATHER R.M., 1988. *Applied Microbiol.*, 54:2672-2676.

- JENSEN, L.G., OLSEN, O., KOPS, O., WOLF, N., THOMSEN, K.K., Von WETTSTEIN, D., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. , USA, 93:3487-3491.
- JEROCH, H., GRUZAUSKAS, R., VOLKER, L., 1992. The effect of variety on the feeding value of barley for broiler chickens and efficiency of enzyme preparation containing β -glucanase. Proceedings, XIX. World's Poultry Congress Amsterdam, The Netherlands, s.20-24.
- JIN, L.Z., HO, Y.W., ABDULLAH, N. and JALALUDIN, S., 2000. Digestive and Bacterial Enzyme Activities in Broilers Fed Diets Supplemented with *Lactobacillus* Cultures, Poultry Sci., 79:886-891.
- JONNISON, E., 1985. *Lactobacilli* As Probiotics To Pigs And Calves. A Microbiological Approach, Papport 148, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, s.1-65.
- KUTLU, H.R., DEMİR, E., GÖRGÜLÜ, M., VE ÖZTÜRKCAN, O., 1995. Mısır ve Soyaya Dayalı Rasyonlara Enzim ve Su İlavésinin Etlik Cıvcıvlerin Performansı Üzerine Etkileri. Yutav, Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı'95 24-27 Mayıs 1995, İstanbul, Bildiriler, s.503-510.
- LAEMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.
- LIN, M.Y., HARLANDER, S., SAVAIANO, D., 1996. Construction of an Integrative Food-Grade Cloning Vector for *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 45:484-489.
- LLOBERAS, J., QUEROL, E., BERNUES, J., 1988. Appl. Microbiol. Biotechnol., 29:32-38.
- LLOBERAS, J., PEREZ-PONS, J.A., QUEROL, E., 1991. Molecular Cloning, Expression and Nucleotide Sequence of the endo- β -1,3-1,4-D-glucanase Gene From *Bacillus licheniformis*. Eur. J. Biochem. 197:337-343.
- LOUW, M.E. and WATSON, S.J.R., 1993. Characterization, cloning and sequencing of a thermostable endo-(1,3-1,4) beta-glucanase encoding gene from alkalophilic *Bacillus brevis*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 38, 507-513.

- LYONS, T.P., 1987. The Role of Biological Tools in the Feed Industry. Biotechnology in the Feed Industry, Alltech Technical Publications, Kentucky, s.1-49.
- LUNCHANSKY, J.B., MURIANA, P.M., AND KLAENHAMMER, T.R., 1988. Electrotransformation of Gram-Positive Bacteria. Bio-Rad Laboratories Bulletin 1350.
- MCCORMICK, M.E., 1984. Probiotics in Ruminant Nutrition and Health. Proceedings 1984 Georgia Nutrition Conference For The Feed Industry, Atlanta, s.62-69.
- McINTYRE, D.A., and HARLANDER, S.K., 1989a. Genetic Transformation of Intact *L. lactis subsp. lactis* by High-Voltage Electroporation. Appl. Environ. Microbiol., 55(3):604-610.
- McINTYRE, D.A., and HARLANDER, S.K., 1989b. Improved Electroporation of Intact *Lactococcus lactis subsp. lactis* Cells Grown in Defined Media. Appl. Environ. Microbiol., 55(10):2621-2626.
- MELUZZI, A., FRANCHINI, A. and GIORDANI, G., 1986. Lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* in diets for broiler chickens. Avicoltura, 55:54-56.
- MOHAN, B., KADIRVEL, R., NATARAJAN, A., BHASKARAN, M., 1996. Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. British Poultry Sci., 37:395-401.
- MURPHY, N., McCONNELL, D.J., CANTWELL, B.A., 1984. Nucleic Acids Res., 12:5355-5367.
- NAHASHON, S.N., NAKAUE, H.S., MIROSH, L.W., 1993. Effect of direct-fed microbials on nutrient retention and production parameters of single Comb White Leghorn pullets. Poultry Science, 72:87.
- NAHASHON, S.N., NAKAUE, H.S., MIROSH, L.W., 1996a. Nutrient retention and production parameters of single Comb White Leghorn layers fed diets with varied crude protein levels and supplemented with direct-fed microbials. Anim. Feed Sci. And Technol., 61:17-26.

