

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus* sp. KAYNAKLI PULLULANAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN
KLONLANMASI VE EKSPRESYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

FİDAN ERDEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2012

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus* sp. KAYNAKLI PULLULANAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN
KLONLANMASI VE EKSPRESYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**FİDAN ERDEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) tarafından
1002-Hızlı Destek Programı Kapsamında 111T559 nolu proje ile desteklenmiştir.**

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus* sp. KAYNAKLI PULLULANAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN
KLONLANMASI VE EKSPRESYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

FİDAN ERDEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 27/12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (100) not takdir edilerek
Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ (Danışman)

Doç. Dr. Mehmet İNAN

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ÖZET

***Bacillus* sp. KAYNAKLI PULLULANAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

FİDAN ERDEN

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ

Aralık 2012, 83 Sayfa

Bu çalışmada *Bacillus* sp. kaynaklı pullulanaz geninin izole edilmesi ve *Pichia pastoris*'te pullulanaz enziminin rekombinant üretimi üzerine çalışılmıştır. Gen kaynağı olarak, daha önce tamamlanmış bir çalışma ile sünmüş ekmekten izole edilmiş olan *Bacillus* suşları taranmıştır. Pullulanaz geni, moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak *B. subtilis* BK07 izolatında bulunmuştur ve izole edilmiştir. Elde edilen genin C-ucuna PZR yolu ile çoklu histidin etiketi eklenmiştir. Histidin etiketli gen, pPICZαA vektörüne bağlanmış ve *P. pastoris* KM71H suşuna aktarılmıştır. Ardından metanol indüksiyonlu protein üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *B. subtilis* PY22 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmış ve analizler bu suş için de eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

P. pastoris'te üretilen BK07 ve PY22 pullulanaz enzimlerinin optimum çalıştığı koşullar, sırası ile pH8-40°C ve pH6-40° olarak saptanmıştır. BK07 pullulanaz aktivitesi 8,46 U/ml, PY22 pullulanaz aktivitesi 2,95 U/ml olarak tespit edilmiştir. Spesifik enzim aktiviteleri ise sırası ile 144 U/mg ve 51 U/mg olarak saptanmıştır. SDS-PAGE ve Western blot analizleri BK07 pullulanazının moleküler ağırlığının yaklaşık 81 kDa, PY22 pullulanazının ise yaklaşık 90 kDa olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Pullulanaz, *Pichia pastoris*, *Bacillus* sp., Rekombinant protein üretimi

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ (Danışman)

Doç. Dr. Mehmet İNAN

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ABSTRACT

STUDIES ON CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING PULLULANASE FROM *Bacillus* sp.

FİDAN ERDEN

M.Sc. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof Dr. Barçın KARAKAŞ

December 2012, 83 Pages

This study focuses on isolation of the pullulanase gene from *Bacillus* sp. and recombinant production of the enzyme in *Pichia pastoris*. *Bacillus* strains isolated from ropey bread in a previous study were screened as sources of the gene and *B. subtilis* BK07 was used as the gene source. Pullulanase gene which was amplified with PCR to include a polyhistidine tag was transformed into *P. pastoris* KM71H yeast using the pPICZ α A vector and the enzyme production was achieved by methanol induced expression. In all steps, *B. subtilis* PY22 was used as positive control of the analysis.

Optimum pH and temperature conditions for BK07 and PY22 pullulanase were investigated. Optimum pH and temperature was found as pH8-40°C and pH6-40°C, respectively. BK07 pullulanase activity was determined as 8.46 U/ml in supernatant and specific activity of the enzyme was calculated as 144 U/mg. PY22 pullulanase activity was determined as 2.95 U/ml in supernatant and specific activity of the enzyme was calculated as 51 U/mg. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the molecular weight of the recombinant enzyme BK07 pullulanase and PY22 pullulanase were determined to be about 81 kDa and 90 kDa, respectively.

KEYWORDS: Pullulanase, *Pichia pastoris*, *Bacillus* sp., Recombinant protein production

COMMITTEE: Asst. Prof Dr. Barçın KARAKAŞ (Supervisor)

Assoc. Prof Dr. Mehmet İnan

Asst. Prof Dr. Cengiz İKTEN

ÖNSÖZ

Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler son yirmi yılda ivme kazanmıştır. Kaydedilen bu ilerlemeler, moleküler biyoloji uygulamalarının kullanıldığı bir çok alanı da etkilemeye devam etmektedir. Bu alanda edinilen bilgi birikimi diğer temel ve uygulamalı bilimlerle birlikte endüstri sektörüne de önemli faydalar sağlamaktadır.

Bu çalışmada gıda alanında kullanılan bir enzim olan pullulanazın, *Pichia pastoris* mayasında rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışma, genin yerel bakteri izolatlarında taranmasını, genin izolasyonunu, rekombinant üretimini ve rekombinant enzimin karakterizasyonunu kapsamaktadır. Elde edilen veriler ve kullanılan yöntemler farklı araştırmalar için kaynak olabileceği gibi, elde edilen enzime ait özelliklerin enzim mühendisliği çalışmaları ile değiştirilmesi ve geliştirilmesi de mümkündür.

Bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren ve desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ'a, gösterdiği emek ve ayırdığı zaman için saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sayın Doç. Dr. Mehmet İNAN hocama bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendirdiği için, bu çalışmaya olan ilgisi ve desteği için; ve ayrıca bizim için sağlamış olduğu çalışma koşulları için saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN hocama, tezimi değerlendirdiği ve son halinin oluşturulmasında yaptığı yönlendirmeler için teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Ar. Gör. Fundagül EREM hocama, bu çalışmada kullanmış olduğum yerel izolatları sağladığı için, değerli vaktini ayırarak verdiği destek ve bilgi paylaşımları için çok teşekkür ederim.

Dr. Nisa Ertoy'a bazı laboratuvar malzemelerinin temin edilmesinde olan yardımını ve ilgisi için çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Mert KARAOĞLAN'a özellikle laboratuvar çalışmalarım sırasında verdiği fikirler için ve malzemelerimizin temin edilmesinde gösterdiği emek ve ayırdığı vakit için çok teşekkür eder, başarılarının ve başarılarımızın devam etmesini dilerim.

Değerli arkadaşım Semiramis YILMAZ'a her zaman yanımda olduğu için, desteği ve paylaşımları için, ayrıca tezin son halinin oluşturulmasında verdiği fikirler ve yardımları için çok teşekkür ederim.

Benden gerek maddi gerekse manevi hiçbir desteğini esirgemeyen aileme bana sağladığı imkanlar için sonsuz teşekkür ederim.

Kardeşim Mehmet ERDEN'e tezimi yazdığım dönem boyunca hep yanımda olduğu için, bu süreçte gösterdiği anlayış ve verdiği destek için çok teşekkür ederim.

Hızlı Destek (1002) programı kapsamında tez projemi destekleyen ve bu süreçte burs imkânı sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz pullulan, Hayashibara (Japonya) firması tarafından hibe edilmiştir. Destek ve ilgileri için Hayashibara'ya teşekkürlerimi sunarım

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	2
2.1. Pullulanaz Enzimi Substratı – Pullulan	2
2.2. Pullulanaz Enzimi	3
2.3. Pullulanaz Enziminin Kullanım Alanları.....	4
2.3.1. Gıda sanayisinde kullanım alanları	4
2.3.2. Diğer kullanım alanları	6
2.4. Pullulanaz Enzimi Üzerine Yapılan Çalışmalar	6
2.5. Konukçu Suş <i>Pichia pastoris</i> ile Rekombinant Protein Üretimi	8
3. MATERYAL VE METOD	9
3.1. Materyal	9
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri ve maya suşları.....	9
3.1.2. Çalışmada kullanılan taşıyıcı plazmitler	9
3.1.3. Kimyasallar ve enzimler	11
3.2. Metod	11
3.2.1. Temel moleküler biyoloji yöntemleri	11
3.2.1.1. DNA izolasyonu.....	11
3.2.1.2. Polimeraz zincir tepkimesi (PZR).....	12
3.2.1.3. Agaroz jel elektroforezi	13
3.2.1.4. Ligasyon ve transformasyon	13
3.2.1.5. Plazmit izolasyonu	14
3.2.1.6. PZR ürünlerinin saflaştırılması	15
3.2.1.7. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu	15
3.2.1.8. SDS-PAGE ve Western blot analizi	15
3.2.1.9. Southern blot analizi	16

3.2.1.10. Koloni hibridizasyonu.....	17
3.2.2. Diğer biyokimyasal analizler	18
3.2.2.1. Rekombinant proteinin saflaştırılması	18
3.2.2.2. Pullulanaz aktivitesinin tayini	19
3.2.2.3. Rekombinant enzimin karakterizasyonu	19
3.2.2.4. Hidroliz ürünlerinin tayini	20
3.2.2.5. Toplam protein ölçümü.....	21
4. BULGULAR	22
4.1. Bakterilerin Pullulanaz Üretme Yeteneklerinin Kalitatif Yöntemle Taranması	22
4.2. Yerel İzolatlardan Pullulanaz Genini Klonlama Çalışmaları	22
4.2.1. DNA izolasyonu.....	22
4.2.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile genin amplifikasyon denemeleri	23
4.2.3. Southern blot yöntemi ile genin izolasyonu denemeleri.....	26
4.2.4. Koloni hibridizasyonu.....	28
4.2.5. Yeni primerlerle ve diğer yerel bakteri izolatlarında PZR denemeleri.....	31
4.2.6. BK07 ve PY22 pullulanaz genlerinin izole edilerek klonlama (pJET1.2) ve ekspresyon (pPICZαA) vektörlerine ligasyonu.....	34
4.2.7. Konukçu <i>Pichia pastoris</i> 'e transformasyon ve pul ⁺ klonların eldesi.....	40
4.2.8. Seçilen klonlar ile protein üretimi ve proteinin saflaştırılması.....	41
4.2.9. Enzim üretimi için optimum indüksiyon süresinin belirlenmesi	52
4.2.10. Enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi.....	53
4.2.11. Enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi ...	55
4.2.12. Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi.....	56
4.2.13. Pullulanaz Aktivitesi Tayini	58
4.2.14. Rekombinant pullulanaz enziminin hidroliz ürünlerinin belirlenmesi	59
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	65
7. KAYNAKLAR.....	68
8. EKLER.....	72
Ek 8.1. DNS Analizi İçin Glikoz Kalibrasyon Eğrisi.....	72

Ek 8.2. Toplam Protein Miktarının Hesaplanmasında Kullanılan Standart Protein (BSA) Kurvesi	73
Ek 8.3. PZR Çalışmalarında Kullanılan Primerler ve Sekansları	74
Ek 8.4. pJET-PY22pul Plazmidi ile Elde Edilen Pullulanaz Geni Nükleotid Dizisi ve Genin Kodladığı Rekombinat Proteininin Amino Asit Dizisi	75
Ek 8.5. pPICZαA-YBKpulH Plazmidi ile Elde Edilen Pullulanaz Geni Nükleotid Dizisi ve Genin Kodladığı Rekombinat Proteininin Amino Asit Dizisi.....	78
Ek 8.6. BK07 Pullulanaz Geni ile PY22 Pullulanaz Geninin Aminoasit Dizilerinin Karşılaştırılması	79
Ek 8.7. BK07 Pullulanazının Farklı Kaynaklardan İzole Edilmiş Diğer Pullulanaz Enzimleri ile Aminoasit Dizilerinin Karşılaştırılması	80
Ek 8.8. BK07 Pullulanaz Geni ile PY22 Pullulanaz Geninin Nükleotid Dizilerinin Karşılaştırılması	81
Ek 8.9. BK07 Pullulanazının Farklı Kaynaklardan İzole Edilmiş Diğer Pullulanaz Enzimleri Nükleotid Bazında Karşılaştırılması	82

ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	santimetre
d	Devir
dak	Dakika
kDa	Kilo dalton
L	Litre
μ	Mikro (10^{-6})
m	Mili (10^{-3})
M	Molar
n	Nano (10^{-9})
OD	Optik yoğunluk (optical density)
<i>g</i>	Göreceli santrifüj kuvveti (relative centrifugal force, rcf)
s	Saniye
sa.	Saat
T _m	Erime sıcaklığı (melting temperature)
U	Ünite
∞	Sonsuz

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Amp	Ampisilin
bç	Baz Çifti
BMGY	Tamponlanmış Karmaşık Gliserol Besiyeri (Buffered Glycerol Complex Medium)
BMMY	Tamponlanmış Karmaşık Metanol Besiyeri (Buffered Methanol Complex Medium)
DIG	Digoksijenin (digoxygenin)
DP	Polimerizasyon derecesi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
LB	Luria-Bertani
MA	Molekül Ağırlığı
OD	Optik yoğunluk
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PZR	Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR-Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SSC	Tuzlu Sodyum Sitrat (Saline Sodium Citrate)
YNB	Maya Azot Kaynağı (Yeast Nitrogen Base Sulfate without amino acids)
YPD	Maya Pepton Dekstroz (Yeast Peptone Dextrose)
TE	Tris-EDTA

TAE	Tris-Asetat-EDTA
TGM	Tris-Glisin-Metanol
TGS	Tris-Glisin-SDS

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Pullulanın kimyasal yapısı	2
Şekil 2.2.	Niştayı ve pullulanı hidroliz eden enzimlerin etki şablonu	4
Şekil 3.1.	Küt uçlu DNA parçalarının ligasyonu için kullanılan pJET1.2 plazmidi	10
Şekil 3.2.	Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pPICZ α A plazmidi	10
Şekil 4.1.	Bacillus sp. N16 izolatı ve pullulanlı agarda zon görünümü	22
Şekil 4.2.	Bakterilerden izole edilen genomik DNA'ların jel görüntüsü	23
Şekil 4.3.	a) WGF1-WGR1 b) PrF1-PrR2 c)PrF1-PrR1 d)PrF2-PrR1 primer çiftleri ile PY22 ve N16 genomik DNA'ları ile gerçekleştirilen PZR'den elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüleri	24
Şekil 4.4.	a) K1 ve K4 b) K5, N2 ve N12 izolatları ile WGF1-WGR1 primerleri kullanılarak yapılan PZR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	25
Şekil 4.5.	PY22 pullulanaz geninin iç bölgesinden elde edilen probun etkinliğinin ölçülmesi	26
Şekil 4.6.	PY22, N2, N12, N16 genomik DNA'larının Southern blot-DIG etiketleme sonucu X-ışını film görüntüsü.....	27
Şekil 4.7.	N12 genomik DNA'sının Sall ve StuI kesimi sonrası yürütülen jelden ekstraksiyon için gerekli bölgeler alındıktan sonra çekilen görüntü.....	28
Şekil 4.8.	Koloni hibridizasyonu ile elde edilen membranın X-ışını film görüntüsü...29	
Şekil 4.9.	Plazmitlerin restriksiyon enzimleri ile kontrolü	30
Şekil 4.10.	Geni içinden çoğaltan 2F-4R primerleri kullanılarak a) N12 genomik DNA'sı ile b) K1, K4, K5, N2, N16 genomik DNA'ları ile yapılan PZR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü	31
Şekil 4.11.	2F-4R primerleri kullanılarak BK07, N10, K6, K18 ve N19 genomik DNA'ları ile yapılan PZR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü. ...	32
Şekil 4.12.	pulATGF-5R primerleri kullanılarak BK07 ve N10 genomik DNA'ları ile yapılan PZR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	33
Şekil 4.13.	BK21-BK27 klonlarından elde edilen 1-7 plazmitlerin BglII restriksiyon enzimi ile kontrolü	34