- NAHASHON, S.N., NAKAUE, H.S., MIROSH, L.W., 1996b. Performance of single Comb White Leghorn layers fed a diet with a live microbial during the growth and egg laying phases. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 57:25-38.
- NEMESKERY, T., 1983. Probiotics For Young Animals. *Feed International*, s.46-48.
- NISBET, D.J., CORRIER, D.E., SCANLAN, C.M., HOLLISTER, A.G., BEJER, R.C. and DELOACH, J.R., 1993. Effect of a defined continuous -flow derived bacteria culture and dietary lactose on *Salmonella* colonization in broiler chicks. *Animal Diseases*, 37:1418-1425.
- NOUSIAINEN, J. and SETALA, J., 1993. Lactic Acid Bacteria As Animal Probiotics. , (S. Salminen and A. Von Wrright Editors). *Lactic Acid Bacteria*, Marcel Dekker, New York, US, s.315-356.
- NURMI, E., and RANTALA, M., 1973. New Aspects of Salmonella Infection in Broiler Production. *Nature*,241:210-211.
- OKAN, F., CANOĞULLARI, S., ULUOCAK, A.N., 1995. YUTAV Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı Bildirileri, 24-27 Mayıs, İstanbul-Türkiye, s.183-192.
- OLSEN, O., BORRIS, R., SIMON, O., THOMSEN, K.K., 1991. *Mol. Gen. Genet.*, 225:177-185.
- O'SULLIVAN, T.F., AND FITZGERALD, G.F., 1999. Electrotransformation of Industrial Strains of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiolgy*, 86:275-283.
- ÖZCAN, N., 1992. Cloning and Sequencing of a Cellulase Gene From *Fibrobacter succinogenes* SD35, Doktora Tezi, Aberdeen, U.K., s. 266.
- ÖZCAN, N., 2001. Heterogous expression of genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Turkish J. Agric. Forest.*, 25:45-49.
- PAL, U.C., 1999. Probiotics Benefits. *Polutry International*, October, 1999, s.40-44.
- PATRIDGE, G. and WYATT, C., 1995. *World Poultry*, 11(4):17-21.
- PLANAS, A., 2000. Bacterial 1,3-1,4-β-Glucanases: Structure, Function and Protein Engineering (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* 1543(2000), s.361-382.

- PERDIGON, G., ALVAREZ, S., De MACIAS, M.E., De RUIZ, A.A., 1990. The oral administration of Lactic Acid Bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *Journal of Food Protection*, 53:404-410.
- POLAT, C., ŞAMLI, H.E., HANGÜN, Ö., 1999. Ekzojen Enzimlerin Etlik Piliçlerde Karkas Verimi Üzerine Etkileri. *Uluslararası Hayvancılık'99 Kongresi 21-24 Eylül 1999, İzmir-Türkiye*, s.357-361.
- POSNO, M., LEER, R.J., VANLUIJK, N., VANGIEZEN, M.J.F., HCUVELMANS, P.T.H.M., LOKMAN, B.C., POWWELS, P.H., 1991. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:1822-1828.
- POWELL, J.B., ACHEN, M.G., HILLIER, A.J., AND DAVIDSON, B.E., 1988. A Simple and Rapid Method for Genetic Transformation of *Lactic streptococci* by Electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(3):655-660.
- PRENTKI, P., KARCH, F., IIDA, S. and MEYER, J., 1981. *Gene*, 14:289.
- PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A., 1999. *Microbiology*, Fourth Edition, McGraw-Hill Companies, New York, USA.
- ROSEN, G.D., 1995. Antibacterials in Poultry and Pig Nutrition (R.J. WALLACE and A. CHESSON editors). *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*, VCH press, Germany, s.225-257.
- SALİH, M.E., CLASSEN, H.L., CAMPBELL, G.L., 1991. Responce of chickens Fed on Hull-less Barley to Dietary β -glucanase at Different Ages. *Animal Feed Sci. Technol.*, 33:139-149.
- SCHANG, M.J., AZCONA, J.O., AND ARIAS, J.E., 1997. Mısır/soya veya mısır/tam yağlı soya ile beslenen broilerlerde soya enzimi ilavesinin performansa etkileri. *Yutav, Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı'97*, 14-17 Mayıs 1997, İstanbul, Bildiriler, s.338.
- SCHEIRLINCK, T., MAHILLON, J., JOOS, H., DHAESE, P., and MICHIELS, F., 1989. Integration and Expression of α -Amylase and Endoglucanase Genes in