Şekil 4.14. XhoIF-puladpSTOP primerleri ile pJET-BK24 plazmitinden çoğaltılan pullulanaz geni: BKpul.....	35
Şekil 4.15. XhoIF-BK07stopht primerleri ile pJET-BKpul plazmitinden çoğaltılan histidin etiketli pullulanaz geni: BKpulH.....	36
Şekil 4.16. pPICZαA-BKpulH plazmiti SacI ile kesilerek kontrol edilmesi.....	36
Şekil 4.17. B. subtilis PY22 pullulanaz geninin yürütüldüğü agaroz jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.18. PY22 pullulanaz geni içeren pJET1.2 plazmitlerinin restriksiyon sonucu jel görüntüsü.....	38
Şekil 4.19. pJETPY22pul plazmitinin restriksiyon sonucu jel görüntüsü.....	39
Şekil 4.20. pPICZαA-pul (a) ve pPICZαA-pulH (b) plazmidinin HindIII restriksiyon analizi sonucu.....	40
Şekil 4.21. pPICZαA-PY22pulH plazmitinin SacI ve MssI restriksiyon enzimleri ile kesim sonu elde edilen DNA parçaları.....	40
Şekil 4.22. SDS-PAGE jel görüntüsü.....	41
Şekil 4.23. Western blot membran görüntüsü.....	42
Şekil 4.24. pulATGF-puladpSTOP primerleri ile BK07 genomik DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 4.25. XhoIF-BK07stopht primerleri ile YBKpul PZR ürünü kullanılarak çoğaltılan histidin etiketli BK07 pullulanaz geni: YBKpulH.....	43
Şekil 4.26. pPICZαA-BKpulH plazmidinin SacI enzimi ile kesilerek doğrulanması....	44
Şekil 4.27. X33-YBKpulH (1-5) ve KM71H-YBKpulH (1-5) süpernatantları ile yapılan Western blot analizi membran görüntüsü.....	45
Şekil 4.28. SMD1168H-YBKpulH klonlarının süpernatantları ile yapılan Western blot analizi membran görüntüsü.....	46
Şekil 4.29.. SMD1168H-YBKpulH ile farklı pH'larda, 12. Ve 24. Saatte alınan örneklerle yapılan Western blot analizi sonucu elde edilen membran görüntüsü.....	47
Şekil 4.30. KM71H-YBKpulH ile farklı pH'larda, 12. ve 24. Saatte alınan örneklerle yapılan Western blot analizi sonucu elde edilen membran görüntüsü.....	47
Şekil 4.31. KM71H-YBKpulH klonu ile 16°C yapılan protein üretiminden elde edilen süpernatantın histidin etiketli proteinini saflaştırılma aşamalarını gösteren SDS-PAGE jel görüntüsü.....	48

Şekil 4.32. Histidin etiketli proteinin saflaştırma aşamalarında elde edilen örneklerin Western blot analizi.....	49
Şekil 4.33. KM71H-PY22pul klonlarının pullulanaz üretim yeteneklerini gösteren SDS-PAGE görüntüsü.	50
Şekil 4.34. Western blot analizi sonucu membran görüntüsü.	51
Şekil 4.35. Histidin etiketli PY22 pullulanazının süpernatanttan saflaştırılması aşamalarını gösteren SDS-PAGE jeli görüntüsü.....	51
Şekil 4.36. BK07 Pullulanaz enziminin (BKpul) optimum aktivite gösterdiği pH değerine ait sonuçlar.....	54
Şekil 4.37. PY22 Pullulanaz enziminin (PY22pul) optimum aktivite gösterdiği pH değerine ait sonuçlar.....	54
Şekil 4.38. BK07 pullulanaz enziminin (BKpul) optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerine ait sonuçlar.....	55
Şekil 4.39. PY22 pullulanaz enziminin (PY22pul) optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerine ait sonuçlar.....	55
Şekil 4.40. BK07 Pullulanaz enziminin termal stabilite sonuçları.....	56
Şekil 4.41. PY22 Pullulanaz enziminin termal stabilite sonuçları	57
Şekil 4.42. Saflaştırılmış enzimin reaksiyon ürünlerini gösteren TLC plakası	60
Şekil 5.1. Farklı kaynaklarda izole edilen pullulanaz enzimlerinin homoloji ağacı	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı pullulanaz kaynakları ve izole edilen enzimlere ait bazı özellikler	7
Çizelge 3.1. PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları	12
Çizelge 4.1. BK07 pullulanazının farklı indüksiyon sürelerinde elde edilen verileri	52
Çizelge 4.2. PY22 pullulanazının farklı indüksiyon sürelerinde elde edilen verileri	53

1. GİRİŞ

Enzimler, hücrelerde metabolik faaliyetlerin tümünü yöneten özel katalizörlerdir. Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikirlerini doğurmuştur. Bu sayede endüstride enzimlerin kullanılması ile ekonomik fayda da sağlanmaktadır.

Doğal mikroorganizmalardan enzim üretiminde, düşük enzim verimi, düşük enzim aktivitesi ve özellikle hücre içi enzimlerin zahmetli saflaştırma prosesleri gibi zorluklarla karşılaşmaktadır.

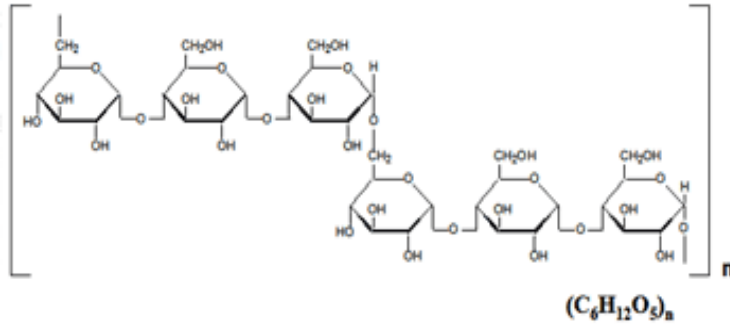
Gen mühendisliği teknikleri tüm bu sorunların üstesinden gelebilmektedir. Moleküler yöntemle çoğaltılan spesifik gen, saf formda ve yüksek miktarda izole edilebilmekte ve yüksek miktarda enzim üretimi sağlanabilmektedir (Salleh vd. 2006).

Bu araştırmada, ön denemeler kapsamında pullulanaz üreten yerel izolatlar (Erem 2007) plaka üzerinde kalitatif testle taranmış, ardından moleküler biyoloji yöntemleriyle pullulanaz geninin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonucuna göre, *B. subtilis* BK07 izolatu gen kaynağı olarak seçilmiştir ve bu izolattan pullulanaz enzimini kodlayan genin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Genin, C-ucu histidin ile etiketlenmiştir. Bu sayede hem Western blot analizi ile pullulanaz geni spesifik olarak tespit edilebilir hale gelmiştir hem de protein pürifikasyonu işlemi kolaylaştırılmıştır. Histidin etiketli pullulanaz geni, *S. cerevisiae* α -mating faktörü sayesinde hücre dışı üretimi mümkün kılan pPICZ α A ekspresyon vektörüne bağlanarak, konukçu suş olarak *Pichia pastoris* mayasına aktarılmış ve enzimin hücre dışı üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen rekombinant enzimin çalıştığı optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlenerek, enzimin substrat olarak pullulan ile reaksiyonu sonucunda edilen hidroliz ürünleri tespit edilmiştir. Ayrıca analizlerde pozitif kontrol olarak yer verilen, pullulanaz enzimi ürettiği bilinen *B. subtilis* PY22 suşundan da pullulanaz geni izole edilerek tüm analizler bu gen için de eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Pullulanaz Enzimi Substratı – Pullulan

Pullulan, (önceden *Pullularia pullulans* veya *Dematium pullulans* olarak bilinen) *Aureobasidium pullulans* tarafından üretilen suda çözünen bir polisakkarittir. Kimyasal yapı olarak α -1,4 bağlı üç glikoz molekülü ünitesi olan maltotrioz lineer polimerlerinin, α -1,6 bağı ile bağlanması ile oluşur. Pullulanın fizyolojik fonksiyonu belirsizdir. *Aureobasidium* suşları tarafından pullulanın yıkılması, önemli sayılabilecek ölçüde gerçekleşmemektedir. Bu durum pullulanın depo maddesi olarak kullanılmadığını düşündürmektedir. Genel olarak, pullulan ve benzer polisakkaritlerin, hücreleri kurumaya karşı koruduğu ve hücrelerin doğal substratlara bağlanmasına yardımcı olduğu kabul edilmektedir (Leathers 2003).



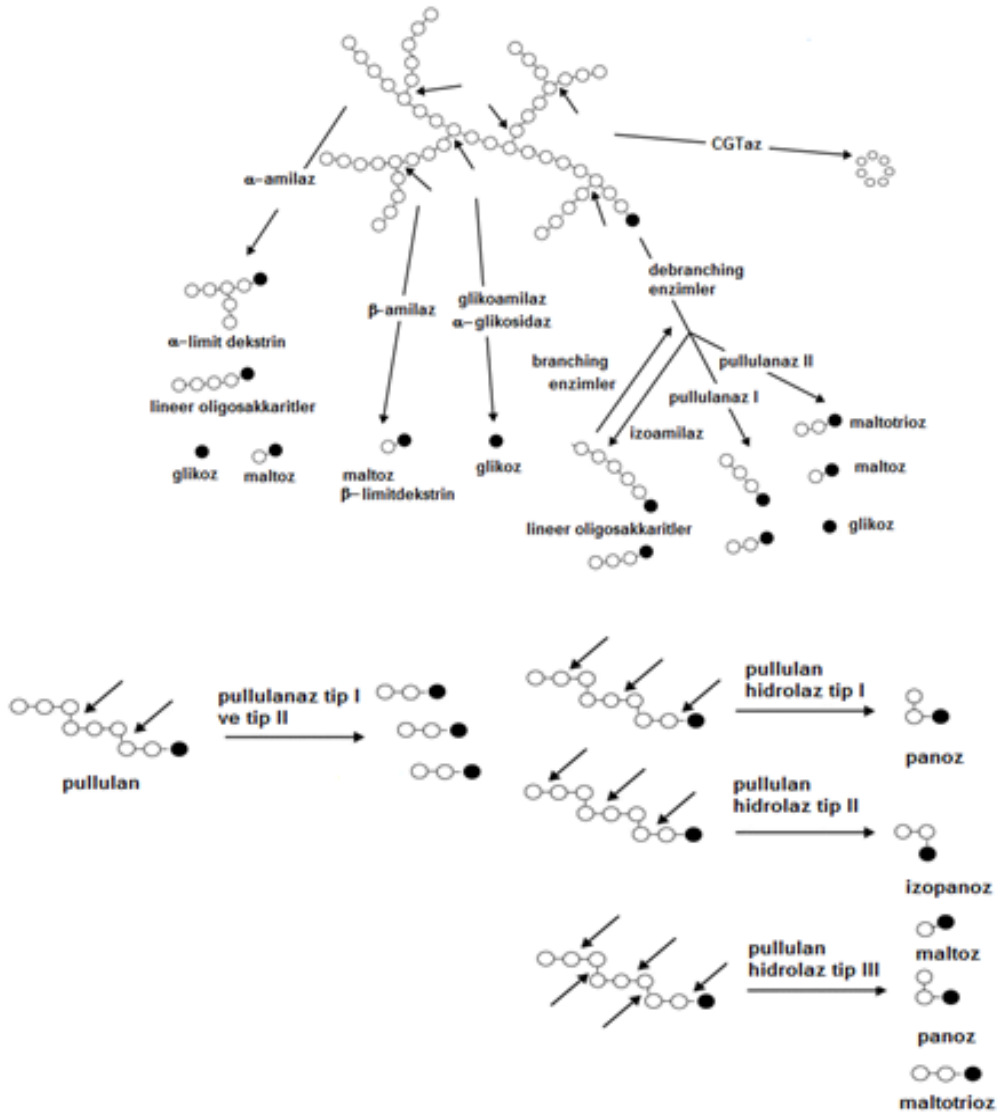
Şekil 2.1. Pullulanın kimyasal yapısı

Pullulan düşük kalorili bir polisakkarittir ve memeli amilazlarına gösterdiği direnç nedeniyle memeliler tarafından tüketildiğinde diyet lifi olarak rol oynamaktadır. Hem katı hem sıvı gıda ürünlerine nişasta yerine eklenebilmektedir. Gıdaların bozulmasına sebep olan bakteri ve küfler tarafından sindirilebilir karbon kaynağı olarak değerlendirilememektedir ve bu nedenle gıdaların raf ömrünü geliştirmektedir. Ayrıca pullulan, su tutma açısından nişastadan daha üstündür ve gıdaların kuruyarak bozulmasını geciktirmektedir (Singh 2008).

2.2. Pullulanaz Enzimi

Pullulanın α -1,6 glikozidik bağlarını hidrolize edebilen enzimler pullulanazlar olarak tanımlanmıştır. Substrat spesifitesi ve ürün şablonuna göre pullulanazlar, tip I ve tip II olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Pullulanaz tip I (EC 3.2.1.41), pullulanda ve dallanmış oligosakkaritlerde α -1,6 bağlarını spesifik olarak hidrolize etmektedir. Yıkılma ürünleri maltotrioz ve lineer oligosakkaritlerdir. Pullulanaz tip I, α -glukanların (amiloz gibi) α -1,4 bağlarına etki etmemektedir. Pullulanaz tip II (veya amilopullulanaz), pullulan tip I gibi, pullulan ve dallanmış oligosakkaritlerdeki α -1,6 bağlarını hidrolize edebilmektedir. Ayrıca dallanmış ve lineer polisakkaritlerin α -1,4 bağlarını da hidrolize etme yeteneğine sahiptir. Pullulanaz tip II' nin amilopektin üzerine etkisi sonucu glukoz, maltoz ve maltotrioz gibi küçük şekerler oluşmaktadır. Daha önce tanımlanan pullulanazların aksine, pullulan hidrolaz tip I ve tip II' nin, pullulan ve dallanmış substratlarda bulunan α -1,6 bağlarını hidrolize etme yetenekleri yoktur. Pullulanın α -1,4 bağlarını kırmaktadır ve ürün olarak panoz ve izopanoz oluşturmaktadır. Pullulan hidrolaz tip I diğer adıyla neopullulanaz (EC 3.2.1.135), pullulanı panoza (α -6-D-glikozilmaltoz) parçalamaktadır. Pullulan hidrolaz tip II diğer adıyla izopullulanaz (EC 3.2.1.57), pullulanı izopanoza (α -6-D-maltozilglikoz) parçalamaktadır. En son pullulan hidrolaz tip III tanımlanmıştır. Bu arkeal enzim pullulanın α -1,4- ve α -1,6-glikozidik bağlarını parçalayarak maltotrioz, panoz ve maltoz oluşturmaktadır (Bertoldo ve Antranikian 2002).

Pullulanazlar gibi izoamilazlar da (EC 3.2.1.68) α -1,6 glikozidik bağlarını hidrolize ederek dallanmayı kıran enzimlerdir. Pullulanazlar ile izoamilazlar arasındaki temel fark, pullulanı hidrolize etme yeteneğidir. Pullulanazlar, pullulan ve amilopektindeki α -1,6 glikozidik bağlarını hidrolize edebilme yeteneğine sahiptir fakat izoamilaz sadece amilopektindeki α -1,6 glikozidik bağlarını hidrolize edebilmektedir (Maarel vd 2002). Ayrıca α -amilaz (1,4- α -D-glukan glukanhidrolaz, EC 3.2.1.1) α -1,4 bağlarını hidrolize eder, fakat α -amilaz da pullulana karşı hiçbir aktivite göstermez (Moubasher vd 2010).



Şekil 2.2. Nişastayı ve pullulanı hidroliz eden enzimlerin etki şablonu (Bertoldo ve Antranikian 2002)

2.3. Pullulanaz Enziminin Kullanım Alanları

2.3.1. Gıda sanayisinde kullanım alanları

Pullulanın enzimatik hidrolizi ile maltotriozca zengin şurup üretiminde pullulanazdan yararlanılmaktadır. Bu şurup, düşük donma noktası, hafif tatlılığı, nemde tutulması, gıda ürünlerinde nişastanın retrogradasyonunu önlemesi; maltoz şurubu,

glikoz şurubu ve sakkarozaya göre daha az renk oluşumuna sebep olması; sıcaklık stabilitesinin iyi olması, düşük çözelti viskozitesi, yüksek fermente edilebilirliği ve camsı hali desteklemesi gibi, gıda ve ilaç sanayisinde önemli olan pek çok mükemmel özelliğe sahiptir. Gıda sanayisinde tatlı üretimi, fırıncılık ve biracılıkta; ilaç sanayisinde damar içi beslenmede glikoz yerine kullanılabilir (Singh vd 2010).

Pullulanazın en yaygın endüstriyel uygulaması glukoz ve maltoz şurubu üretimidir. Sakkarifikasyon işlemi sırasında, sırasıyla glucoamilaz ve α -amilaz ile birlikte kullanılır (Bertoldo 1999). Nişastadan glikoz üretmek için glucoamilaz enzimi ile birlikte; maltoz üretimi için α -amilaz enzimi ile birlikte kullanılmaktadır.

Sakkarifikasyon işlemi sırasında pullulanazın ilave edilmesi substrat konsantrasyonunu artırmakta, reaksiyon süresini kısaltmakta ve ürün verimini artırmaktadır (Nair vd 2006).

Glucoamilaz ve pullulanaz enzimleri sakkarifikasyon işleminde aynı anda kullanıldığında, glucoamilaz sadece lineer α -1,4-glikozidik bağlarını hidrolize ederken, pullulanazın spesifik olarak amilopektin kalıntılarının dallanma noktasını kırması daha etkili sakkarifikasyon işlemi mümkün kılmaktadır. Sonuç olarak ulaşılan depolimerizasyon seviyesi daha yüksektir. Glucoamilazla birlikte pullulanaz kullanımının pratik avantajı daha az glucoamilaz aktivitesinin kullanılmasıdır. Bu da % 60'a varan oranda daha az glucoamilaz kullanımını sağlamaktadır. Bu sayede glucoamilaz enziminin katalize ettiği, D-glikozun izomaltoza polimerizasyonu daha az gerçekleşmektedir (Ling vd 2009).

Fırın ürünlerinde bayatlamayı önleyici ajan olarak kullanılan α -amilazın hafif doz aşımı halinde ekmekte yapışkanlık meydana gelmektedir. Pullulanaz, yapışkanlıktan sorumlu bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlayarak bu problemi ortadan kaldırmaktadır (Van Der Maarel vd 2002).

2.3.2. Diğer kullanım alanları

Dallanmış siklodekstrin üretimi, pullulanazın ilginç ve yüksek ekonomik değere sahip bir uygulama alanıdır. Siklodekstrinler ve maltozil-siklodekstrin ve glikozil-siklodekstrin gibi dallanmış siklodekstrinler, sadece glikoz birimlerinden oluşan homojen siklik oligosakkaritlerdir (Salleh vd. 2006). Siklodekstrinler ve dallanmış siklodekstrinler değişken materyalleri stabilize etmede, koku maskelemede ve çözünemeyen veya az çözünen ilaçların çözünür hale getirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tanimoto vd 2005).

2.4. Pullulanaz Enzimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Son zamanlarda endüstriyel uygulamaların teşviki ile, bir çok pullulanaz tanımlanmış ve çalışılmıştır (Erra-Pujada vd 2001). Yapılan çalışmalarda, *Bacillus sp.* US149 (Roy vd 2003), *Bacillus sp.* KSM-1876 (Hatada vd 2001), *Bacillus sp.* KSM-1378 (Ara vd 1995), *Bacillus sp.* S-1 (Lee vd 1997) izolatları, pullulanaz enzimini üreten mezofil karakterli organizmalardır. Ayrıca termofil karakterli *Bacillus thermoleovorans* US105 (Messaoud vd 2002), *Bacillus sp.* DSM 405 (Brunswick vd 1999), *Clostridium thermosulfurogenes* SV9 (Swamy ve Seenayya 1996) izolatlarının ve hipertermofil karakterli *Fervidobacterium pennavorans* Ven5 (Bertoldo vd 1999) izolatının da pullulanaz enzimi ürettiği tespit edilmiştir.

Farklı kaynaklardan izole edilen pullulanaz enziminin moleküler ağırlığının geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir. Genelde, pullulanaz tip I'in moleküler ağırlığı 70-80 kDa arasında iken, pullulanaz tip II'nin moleküler ağırlığı 100-210 kDa arasında değişmektedir (Kim vd 2000).

Stefanova vd (1999), Lee vd (1997) ve Ara vd (1995) pullulanaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine Ca^{++} iyonlarının bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Fakat Ling vd (2009) tarafından yapılan çalışmada 2mM Ca^{++} ilavesi ile pullulanaz aktivitesinde %70 artış kaydedilmiştir. Saha vd (1988) yaptıkları çalışmanın sonucunda pullulanaz enziminin aktivitesi için Ca^{++} iyonuna ihtiyaç duymadığı fakat enzimin termal stabilitesinde ve konformasyonunun korunmasında önemli rol oynuyor

olabileceğini bildirmişlerdir. Leveque vd (2000), Ca⁺⁺ iyonlarının pullulanaz enzimini stabilize etme ve aktifleştirme mekanizması üzerine herhangi bir sonuca varılamadığını bildirmiştir.

Çizelge 2.1’de farklı kaynaklardan elde edilen pullulanaz enzimlerine ait özellikler özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı pullulanaz kaynakları ve izole edilen enzimlere ait bazı özellikler

Kaynak	MA ¹ (kDa)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	En zimin tipi	Referans
<i>Fervidobacterium Pennaovorans</i> VEN 5	77	6.0	85	I	Koch vd. 1997
<i>Bacillus thermoleovorans</i> US105	Te ²	5.6	75	I	Messaoud vd. 2002
<i>Bacillus sp.</i> US149	200	5.0	60	II	Roy vd. 2003
<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	97	5.5	60	Te	Stefanova vd. 1999
<i>Bacillus sp.</i> DSM 405	126	6.0	70	II	Brunswick vd. 1999
<i>Bacillus sp.</i> S-1	140	9.0	60	I	Lee vd. 1997
<i>Desulfococcus mucosus</i>	74	5.0	85	II	Duffner vd. 2000
<i>Thermus</i> IM6501	80	6.0	70	I	Kim vd. 2000
<i>Exiguobacterium sp.</i> MAAC-1	Te	9.0	60	I	Salleh vd. 2006

¹Moleküler ağırlık; ²Tespit edilmedi

Bunlara ilaveten pullulanaz enzimlerinde dikkat çeken bir özellik, tüm pullulanaz tip I enzimlerinde bulunan ve YNWGYDP olmak üzere yedi aminoasitten oluşan korunmuş bölgedir (Bertoldo vd 2004). Pullulanaz tip II enzimleri bu korunmuş bölgeyi içermemektedir (Bertoldo vd 1999). Yamashita vd (1997), bu korunmuş bölgenin α -1,6 glikozidik bağlarının degradasyonunda veya enzimin substrata bağlanmasından sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir.

2.5. Konukçu Suş *Pichia pastoris* ile Rekombinant Protein Üretimi

Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* rekombinant protein üretimlerinde kullanımı oldukça yaygın olan ökaryotik konukçu sistemdir (Higgins ve Cregg 1998). *P. pastoris* yabancı proteinlerin üretiminde gerek akademik olarak gerekse endüstriyel boyutta oldukça ilgilenilen bir organizmadır (Cereghino ve Cregg 1999).

Rekombinant protein üretimlerinde konukçu olarak *P. pastoris* kullanımının sağladığı bazı avantajlar şöyle sıralanabilir; (1) verimli ve sıkı denetim altında çalışan *AOX1* promotorunun mevcut oluşu, (2) glikozilasyonun genellikle en fazla 20 adet kalıntı ile ve nispeten daha kısa zincirli N bağlı yüksek-mannozlu oligosakaritlerle gerçekleşmesi, (3) entegrasyonu sağlanan genlerin çoklu kopyalar halinde bulunduğu kararlı yapıda transformantların elde edilebilmesi, (4) yabancı proteinleri yüksek seviyelerde salgılayabilme yeteneği ve (5) yüksek hücre yoğunluklu üretime uygunluğu ve ölçek büyütmenin kolay oluşudur (Demain 2005).

P. pastoris'de yabancı bir genin ekspresyonu 3 temel aşamada gerçekleşir: (a) ekspresyon vektörüne genin sokulması, (b) ekspresyon vektörünün *P. pastoris* genomuna sokulması ve (c) yabancı geni potansiyel olarak ekspres eden suşların seçilmesidir. Yabancı bir DNA sekansının ekspresyon vektörüne sokulması ise genelde *E.coli*'de yapılmaktadır. Bu yüzden *P. pastoris*'in tüm ekspresyon vektörleri *E.coli/P. pastoris* mekik(shuttle) vektörüdür. Bakteride kalabilmesi için bakteriyel replikasyon orijini içerir (Cereghino vd 2001).

Yabancı proteinlerin salgılanması için bazı ekspresyon vektörleri salgılama sinyalini kodlayan sekanslar içerir. Bunlar yabancı gen ile aynı çerçeve içindedir. Genellikle bu salgılama sinyalleri; *P. pastoris* asit fosfataz (PHO1) ve *S. cerevisiae* α -mating faktör (α -MF) olmaktadır.

Bu çalışmada, *S. cerevisiae* α -mating faktörü içeren pPICZ α A ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Konukçu organizma olarak ise metanol kullanımı doğal tipe göre daha yavaş olan *P. pastoris* KM71H suşu seçilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

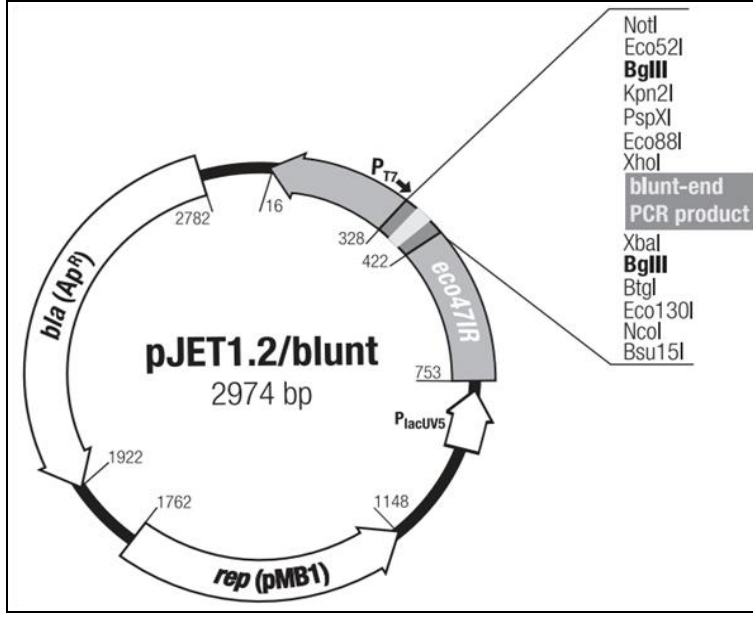
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri ve maya suşları

Gen kaynağı olarak kullanılması düşünülen yerel izolatlar, Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde tamamlanmış bir çalışma ile Erem vd. (2009) tarafından elde edilmiştir. Pozitif kontrol ve B planı kapsamında değerlendirilen *Bacillus subtilis* PY22 suşu, Nebraska Üniversitesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü'nde görevli Prof. Dr. Andrew Benson tarafından sağlanmıştır.

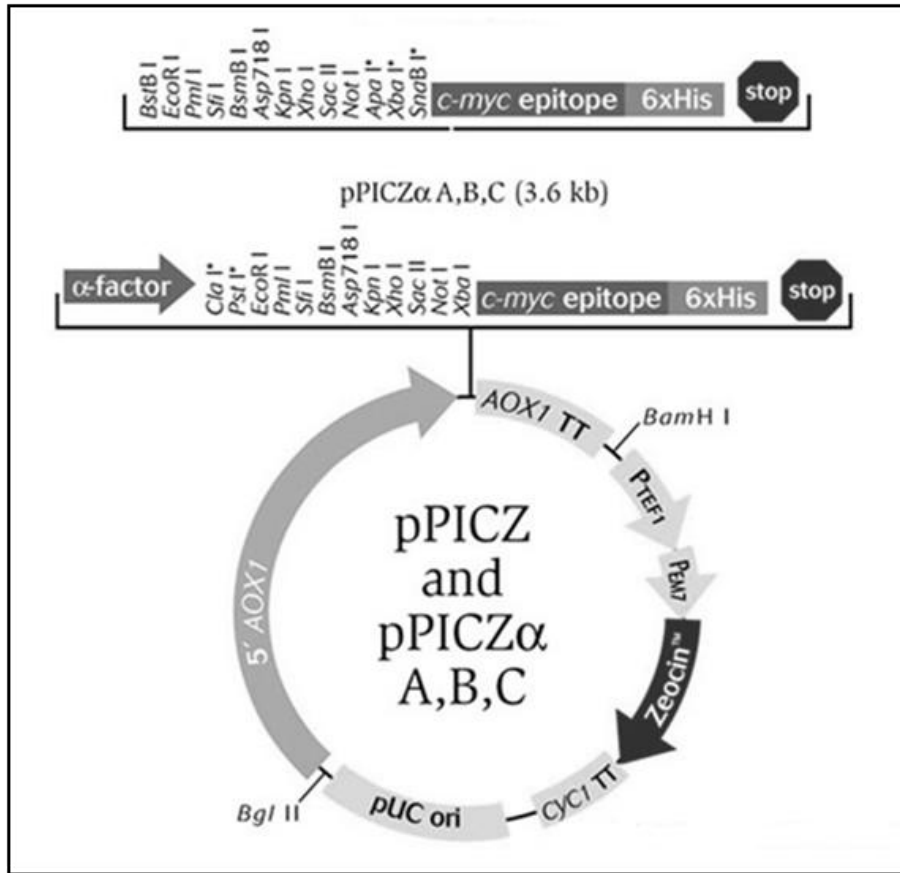
Yapılan çalışmalarda plazmitlerin çoğaltılması amacı ile transformasyona elverişli *E. coli* suşu olan DH5 α (Invitrogen, CA, ABD) kullanılmıştır. Rekombinant enzim üretiminde kullanılmak üzere, konukçu sistem olarak *Pichia pastoris* KM71H (arg4 aox1::ARG4) (Invitrogen, CA, ABD) suşu kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan taşıyıcı plazmitler

Küt uçlu DNA parçalarının ligasyonu için pJET 1.2 (Fermentas, MD, ABD) klonlama vektörü kullanılmıştır. Hücre dışı protein üretimi için, *P. pastoris* pPICZ α A (Invitrogen, CA, ABD) ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Şekil 3.1' de pJET 1.2 plazmidinin, şekil 3.2' de pPICZ α A plazmidinin haritası ve endonükleaz kesim bölgeleri verilmiştir.



Şekil 3.1. Küt uçlu DNA parçalarının ligasyonu için kullanılan pJET1.2 plazmidini



Şekil 3.2. Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pPICZαA plazmidini

3.1.3. Kimyasallar ve enzimler

Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazları ve bunların tampon çözeltileri Fermantas (MD, ABD) firmasından temin edilmiştir. Endonükleazlar kullanılırken üretici firmanın talimatları uygulanmıştır. Farklı şekilde belirtilmediği takdirde kullanılan kimyasalların tamamı Sigma-Aldrich (MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Çalışmalarda aksi belirtilmediği takdirde Japon Firması olan Hayashibara tarafından hibe yolu ile temin edilen pullulan kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Temel moleküler biyoloji yöntemleri

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

3.2.1.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için, Luria Bertani (LB) Lennox agar üzerinde geliştirilen saf kültürdeki tek koloniden alınarak, 4 mL LB Lennox sıvı besiyerine ekim yapılmıştır ve bir gece geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Çalkalamalı inkübatör (Excella E24, New Brunswick Scientific, NJ, ABD) kullanılarak tüplerde veya engelli erlenlerde geliştirilen kültür sıvısı santrifüjlenerek hücre peleti elde edilmiştir ve hücrelerden DNA izolasyonu MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Pelet, hücre parçalayıcı enzimlerle muamele edilerek hücre lizati elde edilmiştir. Lizatta bulunan proteinler uygun çözeltili kullanılarak çöktürülerek uzaklaştırılmıştır ve daha sonra peletlenen DNA da yıkandıktan sonra TE tamponunda çözülmüştür. İşlemler sırasında >10 000 g kapasiteli Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) ve soğutmalı gerektiğinde Allegra 25R (Beckman Coulter, CA, ABD) santrifüj ekipmanları

kullanılmıştır. Elde edilen DNA izolatları PCR ve Southern blot analizlerinde kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.1.2. Polimeraz zincir tepkimesi (PZR)

Çalışmalarda gerçekleştirilen tüm PZR reaksiyonları için TGradient (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) thermocycler (ısı döngü cihazı) ve KOD HotStart DNA polymerase (Novagen, Almanya) enzim kiti kullanılmıştır.