- the *Lactobacillus plantarum* Chromosome. Applied and Environmental Microbiology, 55(9):2130-2137.
- SCHIMMING, S., SCHWARZ, W.H., STAUDENBAUER, W.L., 1991. Properties of a thermoactive Beta-1,3-1,4-Glucanase (Lichenase) from *Clostridium thermocellum* Expressed in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177(1):447-452.
- SCHIMMING, S., SCHWARZ, W.H., STAUDENBAUER, W.L., 1992. Structure of the *Clostridium thermocellum* Gene licB and the Encoded Beta-1,3-1,4-Glucanase. Eur. J. Biochem, 204(1):13-19.
- SIMBAYA, J., SLOMINSKI, B.A., GUENTER, W., MORGAN, A., CAMPBELL, L.D., 1996. Animal Feed Sci. Tech., 61:219-234.
- SLOS, P., BOURQUIN, J., LEMOINE, Y., and MERCENIER, A., 1991. Isolation and Characterization of Chromosomal Promoters of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Applied and Environmental Microbiol., 57:1333-1339.
- SORENSEN, P., 1996. Asunflower+anymes=soybaen?. Feed International, December, 17(2):24-28.
- STAVRIC, S. and KORNEGAY, E.T., 1995. Microbial probiotics for pigs and poultry., Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding, (R. J. Wallace and A. Chesson editors), s.205-231.
- STONE, B.A., CLARKE, A.E., 1992. Chemistry and Biology of 1,3- β -Glucans, La Trobe University Press, Bundoora, Australia.
- TABERNEIRO, C., COLL, P.M., FERNANDEZ-ABALOS, J.M., PEREZ, P., SANTAMARIA, R.I., 1994. Cloning and DNA Sequencing of bgaA, a Gene Encoding an Endo- β -1,3-1,4-Glucanase, from an Alkalophilic *Bacillus* Strain (N137). Appl. Environ. Microbiol. 60:1213-1220.
- TEATHER, R.M., and WOOD, P.J., 1982. Use of Congo Red Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria From the Bovine Rumen. Appl. Environ. Microbiol., 43:777-780.
- TEATHER, R.M., ERFLE, J.D., 1990. J. Bacteriol. 172:3837-3841.

- TORTUERO, F., 1973a. Influence of the Implantation of *Lactobacillus acidophilus* Against Pathogenic *E. coli* in Gnotobiotic Chicks. Poultry Sci., 61:1298-1308.
- TORTUERO, F., 1973b. Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. Poultry Science, 52:197-203.
- TORTUERO, F. and FERNANDEZ, E., 1995. Effects of inclusion of microbial cultures in barley-based diets fed to laying hens. Animal Feed Sci. Technol., 53:255-265.
- TUNCER, İ., 2000. Kanatlı Rasyonlarında Probiyotik Kullanımı. Çiftlik Dergisi, Mayıs, 2000, 195:39-42.
- VANBELLE, N., TELLER, E., FOCANT, M., 1990. Probiotics in Animal Nutrition: a review. Arch. Anim. Nutr., 40:543-567.
- WALKER, D.C., AOYAMA, K., KLAENHAMMER, T.R., 1996. Electrotransformation of *Lactobacillus acidophilus* Group A1. FEMS Microbiol., 138:233-237.
- WATKINS, B.A. and MILLER, B.F., 1983. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. Poultry Sci., 62:1772-1779.
- WEI, M., RUSH, C.M., NORMAN, J.M., HAFNER, L.M., EPPING, R.J., TIMMS, P., 1995. An Improved Method for the Transformation of *Lactobacillus* Strains Using Electroporation. J. Microbiological Methods, 21:97-109.
- WHITE, W.B., BIRD, H.R., SUNDE, M.L., MARLETT, J.A., 1983. Poultry Science, 62:853-862.
- WOLF, M., GECZI, A., SIMON, O., BORRIS, R., 1995. Genes Encoding xylan and Beta-Glucan Hydrolysing Enzymes in *Bacillus subtilis*: Characterization, Mapping and Construction of Strains Deficient in Lichenase, Cellulase and Xylanase. Microbiology, 141:281-90.
- WU, J.F., 1987. The Microbiologist's Function In Developing Action-Specific Microorganisms. Biotechnology In The Feed Industry (T.P. LYONS editor), Alltech Technical Publication, Kentucky, s.181-197.