Kullanılan gradient PZR cihazında, reaksiyon için kullanılacak primerlerin bağlanma sıcaklık aralıkları, primerlerden düşük erime sıcaklığına sahip olan primerin bağlanma sıcaklığının (T_m) $\pm 5^\circ\text{C}$ olacak şekilde programlanmıştır. Yürütülen çalışmada PZR analizlerinde kullanılan primerler ve bunlara ait bazı özellikler Ek 8.2'de verilmiştir.

PZR cihazında amplifikasyon süresi, beklenen PZR ürünün kb çinsinden büyüklüğü göz önünde tutularak DNA polimeraz kit'inde öngörülen süre belirlenmiştir. Kapak sıcaklığı tepkime süresince 99°C 'de tutulmuş ve tepkime sonrasında tüplerin bekleme sıcaklığı ise 4°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Gradient PZR denemelerinde 35 döngü içeren düz program kullanılmıştır. Çizelgede uygulanan döngü programı için uygulanan şartlar verilmiştir.

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

Isı Döngü Program Akışı			
Sıra	Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)	Süre (sn.)	Döngü Komutu
1	94	120	
2	94	30	
3	$T_m \pm 5$	30	
4	70	15-150	34 kere 2.'ye git.
5	72	300	
6	4	∞	

3.2.1.3. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin varlığı/doğruluğu ve restriksiyon endonükleazları ile yapılan kesimlerin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel hazırlanırken, 1×TAE tampon çözeltisine (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) %1 oranında agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilerek çözündürülmüştür. Hazırlanan bu çözeltiye 1 µl/50 mL etidiyum bromür çözeltisi (10 mg/mL) ilave edilmiştir. Uygun ebatta ve şekilde seçilen jel kalıplarına dökülerek jel donuncaya kadar beklenmiş ve jel bloğu elde edilmiştir. Jel kuyularına yüklenecek örnekler 5 µl örneğin ve 1 µl 6× Loading Dye jel yükleme tamponunun ultra saf su ile seyreltilmesiyle toplam 10-20 µl hacimde hazırlanmıştır. Jel bloğu 1×TAE tampon içinde tutularak örnekler jel kuyularına yüklenmiştir. Daha sonra elektroforez uygulaması ile DNA örnekleri jel içinde yürütülmüştür. Elektroforez uygulamaları 120 V doğru akım altında, 45-90 dak. süreyle gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel içinde moleküler büyüklüklerine göre yatay bantlara ayrılan DNA molekülleri etidiyum bromür varlığında UV ışık (312nm) kaynağından yararlanılarak jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmant E-Box-VX2) ile görüntülenmiştir. Agaroz jel işlemlerinde markır olarak (M) GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır.

3.2.1.4. Ligasyon ve transformasyon

Transformasyon işlemlerinde, CaCl₂ metodu ile kimyasal transformasyona yetenekli hale getirilmiş *E.coli* DH5α suşu kullanılmıştır. Kimyasal transformasyon işlemleri buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

E.coli DH5α suşu kimyasal transformasyona uygun hale getirilmesi için CaCl₂ metodu ile transformasyona yetenekli hale getirilmiştir. Kimyasal transformasyona uygun bakteri hücrelerine yapılan transformasyon işlemleri buz üstünde gerçekleştirilmiştir. Buz üstünde tutulan hücrelere 1-5 µl plazmit çözeltisi veya ligasyon karışımı doğrudan ilave edilmiş ve 30 dak. süre ile buz üzerinde inkübe edilmiştir. Hücrelere 42°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda (Techne Dri-Block DB-2D) 60 sn tutularak ısı şoku uygulanmış ve tekrar buz üzerinde 5 dak. inkübe edilmiştir. Daha sonra 200 µl

sıvı Luria-Bertani (LB) Miller (5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 10 g/L NaCl) veya sıvı Luria-Bertani (LB) Lennox besiyerinden 5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 5 g/L NaCl) ilave edilen hücreler, 1 saat süreyle 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücre sıvısı 100 µg/mL Ampisilin içeren LB Miller agar veya 25 µg/mL Zeosin içeren LB Lennox agar petrilere yayma yöntemi ile ekilmiştir. Petriler bir gece 37 °C'de üremeye bırakılmıştır.

P. pastoris hücrelerinin elektroporasyona uygun hale getirilmesi için lityum asetat metodu kullanılmıştır (Wu ve Letchworth 2004). Maya hücrelerine yapılan elektrokimyasal transformasyonda hücreler buz üstünde bekletilerek çözündürülmüştür. Üzerine lineer hale getirilmiş DNA parçası veya plazmitlerden 1-10 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Ardından buz üstünde bekletilerek soğutulmuş 2 mm yüzey genişliğine sahip elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmıştır. Eppendorf Eporator (Eppendorf Eporator 4309) cihazında 1500 V gerilimde ve 5 ms süre ile elektrotransformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Akım uygulanan hücreler derhal buz üzerine alınarak 1 ml soğuk 1 M sorbitol çözeltisi ilave edilmiştir. Temiz 1.5 ml hacimli mikro santrifüj tüplerine alınan karışım 1 saat 30°C'de inkübe edildikten sonra 100 µg/mL Zeosin ilaveli YPD plakalarına yayma ekim yapılmış ve transformasyon petrilere kolonilerin gelişimi için 2-3 gün süre ile 30°C'de inkübe edilmiştir.

Ligasyon işlemlerinde üretici firmanın önerdiği kullanım talimatları doğrultusunda plazmit ve ligasyonu yapılmak istenen DNA parçasının molar oranları 1:3 veya 1:5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm ligasyon reaksiyonları 15-25 µl toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemlerinde Fermentas (Fermentas, MD, ABD) ve Roche (Roche, Almanya) ligasyon kitleri kullanılmıştır.

3.2.1.5. Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu yapılacak bakteriler 3-4 mL uygun antibiyotikli sıvı besiyerinde 37°C'de 18-20 saat geliştirilmiştir. Plazmit izolasyonu işlemlerinde QIAprep®Spin Miniprep Kiti (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. Plazmit izolasyonu üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elüsyon işlemleri 50 µl

10 mM Tris (pH 8.0) ile yapılmıştır. Plazmit izolasyonu esnasında santrifüj işlemleri > 20 000 g hızda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Plazmit izolasyonlarının kalitesi ve doğruluğu restriksiyon endonükleazlar ile yapılan uygulamalar ile agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve daha sonra DNA miktarları belirlenmiştir.

3.2.1.6. PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılmasında MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. İşlemler, kit'in talimatları izlenerek gerçekleştirilmiştir. Elüsyon 10-20 µl 10mM Tris (pH 8) ile yapılmıştır. İşlemler sırasında santrifüj için > 20 000 g hızda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı kullanılmıştır.

3.2.1.7. Jelden DNA parçalarının ekstraksiyonu

DNA parçaları %1'lik düşük erime noktalı agaroz jelde (SeaKem, FMC Bioproducts, ME, ABD) yürütülmüş ve istenen bant jelden kesilmiştir. Jel özütleme işlemleri için MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. İşlemler üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemleri >20,000 g hızda Centrifuge 5424 (Eppendorf, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.8. SDS-PAGE ve Western blot analizi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Owl P8D8 (Thermo Scientific) cihazı ile %5 poliakrilamid yükleme jeli ve %7.5 poliakrilamid ayırma jeli olacak şekilde hazırlanarak yürütülmüştür.

Örnekler, toplam hacim 25 µl olacak şekilde protein üretiminden alınan süpernatantların 1:3'ü oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 Bromphenol Blue, %40 Glycerol, 100 mM DTT) ile karıştırılması ve 70 °C'de 10 dakika denatüre edilmesi ile hazırlanmıştır. Ardından 20 µl'lik kısmı jele yüklenmiştir.

Elektroforez işlemi, 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, %0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 150 V değerinde 60 dakika yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, IRDye Blue Protein Stain (Odyssey) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, saf su ile 15 dakika yıkandıktan sonra LiCor (Odyssey) ile görüntülenmiştir.

Western blot analizi yapılacaksa, jelde yürütme işleminden hemen sonra proteinler, Owl HEP-1 Electroblotter (Thermo Scientific) kullanılarak 60 dakika süre ile 20 V gerilim uygulanarak PVDF membrana (Millipore) aktarılmış ve oda sıcaklığında gece boyu kapatma tamponu (0.2xPBS+%0.1 Casein) ile orbital çalkalayıcının üzerinde muamele edilmiştir.

Polihistidin etiketli proteinin tespit edilmesi için primer antikor olarak Penta-His Antibody (Mouse anti-(H)5, Qiagen), sekonder antikor olarak Goat-Anti Mouse IRDye800cw (Licor) Antibody kullanılmıştır. Hibridizasyon işlemi tamamlandıktan sonra membran Licor'da (Odyssey) 800nm dalga boyunda taranarak görüntülenmiştir.

3.2.1.9. Southern blot analizi

Yerel bakteri izolatlarından genomik DNA izolasyonu yapılmış ve farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Restriksiyon işleminin ardından %0.8 agaroz jele yüklenen örnekler 120V gerilimde 2 saat 1×TAE tamponu içinde yürütülmüştür.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel 45dak. denatürasyon çözeltisi (1.5M NaCl, 0,5M NaOH) ile ardından 30 dak. nötralizasyon çözeltisi (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA) ile orbital çalkalayıcı üzerinde muamele edilmiştir. Bu işlemin sonunda DNA'nın naylon membrana transferi gerçekleştirilmiştir.

Naylon membran (20×20 cm Positively Charged Nylon Membran, Roche, ABD), 10×SSC blotlama tamponu (3M NaCl, 0.3M Sodyum Sitrata, 1mM EDTA) ile ıslatılmıştır. Southern blot düzeneği kurulmuş ve membran, jelin alt yüzü ile temas

edecek şekilde jelin üzerine yerleştirilmiştir. Transfer işlemi yaklaşık olarak 3 saat sürmüştür.

Transfer işleminin ardından membran oda sıcaklığında 5 dakika kurutulmuş ve ultraviyole çapraz bağlayıcı (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, CA, ABD) ile 3 kez 120mJ UV ışını uygulanarak DNA molekülleri membran üzerine bağlanmıştır. Hibridizasyon işlemi ile devam edilmiştir. Membran, 41°C'de 1 saat ön hibridizasyon çözeltisi (DIG Easy Hyb, Roche, Almanya) ile muamele edilmiştir. Ardından DIG etiketli probu içeren hibridizasyon çözeltisi eklenerek aynı sıcaklıkta gece boyu hibridizasyona bırakılmıştır. Hibridizasyon sırasında spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak için hibridizasyon işlemimin sonunda yıkama işlemleri gerçekleştirilir. Hibridizasyon tüpüne önce birinci yıkama çözeltisi (2×SSC+%0.1 SDS) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5'er dakika olmak üzere işlem iki kez tekrar edilmiştir. Ardından 68°C'de 15'er dakika olmak üzere 2 kez ikinci yıkama çözeltisi (0.5×SSC+%0.1 SDS) ile muamele edilmiş ve immünojenik tayine geçilmiştir.

Membran, işleme uygun bir kaba alınarak, orbital çalkalayıcı üzerinde 1 saat kapatma tamponu (1×DIG Blocking Solution, Roche) uygulanmıştır. Yıkama tamponu (0.1M Maleik asit pH 7.5, %0.3 (v/v) Tween 20) ile 2 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra 1 saat anti-DIG-Alkalın Fosfataz antikor çözeltisi ile muamele edilmiştir. Yıkama işleminden sonra 5 dak. dedeksiyon tamponunda (0.1M Tris pH 9.5 ve 0.1M NaCl) bekletilmiştir. Ardından dedeksiyonu gerçekleştirmek için, membran şeffaf propilen zar içine yerleştirilerek üzerine CSPDR (alkalin fosfataz substratı, Roche) damlatılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dak. ardından 37 °C'de 10 dak. inkübe edildikten sonra X-ışını film kasedine yerleştirilmiştir. Sonraki işlemler karanlık odada gerçekleştirilmiştir. X-ışını filmi ile üst üste 20-60 dak. inkübe edildikten sonra Kodak film geliştirme çözeltileri ile muamele edilerek görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.10. Koloni hibridizasyonu

Southern blot analizi ile genomik DNA restriksiyon enzimleri ile parçalanmış ve aranılan genin bulunma olasılığı olan bölgeler prob ile belirlenmiştir. Bu sonuca göre

belirlenen restriksiyon enzimi ile genomik DNA yeniden kesilerek jelde önceki koşullarda yürütülmüştür. Önceki analizde belirlenen bölge jelden kesilerek, DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon analizinde kullanılan enzim ile pUC18 plazmidi de kesilmiş ve ekstrakte edilen DNA fragmentleri ile ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve transformasyona yetenekli *E.coli* hücrelerine aktarılmıştır.

Transformasyon sonucu elde edilen koloniler numaralandırılmış iki plakaya kopya halinde ekilmişlerdir ve 1 gece 37°C’de inkübe edilmişlerdir.

Plaka boyutlarına uygun şekilde kesilmiş pozitif yüklü membran, plakanın üzerine doğrudan bırakılmıştır. Düzgün şekilde kaldırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dak. kurutulmuştur. Ardından %10 SDS çözeltisi ile doyurulmuş Whatman kağıtları üzerinde 3 dakika, Southern blot analizinde kullanılan denatürasyon ve nötralizasyon çözeltileriyle doyurulmuş Whatman kağıtları üzerinde sırası ile 5’er dak. ıslatılmıştır. Ardından 10×SSC tamponu içeren bir kaba alınarak orbital çalkalayıcı üzerinde 10 dak. muamele edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dak. kurutulduktan sonra çapraz bağlayıcıda 3 kez 120 mJ UV ışını uygulanarak DNA’nın membrana bağlanması sağlanmıştır. Hibridizasyon, immünojenik tayin ve görüntüleme Southern blot analizinde olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Diğer biyokimyasal analizler

3.2.2.1. Rekombinant proteinin saflaştırılması

Protein (pullulanaz) hücre dışı ve polihistidin etiketli üretilmiştir. Hücreler, 96 saat metanol indüksiyonunun ardından 6000 g’de 5dak. santrifüjlenerek çöktürülmüştür ve elde edilen süpernatandan histidin etiketli proteinin pürifikasyonu için HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific Pierce, IL, ABD) kullanılmıştır. Kitin talimatları doğrultusunda işlemler gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırma prensibine göre histidin etiketli proteinler, nikel kolonda bağlanarak, etiketsiz proteinlerden ayrılmaktadır. Kolonda bağlanmış proteinler, 100 mM PBS (pH

7.4) (phosphate-buffered saline) içinde farklı imidazol konsantrasyonları içeren hazırlanmış solüsyonlar ile muamele edilerek yıkanmış ve ardından elüsyonları gerçekleştirilmiştir. Elüsyon çözeltisinde bulunan imidazolun uzaklaştırılması için diyaliz membranı (Skin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, Thermo Scientific, IL, ABD) kullanılarak %5 gliserol içeren 100 mM PBS içinde, +4°C'de gece boyu diyaliz gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi, SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir.

3.2.2.2. Pullulanaz aktivitesinin tayini

Pullulanaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesinde Hyun ve Zeikus (1985) tarafından kullanılan DNS yöntemi bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Yöntemin esası, pullulanın parçalanması ile açığa çıkan indirgen şekerlerin ölçülmesine dayanmaktadır.

Reaksiyon karışımı, 200µl enzim çözeltisi ve 200µl substrat çözeltisi (100mM pH 6 potasyum fosfat tamponunda hazırlanmış %1 pullulan) ile hazırlanmıştır. Karışım 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonunda 800µl DNS çözeltisi (%1 DNS, %30 sodyum potasyum tartarat tetrahidrat ve 400mM NaOH) eklenerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır. Ardından 100°C'de 5 dak. inkübe edilerek renk gelişimi sağlanmış ve spektrofotometrede 540nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri kaydedilmiştir. Okuma işlemi sırasında kör olarak, 0.dak.'da DNS solüsyonu eklenerek aktivitesi durdurulmuş olan aynı reaksiyon karışımı kullanılmıştır.

Pullulanaz enzim aktivitesi için 1 ünite, yukarıda belirtilen koşullar altında 1 ml enzimin 1 dakikada açığa çıkardığı glikoz cinsinden indirgen şeker miktarının mikromolar cinsinden ifadesi olarak tanımlanmıştır (Salleh vd. 2006).

3.2.2.3. Rekombinant enzimin karakterizasyonu

Iqbal'in (1994) çalışması modifiye edilerek, rekombinant enzimin çalışma koşullarının belirlenmesi için optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH araştırılmıştır. Öncelikle 37°C'de optimum pH değeri belirlenmiş, bunun için pH 3-10 aralığındaki

enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için sodyum-asetat (pH 3-6); sodyum- fosfat (pH 7-8) ve glisin-NaOH (pH 9-10) tampon sistemleri kullanılmıştır.

Belirlenen optimum pH'da farklı sıcaklıklarda (4-70°C) enzim reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve enzimin çalıştığı optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Enzimin termal stabilitesinin ölçülmesi için, enzim reaksiyondan önce farklı sıcaklık (30-70°C) ve sürelerde (15, 30 ve 60dak.) inkübe edilmiş ve enzimin kalan aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.2.4. Hidroliz ürünlerinin tayini

Enzim substrat etkileşimi sonucunda açığa çıkan hidroliz ürünleri ince tabaka kromatografisi (TLC, Thin Layer Chromatography) yöntemi ile Reddy vd. (1998)'e göre modifiye edilerek saptanmıştır. Piyasadan hazır satın alınmış 20x20 ebatlarındaki hazır TLC plakaları (Merck 5567) kullanılmıştır. Plakalar analizden önce 80°C'de 3 saat ısıtılarak aktifleştirilmiştir.

TLC tankına çözen çözeltilisi (n-butanol, asetik asit, distile su karışımı; 3:1:1) analizden 30dak. önce doldurulmuş ve tankın çözen buharı ile doyması sağlanmıştır. Hidroliz ürünleri saptanacak olan reaksiyon karışımı DNS metodunda anlatıldığı gibi hazırlanmış ve gece boyu inkübe edilmiştir. Örnekler plakaya çözgenin 1 cm daha yüksekinde olacak şekilde yüklenmiştir. Plaka TLC tankına yerleştirilmiştir ve yürütme işlemi çözen seviyesi plaka üst sınırına 1 cm kalana kadar sürdürülmüştür. İşlem yaklaşık 3 saatte tamamlanmıştır.

Oda sıcaklığında kurutulmuş olan plakaya (0.5g difenilamin ve 0.5ml anilinin 50ml aseton içinde çözüldükten sonra kullanılmadan hemen önce 10ml fosforik asit eklenmesi ile hazırlanan) görüntüleme çözeltilisi püskürtülmüştür ve 80°C'de 4 saat inkübe edilerek ürünlerin görünür hale gelmesi sağlanmıştır.

3.2.2.5. Toplam protein ölçümü

Hücre süpernatantlarının protein içeriği Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific, IL, ABD) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu test sırasında protein konsantrasyonu, örneklerle birlikte okutulan bir seri BSA standart solüsyonlarının (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml) absorbans değerleri referans alınarak belirlenmiştir. Protein miktarları ölçülecek olan hücre özütleri, reaksiyon ayıracağı ile 1:15 oranında karıştırılmış, 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra UV spektrofotometre cihazında (Biochrom Libra S50, İngiltere) 660 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Paralel olarak ölçülen standart serisinden elde edilen absorbans değerleri ile çizilen standart grafiğinden, bilinmeyen örneğin protein miktarı hesaplanmıştır. Deneysel sırasında elde edilen standart grafiklerinden biri Şekil 8.2'de örnek olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Bakterilerin Pullulanaz Üretme Yeteneklerinin Kalitatif Yöntemle Taranması

Bu projeye altyapı oluşturacak ön denemeler daha önce tamamlanmış bir çalışma ile sünmüş ekmekten izole edilen *Bacillus* soyları ile yapılmıştır. Bu izolatlar, pullulanaz enzimini üretme potansiyelleri bakımından kalitatif yöntemle taranmıştır. Yöntemin esası, pullulanın etanolle çöktürülmesine dayanır ve buna bağlı olarak hücre dışı pullulanaz üreten hücrelerin çevresinde berrak zon oluşumu gözlenir. Ön denemelerde, 27 izolat taranmış ve K1, K4, K5, N2, N12 ve N16 izolatlarının çevresinde berrak zon oluştuğu gözlenmiştir. Diğerlerine göre daha geniş zona sahip olan N16 suşunun gen kaynağı olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür. Şekil 4.1’de pullulan agarın etanol ile çöktürülmesinden sonra N16 izolatının çevresinde gözlenen zonlar görülebilmektedir.



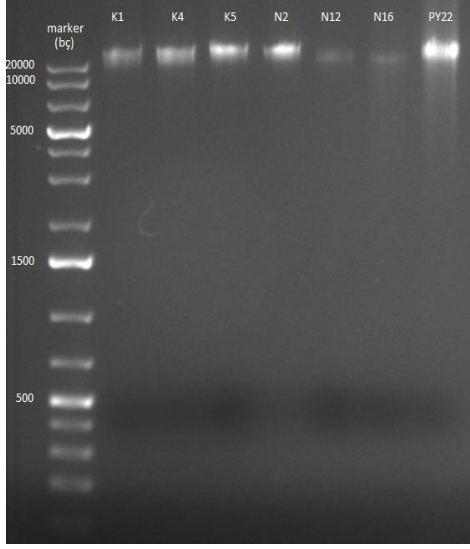
Şekil 4.1. *Bacillus sp.* N16 izolatı ve pullulanlı agarda zon görünümü

4.2. Yerel İzolatlardan Pullulanaz Genini Klonlama Çalışmaları

4.2.1. DNA izolasyonu

Kalitatif test sonucunda plakada çevresinde zon gözlenen dolayısı ile potansiyel pullulanaz üretici olabileceği düşünülen bakteri suşlarından (K1, K4, K5, N2, N12 ve N16) ve analizlerde pozitif kontrol olarak kullanılacak olan *Bacillus subtilis* PY22 (*B. subtilis* 168 mutantı) suşundan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Bakterilerden elde edilen genomik DNA izolatlarının jel görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir. Jelde

kontrol edilen genomik DNA izolatları daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır.



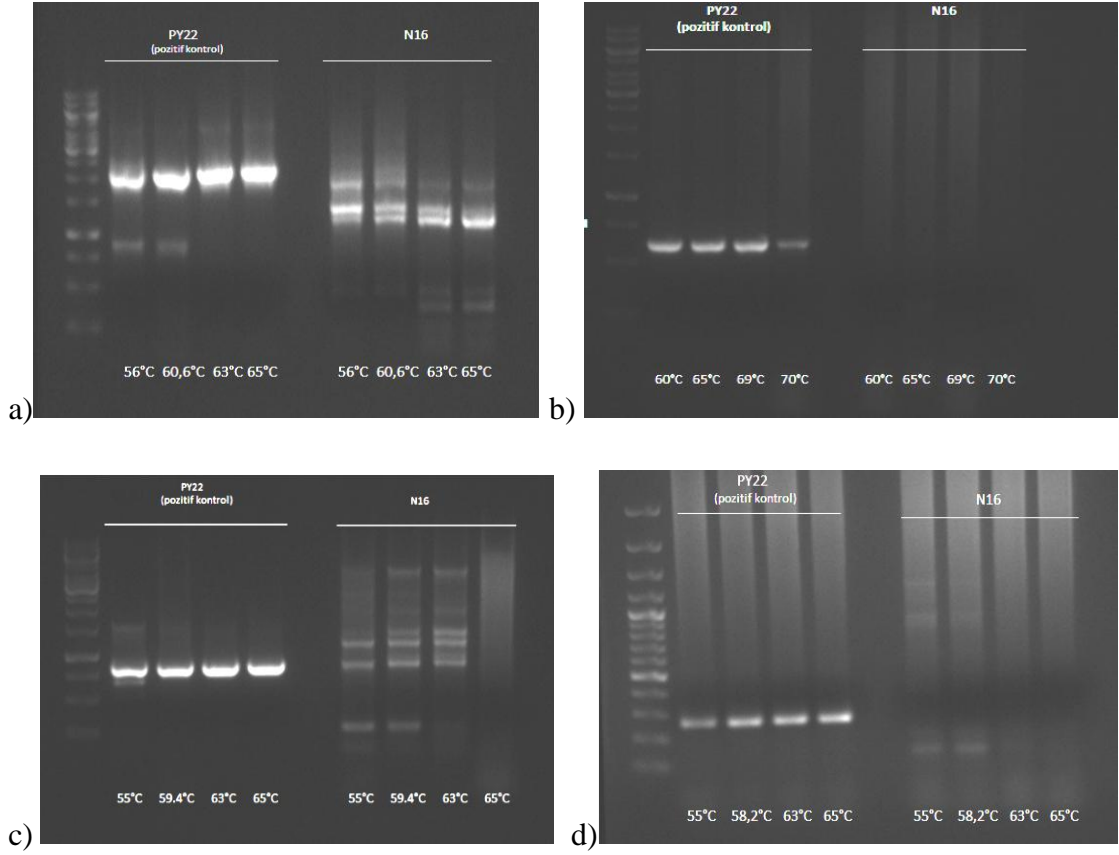
Şekil 4.2. Bakterilerden izole edilen genomik DNA'ların jel görüntüsü

4.2.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile genin amplifikasyon denemeleri

NCBI GenBank BLAST tarama motoru kullanılarak, yakın *Bacillus* türlerine ait pullulanaz gen dizilerinin homolog bölgelerine göre farklı primerler tasarlanmıştır (Ek 8.2'de de verilen WGF1, WGR1, PrF1, PrR1, PrF2, PrR2) ve gen bulmaya yönelik çalışmalara ilk olarak PZR denemeleri ile başlanmıştır. Kalitatif pullulanaz aktivitesi testlerinde plakada en geniş zon verdiği için, ilk olarak N16 genomik DNA'sı PZR denemelerinde kalıp DNA olarak kullanılmıştır. N16 izolatı ile farklı primer çiftleri kullanılarak farklı primer bağlanma sıcaklıklarında gerçekleştirilen PZR analizlerinin sonucu elde edilen jel görüntüleri aşağıda verilmiştir. Şekil 4.3'de verilmiştir.

PZR analizinde pozitif kontrol olarak kullanılan PY22 genomik DNA'sı ile tüm PZR reaksiyonlarında başarılı şekilde gerçekleşmiştir. WGF1 ve WGR1, pullulanaz genini tüm gen halinde amplifiye etmek için denenmiş primer çiftidir fakat Şekil 4.3.a'da görüldüğü gibi N16 genomik DNA'sından spesifik olmayan ürünler çoğalmıştır. Geni içinden çoğaltmak üzere tasarlanmış primerler farklı kombinasyonlar

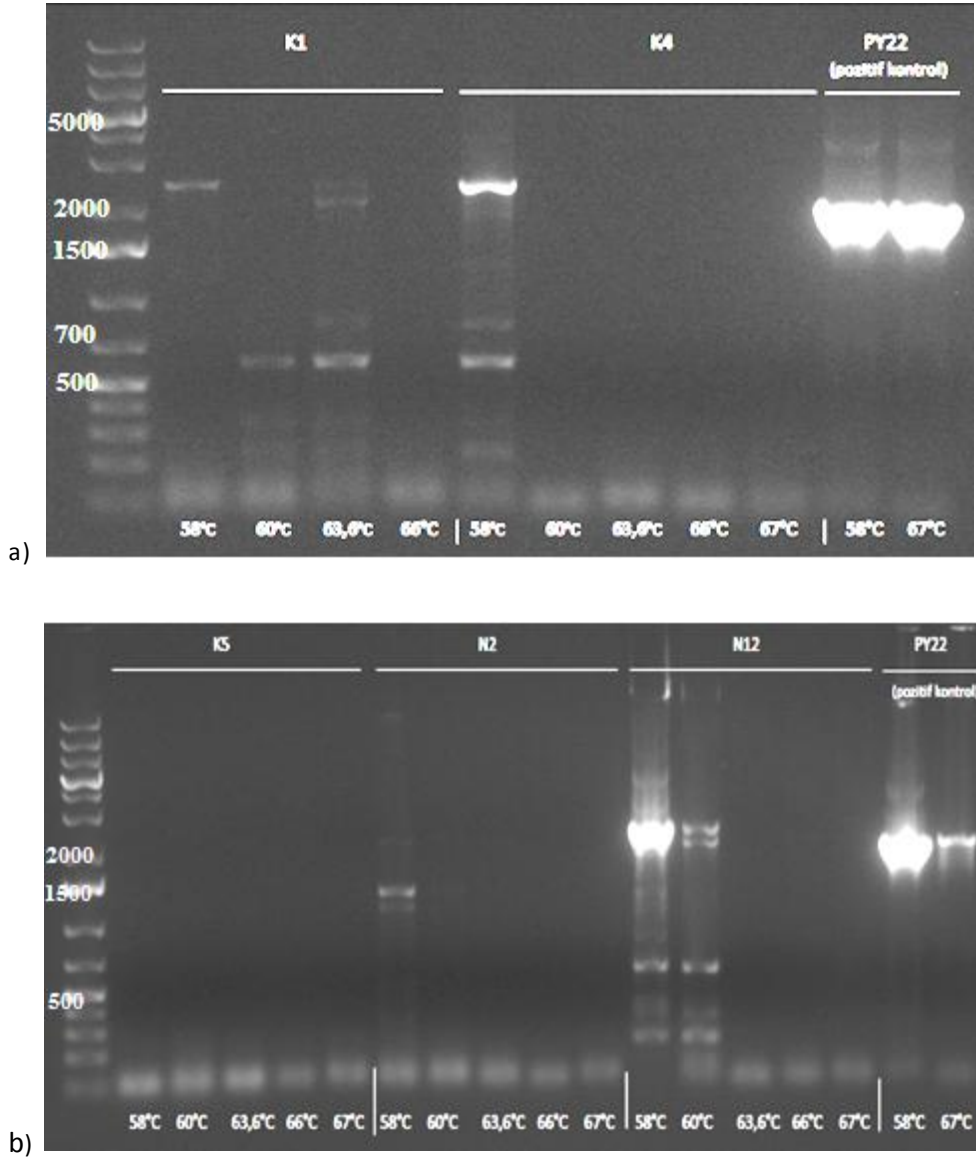
halinde (Şekil 4.3 b, c ve d) denenmiş fakat N16 DNA kalıbı ile spesifik ürün elde edilememiştir.



Şekil 4.3. a) WGF1-WGR1 b) PrF1-PrR2 c)PrF1-PrR1 d)PrF2-PrR1 primer çiftleri ile PY22 (pozitif kontrol) ve N16 genomik DNA'ları ile gerçekleştirilen PZR'den elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüleri

Bunun üzerine diğer izolatların (K1, K4, K5, N2, N12) genomik DNA'ları ile PZR analizlerine devam edilmiştir. Şekil 4.4'de bu analizlerin jel görüntülerinden bazıları verilmiştir.

K1, K4, K5, N2 ve N12 izolatlarının genomik DNA'sı ile hem geni iç bölgelerden çoğaltmak için tasarlanmış primerler (PrF1, PrR1, PrF2, PrR2) hem de tüm geni elde etmek için tasarlanmış primerler (WGF1, WGR1) ile PZR gerçekleştirilmiştir. K1, K4, K5, N2 ve N12 genomik DNA'ları ile içten tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlarda PZR ürünü elde edilememiştir ve bu sebeple jel görüntüsü verilmemiştir.