ZVERLOV, V.V., FUCHS, K.P., SCHWARZ, W.H., VELIKODVORSKAYA,
G.A., 1994. *Biotechnol. Lett.* 16:29-34.



ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde doğdum. İlk öğrenimimi 1987 yılında Adana'da, orta öğrenimimi 1990 yılında Şanlıurfa'da ve lise öğrenimimi 1993 yılında Adana'da tamamladım. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yüksek öğrenimime başlayarak 1997 yılında bu bölümden mezun oldum. 1999 yılında aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Zootekni Bölümü'nün Biyometri-Genetik Anabilim Dalı'nda açmış olduğu Araştırma Görevliliği sınavını başarıyla tamamlayarak bu birimde çalışmaya başladım. Halen aynı görevi yürütmekteyim.

EKLER

1.1. Besi Ortamları için Antibiyotiklerin Hazırlanması

a) Ampisilin (25 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktar Ampisilin dikkatli bir şekilde tartılır, saf suda çözülür, bakteriyel filtreden (0.2 µm) geçirilerek steril bir şekilde ependorf tüplere paylaşılır ve -20°C'de saklanır. Besi ortamlarına 35-50 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

Ampisilin, penisilin türevi bir madde olup hücre duvarı sentezlenmesine engel olarak bakterinin ölümüne neden olur. Dirençli bakteriler tarafından sentezlenen β-lactamaz, antibiyotığın β-lactam halkasını kopartarak inaktive eder.

b) Tetrasiklin (12.5 mg/ml)

Etanol/saf su (1/2 v/v) karışımında 12.5 mg/ml olacak şekilde tetrasiklin hidroklorid çözülür ve ependorflara paylaşılırak -20°C'de saklanır. Tetrasiklin ışığa hassas olduğu için karanlık bir ortamda veya alüminyum folyoya sarılarak saklanmalıdır. Besi ortamlarına 12.5-15 µg/ml olacak şekilde ilave edilir. Magnezyum iyonları tetrasiklin için kuvvetli bir inhibitör madde olduğundan, tetrasiklin dirençli bakteri seçimlerinde magnezyum içermeyen besi ortamları (örn. LB) kullanılmalıdır.

Tetrasiklin, ribozomların 30S'lik birimlerine bağlanarak bakteriyel protein sentezini önler. Dirençli bakterilerin ürettiği bir protein hücre zarını modifiye ederek antibiyotığın hücre içine alınmasını önler.

c) Kloramfenikol (34 mg/ml)

Mutlak (% 100) alkol içinde 34 mg/ml olacak şekilde hazırlanır ve -20°C'de saklanır. Besi ortamlarına plazmid amplifikasyonu için 170 µg/ml, dirençli bakteri seçimi ise 30 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

Kloramfenikol, ribozomların 50S'lik birimlerine bağlanarak peptid bağı oluşumunu önler. Direnç geninin kodladığı acetyltransferaz, antibiyotığı asetile eder ve inaktif hale gelmesini sağlar.

d) Eritromisin (10 mg/ml)

%50 etanol/saf su karışımında 10 mg/ml olacak şekilde eritromisin çözülür ve ependorflara paylaştırılarak -20°C'de saklanır.

1.2. RNaz (10 mg/ml)

Hazırlamak istenen hacim için gereken miktar RNaz dikkatli bir şekilde tartılır ve 10 mM Tris.Cl (pH 7.5) ve 15 mM NaCl içeren RNaz solüsyonunda çözülür. Daha sonra su banyosunda 100 °C'de 15 dakika tutulur (Dnaz aktivitesini gidermek için), oda sıcaklığında soğutulur ve ependorflara paylaştırılarak -20°C'de saklanır.

1.3. Lizozim Solüsyonu (5 mg/ml)

50 mM Glükoz

50 mM Tris-HCl pH 8.0

50 mM EDTA pH 8.0

Önce, 25 ml 1 M glükoz hazırlanır ve filtreden geçirilerek stok olarak saklanır. İstenilen hacimdeki solüsyon için gerekli Tris, EDTA ve Glukoz hesaplanır, stoklardan alınır ve üzeri steril saf su ile tamamlanarak buzdolabında saklanır. Kullanılacağı zaman istenen hacimde solüsyon alınır, 5 mg/ml olacak şekilde liyofilize lizozim tartılır, iyice vortekslenir ve kullanılıncaya kadar buz üzerinde tutulur. Bu solüsyonun her zaman taze olarak hazırlanması gerektiğinden varsa fazlası atılır.