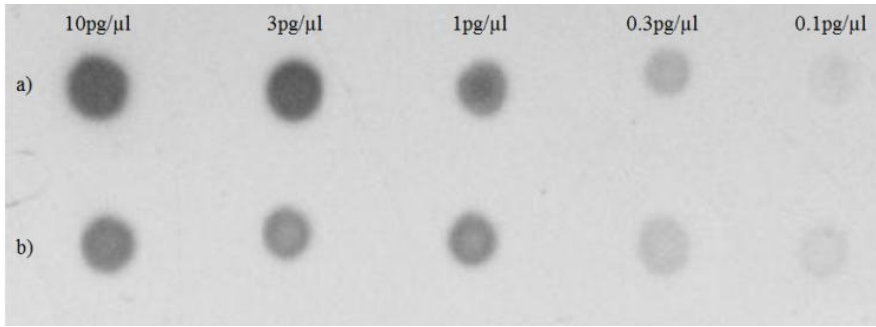
Şekil 4.4. a) K1 ve K4 b) K5, N2 ve N12 izolatları ile WGF1-WGR1 primerleri kullanılarak yapılan PZR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Şekil 4.4’de aynı izolatlar ile tüm geni çoğaltmak için yapılan reaksiyon sonucu elde edilen jel görüntüsü verilmiştir. Burada Şekil 4.4a ve 4.4b’de görüleceği üzere K1, K4, K5 ve N2’den spesifik ürün çoğalmamıştır ancak N12 izolatının 58°C primer bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen reaksiyonu sonucunda pozitif kontrolde çoğalan ürün (yaklaşık 2200 bp) ile yakın büyüklükte ürün çoğaldığı görülmektedir (Şekil 4.4.b). Bu nükleotid uzunluğu pullulanaz geni için beklenen niceliktedir. Fakat reaksiyon tekrar edildiğinde aynı ürün tekrar elde edilememiştir. Olumsuz sonuçlanan

bu PZR denemeleri için jel görüntüleri verilmemiştir. Bunun üzerine geni bulmaya yönelik çalışmalara Southern blot yöntemi ile devam edilmiştir.

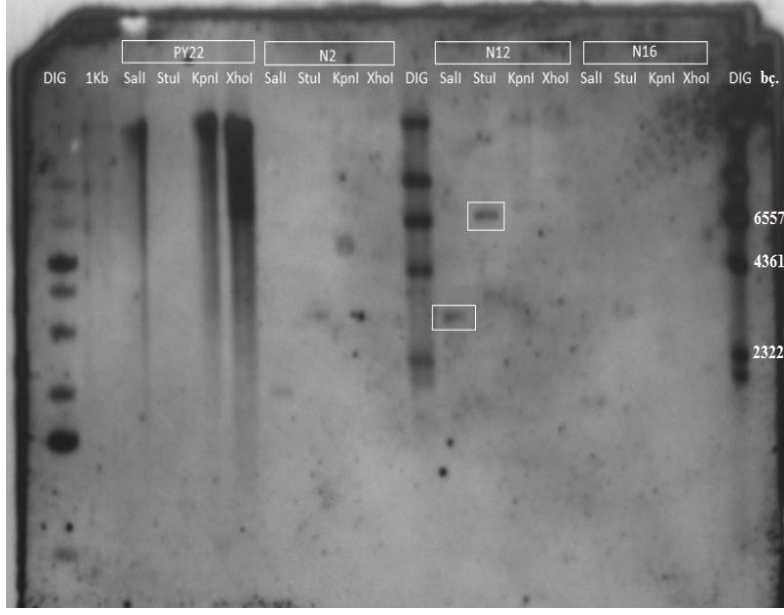
4.2.3. Southern blot yöntemi ile genin izolasyonu denemeleri

Southern blot analizinde kullanılan prob, *B. subtilis* PY22 genomik DNA'sından PrF1-PrR2 primerleri ile çoğaltılan yaklaşık olarak 635 bp büyüklüğündeki PZR ürününün digoksinin (DIG) ile etiketlenmesi ile elde edilmiştir. Etiketleme işlemi için DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Etiketlenen probun etkinliği ölçülmüştür ve standart DIG probu ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5). Prob, 0.1 pg/μl konsantrasyona kadar tespit edilebilmiştir. Bu sonuç üretilen probun iyi çalıştığını göstermektedir.



Şekil 4.5. PY22 pullulanaz geninin iç bölgesinden elde edilen probun etkinliğinin ölçülmesi a) DIG etiketli DNA standardı b) PY22 probu

N2, N12, N16 ve PY22 genomik DNA'ları, farklı restriksiyon endonükleazları (Sall, StuI, KpnI ve XhoI) ile kesilerek %0.8'lik agaroz jelde 100V'da 2 saat yürütülmüştür. Jelde ayrımı sağlanan DNA'lar Southern blot metoduna uygun olarak membrana aktarılmış ve PY22 pullulanaz geninin iç bölgesinden hazırlanmış DIG etiketli prob ile hibridizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen X-ışını film görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir.

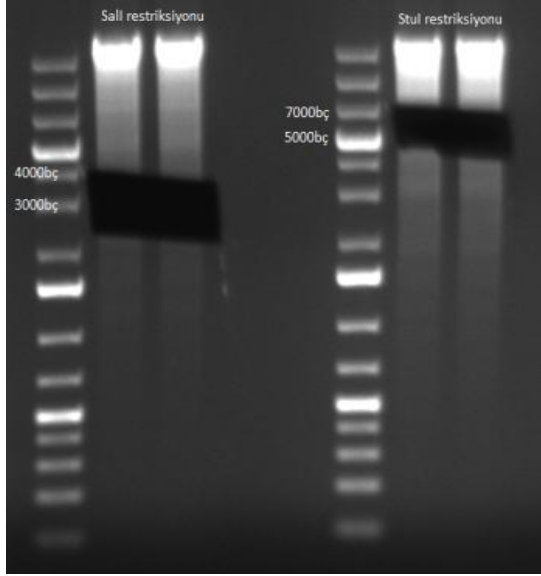


Şekil 4.6. PY22, N2, N12, N16 genomik DNA'larının Southern blot-DIG etiketleme sonucu X-ışını film görüntüsü

Elde edilen görüntüde PY22 genomuna ait kısımda probun şerit boyunca bağlanabildiği görülmekte, bunun da PY22 genomik DNA'sı ile kesimin tam olarak gerçekleşemediği için olduğu düşünülmektedir. N12 genomik DNA'sının Sall ve Stul kesimi sonucu, belirgin, moleküler ağırlığı tahmin edilen gen büyüklüğünden daha yüksek ve tek bant halinde olan DNA fragmanları gözlenmiştir. N2 ve N16'da ise gözlenen bantların silik ve tahmin edilen gen büyüklüğünden daha düşük moleküler ağırlıkta olması nedeni ile bu suşlar üzerinde daha fazla durulmamıştır.

N12 genomik DNA'sının Sall kesimi sonucu elde edilen bandın, DIG etiketli markıra göre 2322-4361 bç bantları arasında yer aldığı ve büyüklüğünün yaklaşık 3300 bç olduğu görülmektedir. Aynı izolatin Stul kesimi ile elde edilen bandın ise DIG etiketli markırda bulunan 6557 bç büyüklüğündeki bant hizasının biraz üzerinde olduğu gözlenmiştir.

N12 genomik DNA'sı Sall ve Stul enzimleriyle kesilerek aynı şartlarda tekrar jelde yürütülmüştür. Southern blot sonucunda bandın gözlendiği pullulanaz genini içerdiği düşünülen bölge jelden kesilerek alınmış ve jel ekstraksiyonu ile içerdikleri nükleik asitler izole edilmiştir. Şekil 4.7'de jelden kesilen bölgeler görülmektedir.



Şekil 4.7. N12 genomik DNA'sının Sall ve StuI kesimi sonrası yürütülen jelden ekstraksiyon için gerekli bölgeler alındıktan sonra çekilen görüntü

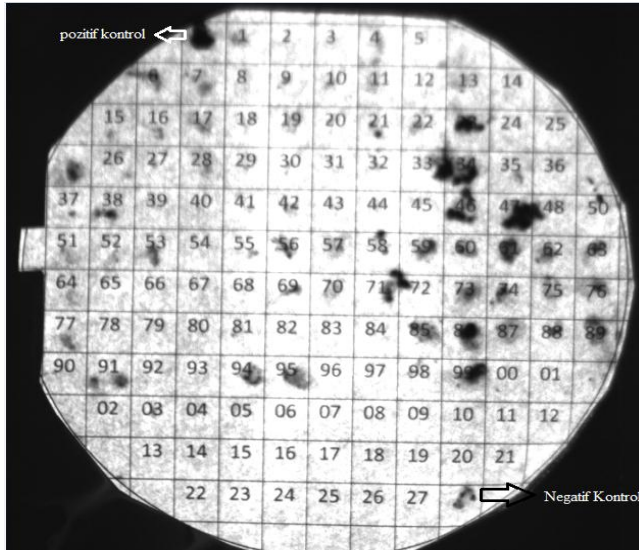
Jelden ekstrakte edilen StuI ile kesilmiş DNA fragmanları, pJET vektörüne; Sall ile kesilmiş DNA fragmanları ise Sall ile doğrusal hale getirilmiş ve defosforile edilerek ligasyona hazırlanan pUC18 plazmid vektörüne bağlanarak kimyasal transformasyona yetenekli *E. coli* hücrelerine transfer edilmiştir. Ampisilin içeren katı besiyerinde pJET transformasyonundan 79 koloni, pUC18 transformasyonundan 14 koloni gelişmiştir.

4.2.4. Koloni hibridizasyonu

Transformantlar, ampisilin içeren LB miller agar plakaya numaralandırılmış halde 2 kopya olarak ekilmişlerdir. pJET plazmidi içeren *E. coli* hücreleri 6-85 ile numaralandırılmış karelere, pUC18 plazmidi içeren *E. coli* hücreleri ise 86-99 ile numaralandırılmış karelere çizilerek ekilmiştir. Pozitif kontrol olarak PY22 pullulanaz genini içeren pJET plazmitini taşıyan *E. coli* hücresi 0 nolu kareye. Negatif kontrol olarak, ampisilin içeren besiyerinde gelişebilecek ancak herhangi bir gen aktarılmamış pUC18 plazmidi içeren *E. coli* hücresi 128 nolu kareye çizilerek ekilmiştir. Geliştirilen hücreler, yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde koloni hibridizasyonu ile pozitif yüklü membrana aktarılmış, Southern blot yönteminde belirtildiği gibi hibridizasyon ve dedeksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon işleminde prob olarak daha

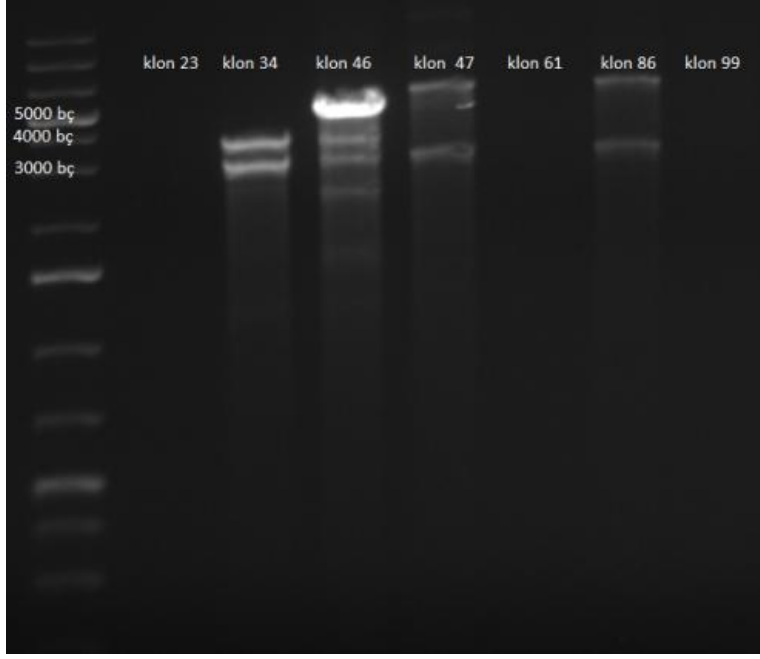
önceki Southern blot analizinde kullanılan, PY22 pullulanazının iç bölgesinden çoğaltılmış, 635 bp. büyüklüğündeki DIG etiketli PZR ürünü kullanılmıştır.

Dedeksiyon işlemi sonucunda elde edilen X-ışını film görüntüsü Şekil 4.8’de verilmiştir. Pozitif kontrol ile aynı yoğunlukta gözlenen koloniler seçilerek saf sıvı kültür halinde geliştirilmiştir. pJet içeren 23, 34, 46, 47 ve 61 numaralı klonlar ile pUC18 içeren 86 ve 99 numaralı klonlar kopya plakadan, ampisilin içeren 3 mL LB miller besiyerine inoküle edilmiştir ve 37°C’de 18 saat inkübasyonun ardından plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.8. Koloni hibridizasyonu ile elde edilen membranın X-ışını film görüntüsü

Plazmide giren DNA fragmentini kontrol etmek için, pJET plazmitleri (23,34, 46, 47 ve 61) BglIII, pUC18 plazmitleri (86 ve 99) Sall enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonrası yürütülen agaroz jelinin görüntüsü Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. Plazmitlerin restriksiyon enzimleri ile kontrolü

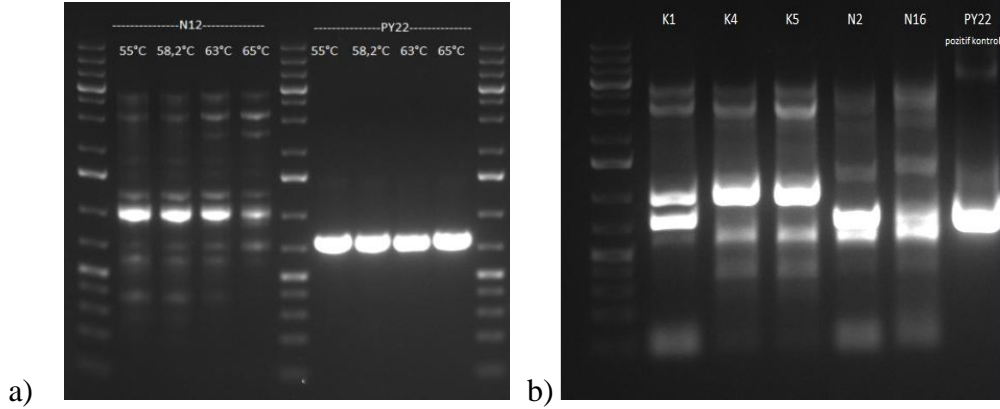
Elde edilen 23, 34 ve 99 numaralı klonlarda plazmit bulunmadığı görülmektedir. İçine fragmanın entegre olduğu gözlenen 4 klondan (34, 46, 47 ve 86) plazmit izolasyonu yapılmış ve plazmit izolatları dizileme merkezine (RefGen, Ankara) gönderilmiştir. Dizileme sonucu elde edilen verilerin NCBI GenBank Blast tarama motoruna göre, *B. amyloliquefaciens* mikroorganizmasına ait farklı gen (pullulanaz enzimi dışında) bölgelerini kodlayan dizilerle homoloji gösterdiği görülmüştür. Koloni kaldırma analizi sonucu elde edilen veriler, *Bacillus* sp. kaynaklı pullulanaz genini bulmaya yönelik yanlış pozitif (false positive) sonuç vermiştir. Bu durum, kullanılan probun pullulanaz dışı bölgelerle hibridize olma yeteneği bulunmasından kaynaklanmış olabilir.

Bunun üzerine, farklı *Bacillus* cinslerine ait pullulanaz genleri arasında homoloji gösteren bölgelerden yeniden primer tasarlanarak, yerel izolatlarda PZR denemeleri ile devam edilmiştir. Ayrıca aynı çalışma (Erem 2007) ile elde edilmiş olan 5 izolat (BK07, N10, K6, K18 ve N19) daha çalışmalara dahil edilmiştir.

4.2.5. Yeni primerlerle ve diğer yerel bakteri izolatlarında PZR denemeleri

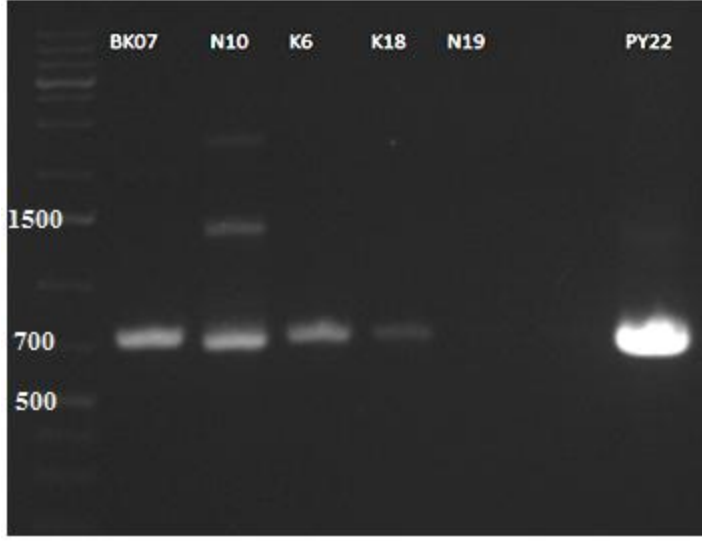
NCBI GenBank BLAST tarama motoru kullanılarak, farklı *Bacillus* türleri arasındaki homoloji gösteren bölgelerden yeniden primer tasarımı yapılmıştır. Yeni primerlerle öncelikle, önceki izolatlara ait (N2, N12, N16, K1, K4 ve K5) genomik DNA'ların reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Yerel izolat N12'de Southern blot analizlerinde de umut verici sonuçlar elde edildiğinden PZR analizinde öncelik verilmiş ve farklı primer bağlanma sıcaklıklarında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. N12 genomik DNA'sı ve 2F-4R primerleri ile elde edilen reaksiyon ürünlerinin yürütüldüğü jel görüntüsü 4.10a'da verilmiştir. Fakat şekilden de görüldüğü gibi spesifik ürün elde edilememiştir. Aynı primer çifti ile N2, N12, K1, K4 ve K5 izolatlarında da 58°C primer bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda da yine spesifik ürün elde edilememiştir (Şekil 4.10b).



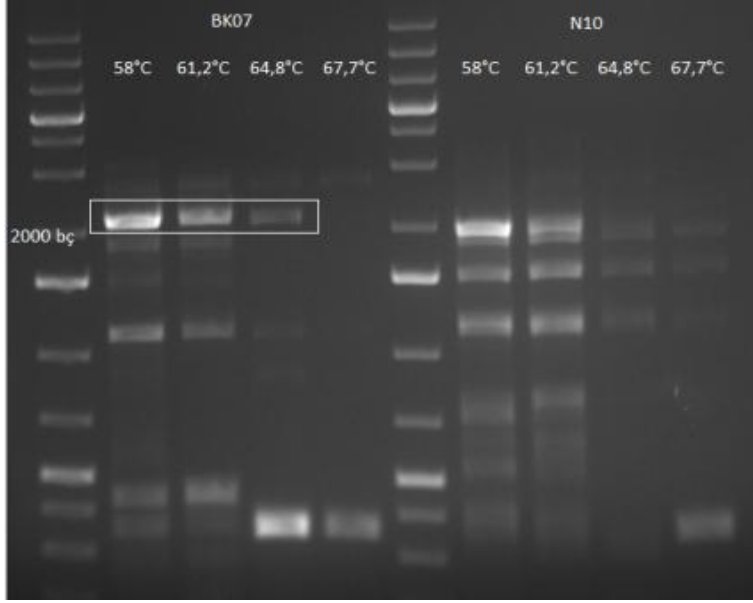
Şekil 4.10. Geni içinden çoğaltan 2F-4R primerleri kullanılarak **a)** N12 genomik DNA'sı ile **b)** K1, K4, K5, N2, N16 genomik DNA'ları ile yapılan PZR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü. Pozitif kontrol: PY22

Çalışmaya sonradan ilave edilen BK07, N10, K6, K18 ve N19 genomik DNA'ları ve 2F-4R primerleri ile 58°C primer bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu sonunda, BK07, N10, K6, K18 izolatlarında PY22 reaksiyonundan (pozitif kontrol) elde edilen ürünle aynı büyüklükte (teorik olarak 716 bç) ürün elde edilmiştir. N19 izolatında ise reaksiyon ürünü gözlenememiştir.



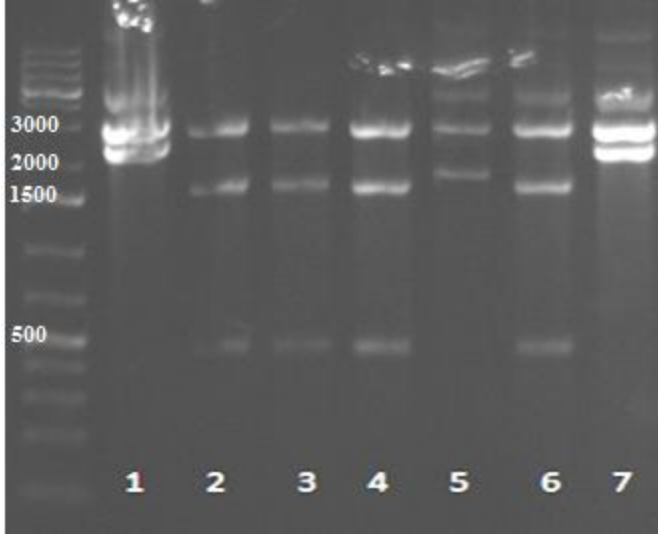
Şekil 4.11. 2F-4R primerleri kullanılarak BK07, N10, K6, K18 ve N19 genomik DNA'ları ile yapılan PZR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü. Pozitif kontrol: PY22

Şekil 4.11'de BK07 ve N10 genomik DNA'ları ile elde edilen PZR ürünlerinin daha konsantre üretilmiş olması nedeni ile daha spesifik bir ürün olduğu düşünülmüştür. Ardından BK07 ve N10 genomik DNA'ları kalıp olarak kullanılarak, genin daha büyük bir kısmını elde etmeyi sağlayacak olan ve başlangıç kodonunu da içeren pulATGF-5R primerleri ile yeniden PZR gerçekleştirilmiştir. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında gerçekleştirilen bu PZR sonunda beklenen ürün teorik olarak PY22'ye göre yaklaşık 2100 bp uzunluğundadır. Bu PZR ile elde edilen ürünlerin jel görüntüsü şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. pulATGF-5R primerleri kullanılarak BK07 ve N10 genomik DNA'ları ile yapılan PZR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi BK07 genomik DNA'sı ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda teorik olarak yaklaşık 2100 bç uzunluğunda olması beklenen DNA parçası gözlenmiştir. Fakat N10'da yaklaşık 2000 bç uzunluğunda ürün gözlenmiştir. Bunun üzerine BK07'de üretilmiş olan yaklaşık 2100 bç uzunluğundaki ürün jelden ekstrakte edilmiştir. Elde edilen DNA parçası pJET1.2 klonlama vektörüne bağlanarak transformasyona elverişli *E.coli* XL1 blue hücrelerine aktarılmıştır. Elde edilen transformantlardan rastgele 7 adedi seçilerek, bu hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Seçilen 7 koloni sırası ile BK21, BK22, BK23, BK24, BK25, BK26 ve BK27 olarak adlandırılmıştır. Şekil 4.13'de bu plazmitlerin *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesilerek kontrol edildiği agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Kolonilerden elde edilen plazmitler aşağıda sırası ile 1-7 olarak numaralandırılmıştır.



Şekil 4.13. BK21-BK27 klonlarından elde edilen 1-7 plazmitlerin *Bg*III restriksiyon enzimi ile kontrolü

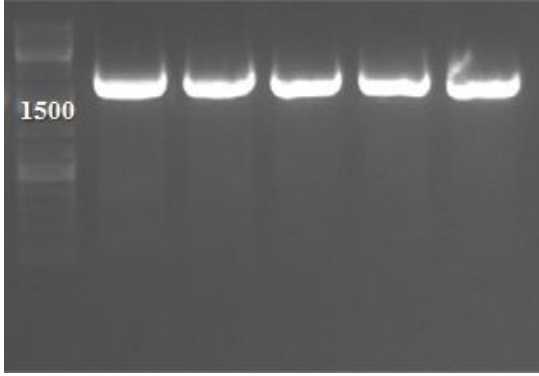
Şekil 4.13'te de görüldüğü gibi 1 ve 7'de yaklaşık 2100 bç (PZR ürünü) ve 2900 bç uzunluğunda DNA parçası (pJET1.2 vektörü); 2, 3, 4 ve 6'da ise 500 bç, 1600 bç ve 2900 bç (pJET1.2 vektörü); 5 nolu plazmitte ise 1900 bç (PZR ürünü) ve 2900 bç (pJET1.2 vektörü) uzunluğunda DNA parçaları elde edilmiştir. Kesim sonucunda farklı ürünler elde edilen BK24 ve BK27 klonlarına ait sırası ile 4 ve 7 nolu plazmitler dizileme merkezine gönderilmiştir. Dizilemeden gelen sonuca göre BK24 plazmitinde bulunan DNA parçasının, *B. subtilis* PY22 pullulanaz geni ile %75 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

4.2.6. BK07 ve PY22 pullulanaz genlerinin izole edilerek klonlama (pJET1.2) ve ekspresyon (pPICZαA) vektörlerine ligasyonu

Dizilenen ve pullulanaz genine ait olduğu belirlenen DNA parçasının pullulanaz başlama kodonu bulunmaktadır fakat genin sonlandırma kodonu bulunmamaktadır. Literatürde genin son bölgesinde aktiviteden sorumlu bir bölge ya da substrat bağlanma noktasının olduğuna dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle farklı *Bacillus* türlerinin pullulanaz genlerine ait homoloji gösteren bölgelerinden yararlanılarak, dizilemeden gelen sekansın son birkaç aminoasitini de (5R primerinden

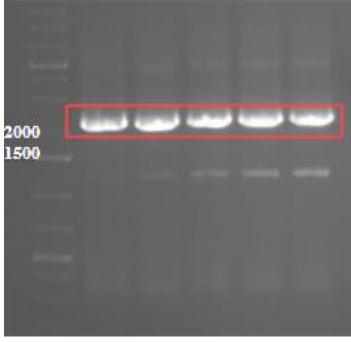
gelen) kapsayacak şekilde sonlandırma kodonu içeren yeni bir primer tasarlanmış ve puladpSTOP olarak adlandırılmıştır (Ek 8.3’de sekansları verilmiştir).

Kalıp DNA olarak pJET-BK24 kullanılarak, XhoIF ve puladpSTOP primerleri ile PZR gerçekleştirilmiş ve teorik olarak 2200 bp büyüklüğünde olması beklenen, BK07 pullulanaz geni (BKpul) elde edilmiştir. PZR ürününün agaroz jel görüntüsü şekil 4.14’de verilmiştir. Elde edilen gen pJET1.2 klonlama vektörüne bağlanarak transformasyona elverişli XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır. Elde edilen plazmit pJET-BKpul olarak isimlendirilmiştir.



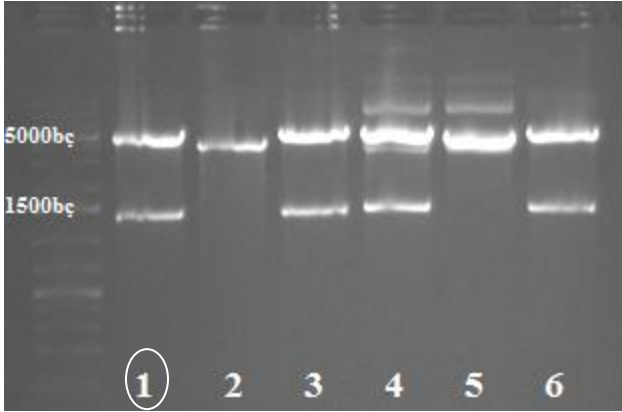
Şekil 4.14. XhoIF-puladpSTOP primerleri ile pJET-BK24 plazmitinden çoğaltılan pullulanaz geni: BKpul

Histidin etiketlemek için, histidin etiketli BK07stopht primeri ve XhoIF primeri ile BKpul PZR ürünü kalıp olarak kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda elde edilen histidin etiketli pullulanaz geni (BKpul) jelden kesilerek izole edilmiştir (şekil 4.15). Gen, ekspresyon vektörü pPICZ α A plazmitine bağlanmak üzere XhoI-NotI endonükleazları ile kesilmiştir. XhoI-NotI ile kesilmiş pPICZ α A plazmitine ligasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından elde edilen bu plazmit (pPICZ α A-BKpulH) *E.coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır.



Şekil 4.15. XhoIF-BK07stopht primerleri ile pJET-BKpul plazmitinden çoğaltılan histidin etiketli pullulanaz geni: BKpulH

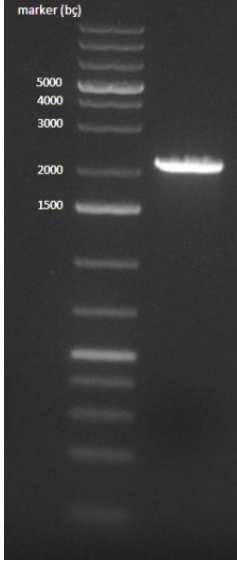
Daha önce dizileme sonuçlarına göre BK07 pullulanaz geninin SacI kesim bölgesi (346.bç) olduğu bilinmektedir. Bu nedenle pPICZ α A-BKpulH plazmiti SacI ile kontrol edilmiştir. Bu kesim sonucunda beklenen DNA parçaları teorik olarak 1322 ve 4478 bç. uzunluğundadır. Şekil 4.16'da bu kesim sonucu elde edilen DNA parçalarının yürütüldüğü jel görüntüsü verilmiştir. Sonuç olarak 1, 3, 4 ve 6 nolu plazmitlerin geni içerdiği doğrulanmış ve çalışmalara 1 nolu plazmit ile devam edilmiştir.



Şekil 4.16. pPICZ α A-BKpulH plazmidinin SacI ile kesilerek kontrol edilmesi

Sonuç olarak histidin etiketli BK07 pullulanaz geni (BKpulH) elde edilmiştir ve ekspresyon vektörü olan pPICZ α A vektörüne ligasyonu tamamlanarak, *P. pastoris*'e transformasyona hazır hale gelmiştir.

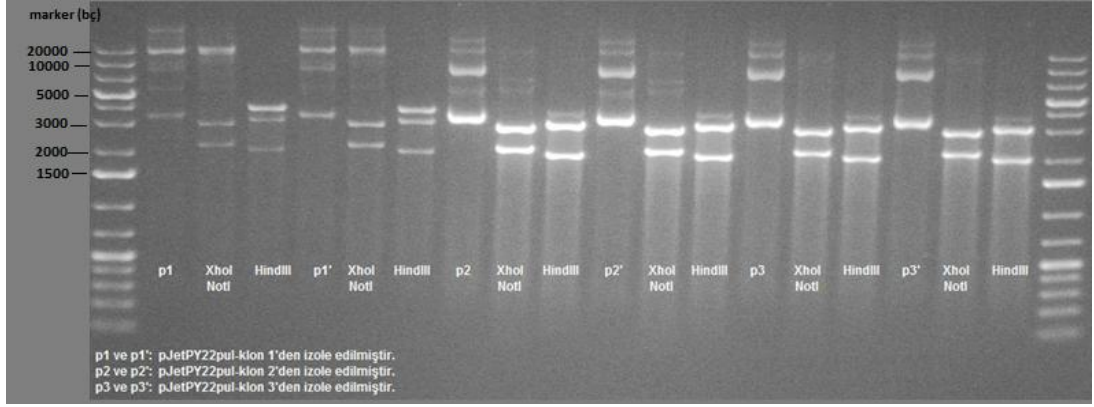
Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan PY22 genomik DNA'sı ile XhoI forward ve NotI restriksiyon bölgesi eklenmiş reverse primer çifti kullanılarak PY22 pullulanaz geni (PY22pul olarak adlandırılmıştır) PZR ile amplifiye edilmiştir. Yaklaşık 2200 bp uzunluğundaki PZR ürünü olan DNA parçasının agaroz jel görüntüsü şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. *B. subtilis* PY22 pullulanaz geninin yürütüldüğü agaroz jel görüntüsü

Elde edilen PZR ürünü, pJET1.2 klonlama vektörüne bağlanmış ve transformasyona yetenekli *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır. Seçilen 3 transformant ile plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiş ve restriksiyon enzimi ile kesilerek plazmitlerin kontrolü gerçekleştirilmiştir.

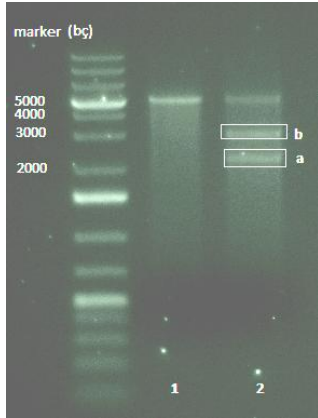
İzole edilen plazmitler, XhoI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kesilerek pullulanaz geninin plazmite girip girmediği; geni 5'- ucundan 390 bp içeriden kesmesi beklenen HindIII ile kesilerek de genin doğru yönde girip girmediği kontrol edilmiştir. Şekil 4.18'de restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim ürünlerinin yürütüldüğü jel görüntüsü verilmiştir. Şekilde p1 ve p1': pJETPY22pul klon1; p2 ve p2': pJETPY22pul klon2; p3 ve p3': pJETPY22pul klon3'ten izole edilmiş plazmitlerdir. Her bir plazmitin sağında sırası ile o plazmitin "XhoI-NotI" ve "HindIII" ile kesilmiş örnekleri yüklenmiştir.



Şekil 4.18. PY22 pullulanaz geni içeren pJET1.2 plazmitlerinin restriksiyon sonucu jel görüntüsü

Plazmitlerin, XhoI-NotI enzimleri ile kesilmesi sonucu doğrusallaşan pJET1.2 vektörüne ait yaklaşık 3000 bç uzunluğunda bir bant ve 2200 bç uzunluğunda ikinci bir bant gözlenmesi genin plazmite entegrasyonunun gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Entegre olan fragmanın büyüklüğü de PY22 pullulanaz geni için beklenen uzunluktur. Plazmitlerin, genin içinden kesen HindIII ile kesilmesi sonucu teorik olarak 3109 ve 2022 baz çifti uzunluğundaki fragmanların gözlenmesi genin plazmite doğru yönde girdiğini göstermektedir. Bu şekilde, restriksiyon enzimleri ile plazmitin kontrolünün yapılmasının ardından plazmitler dizileme merkezine gönderilerek klonlanan gende, herhangi bir mutasyon gerçekleşmediği doğrulanmıştır ve 3 numaralı klon ile çalışmalara devam edilmiştir. Dizilemede kullanılan primerler Ek 8.3'te, elde edilen dizi ve protein translasyonu ise Ek 8.4'te verilmiştir.

pJETPY22pul-klon3 plazmidini, XhoI-NotI enzimleri ile kesilerek jelde yürütülmüş ve yaklaşık 2200 baz çifti uzunluğundaki fragman jelden kesilerek, Qiagen Gel Purification Kit ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda TE (Tris-EDTA) tamponu içine özütlenmiştir. Şekil 4.19'da restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pJETPY22pul-klon 3 plazmitinin yürütüldüğü jel görüntüsü verilmiştir. Şekilde görünen jel hazırlanırken 1 no'lu kuyucuğa hiç kesilmemiş plazmit, 2 no'lu kuyucuğa restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmit yüklenmiştir. Dolayısıyla, 2 no'lu kuyucukta gözlenen "a" bandı pullulanaz geni, "b" bandı pJet plazmididir.

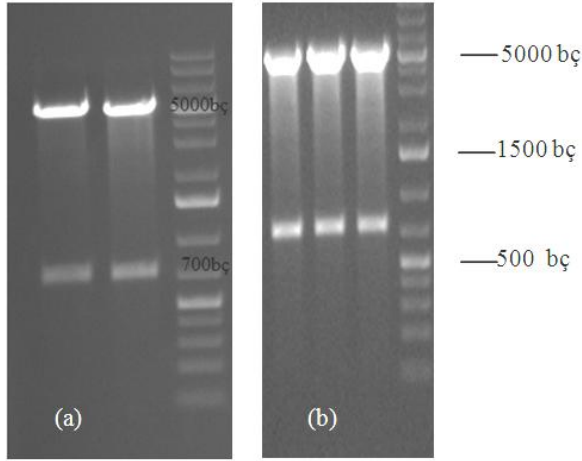


Şekil 4.19. pJETPY22pul plazmitinin restriksiyon sonucu jel görüntüsü

Jel özütleme ile ligasyona hazır hale getirilmiş olan PY22 pul geni, pPICZ α A ekspresyon vektörüne XhoI-NotI restriksiyon bölgelerinden bağlanmış ve tranformasyona elverişli *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır.

Ayrıca pJETPY22pul-klon3 plazmidi, kalıp DNA olarak kullanılarak, XhoI-Pul22NotIHTR primer çifti ile PZR reaksiyonu gerçekleştirilerek PY22 pullulanaz geni histidin etiketli olarak (PY22pulH) çoğaltılmış ve XhoI-NotI restriksiyon bölgelerinden pPICZ α A vektörüne bağlandıktan sonra tranformasyona elverişli *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır.

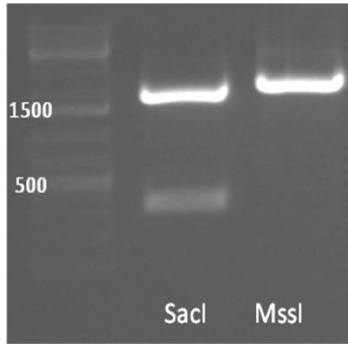
Transformasyon plakalarından rastgele seçilen kolonilerle her iki plazmit için izolasyon yapılmış ve plazmitler HindIII restriksiyon enzimi ile kontrol edilerek doğrulanmıştır. Teorik olarak pPICZ α A-PY22pul için beklenen fragmentler 726 ve 5074 bp büyüklüğündedir. Restriksiyon analizlerinin jel görüntüleri Şekil 4.20’de verilmiştir. Bundan sonra gerçekleştirilen klonlama işlemlerinde histidin etiketli pullulanaz geni ile (pPICZ α A-PY22pulH kullanılarak) çalışılmıştır.



Şekil 4.20. pPICZ α A-pul (a) ve pPICZ α A-pulH (b) plazmidinin *Hind*III restriksiyon analizi sonucu (verilen baz büyüklükleri markır bantları içindir)

4.2.7. Konukçu *Pichia pastoris*'e transformasyon ve pul⁺ klonların eldesi

Yaygın olarak kullanılan SacI kesim bölgesi BKpulH geninin içinde olduğundan pPICZ α A-BKpulH plazmitinde ikinci MssI kesim bölgesinin olup olmadığı kontrol edilmiştir. Şekil 4.21'de pPICZ α A-BKpulH plazmitinin SacI ve MssI ile kesimi sonucunda elde edilen DNA parçaları görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi MssI plazmiti tek yerden keserek doğrusal hale getirmektedir.



Şekil 4.21. pPICZ α A-BKpulH plazmitinin SacI ve MssI restriksiyon enzimleri ile kesim sonu elde edilen DNA parçaları

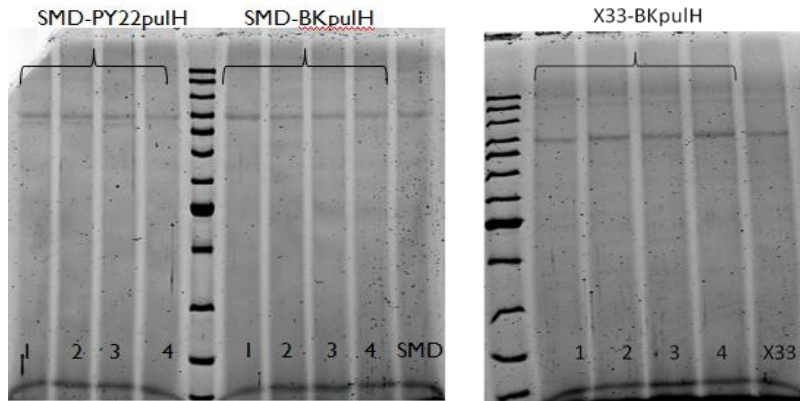
MssI ile doğrusal hale getirilen pPICZ α A-BKpulH plazmiti elektroporasyon ile *P. pastoris* X33 ve SMD1168H suşlarına aktarılmıştır.

pPICZ α A-PY22pulH plazmidini ise SacI enzimi ile doğrusal hale getirilerek, elektroporasyon ile *P. pastoris* X33, SMD1168H ve KM71H hücrelerine aktarılmıştır.

4.2.8. Seçilen klonlar ile protein üretimi ve proteinin saflaştırılması

Seçilen klonlar 1 gece 30°C'de YPD sıvı besiyerinde geliştirilmiştir ve ardından başlangıç OD'si 0.1 olacak şekilde BMGY besiyerine (%2 pepton, %1 yeast extract, %1.34 YNB, %4 \times 10⁻⁵ biotin, 100mM pH 6 fosfat tamponu ve %1 gliserol) inoküle edilmiştir. İnkübasyonun 18-20. saatinde 12-15 OD'ye gelişmeleri sağlanmış hücreler hasat edilerek (santrifüjlenerek), BMMY besiyerine (%2 pepton, %1 yeast extract, %1.34 YNB, %4 \times 10⁻⁵ biotin, 100mM pH 6 fosfat tamponu ve %1 metanol) geçirilmiştir. Son metanol konsantrasyonu %1 olacak şekilde 24 saatlik aralıklarla indüksiyon (tetikleme) yapılmıştır.

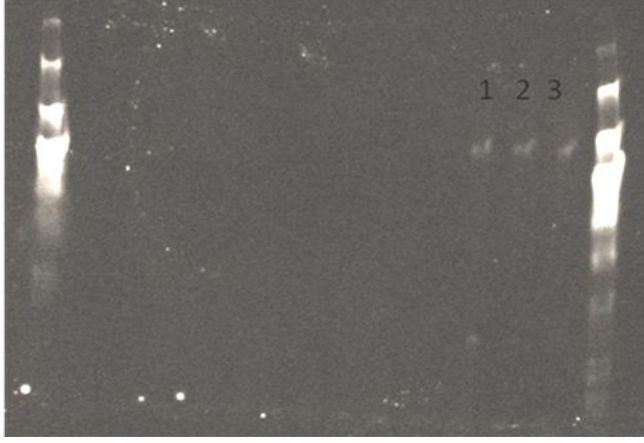
BK07 pullulanazı için zeocin içeren YPD agardan seçilen 4'er koloni, protein üretme yetenekleri kontrol edilmek üzere BMGY ve ardından BMMY besiyerinde geliştirilmiş; Süpernatantları ile SDS-PAGE (şekil 4.22) ve Western blot (şekil 4.23) analizi yapılarak protein üretimleri kontrol edilmiştir.



Şekil 4.22. SDS-PAGE jel görüntüsü

SDS-PAGE jelinde protein bantları (85-100 kDa DNA standartları arasında) gözlenmektedir. Fakat kontrol olarak yüklenmiş olan gen aktarılmamış olan SMD1168H ve X33 süpernatantlarında da aynı bant gözleendiği için, örneklerdeki bandın pullulanaza spesifik olduğu kesin olarak söylenemez. Bunun üzerine Western

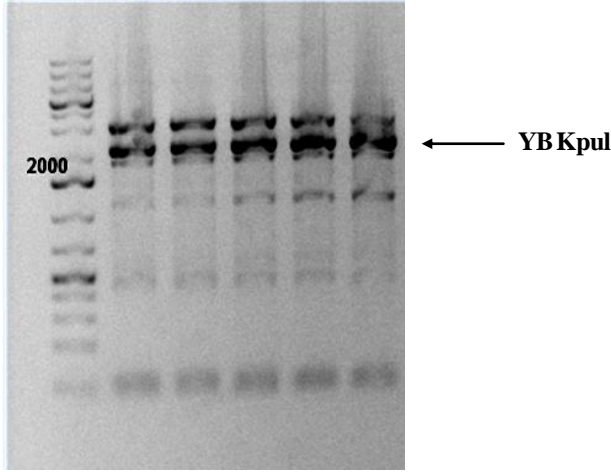
blot analizi ile devam edilmiştir. Şekil 4.23'te, histidin etiketli bu örneklerin (anti-his ile) Western blot analizi sonucunda elde edilen membran görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.23. Western blot membran görüntüsü (yüklenen örnekler **1**) X33 kontrol, **2-5**) X33 BKpulH 1-4, **6**) SMD1168H kontrol, **7-11**) SMD1168H-BKpulH 1-4, **12-15**) SMD1168H-PY22pulH 1-3

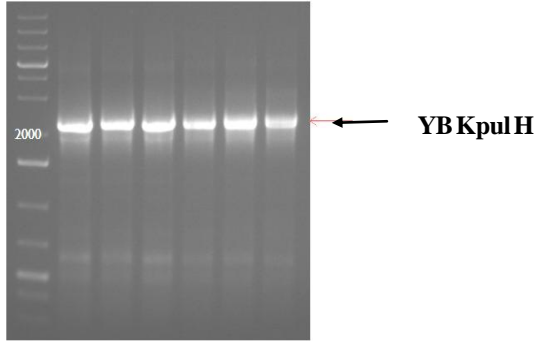
Western membranında sadece SMD1168H-PY22pulH 1-3 klonlarında protein bandı gözlenmiştir. Elde edilen görüntüde, X33- ve SMD1168H-BKpulH klonlarında protein bandı gözlenmemiştir.

X33-BKpulH ve SMD1168H-BKpulH klonlarında protein üretimi gerçekleştirilememiştir. Bu klonlar BKpulH geninin plazmit üzerinden çoğaltılması ile oluşturulmuştur. Herhangi bir mutasyonun protein üretimine engel olmuş olabileceği düşünülerek, yeniden klonlama çalışmasında kullanılacak olan “YBKpulH geni”, BK07 genomik DNA’sı kalıp olarak PZR yöntemi ile elde edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda pulATGF-puladpSTOP primerleri kullanılarak bu kez tüm gen elde edilmiştir. Reaksiyon ürünlerinin yürütüldüğü agaroz jel görüntüsü şekil 4.24’de verilmiştir. Beklenen DNA bandı jelden ekstrakte edilmiştir.



Şekil 4.24. pulATGF-puladpSTOP primerleri ile BK07 genomik DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

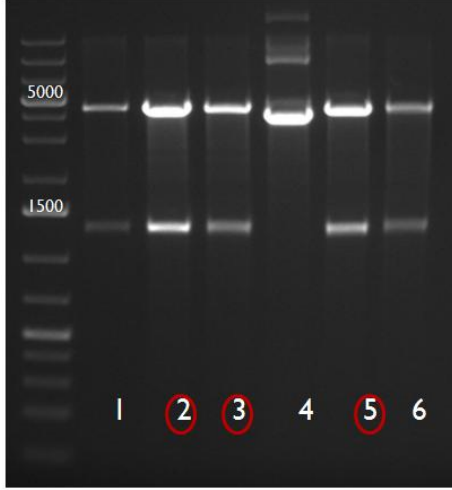
Histidin etiketleme işlemi için, "YBKpul" olarak isimlendirilen PZR ürünü kalıp olarak kullanılmıştır ve XhoIF-BK07stopht primerleri ile PZR'si yapılmıştır. Bu reaksiyonun ürünlerinin yürütüldüğü agaroz jel görüntüsü şekil 4.25'te verilmiştir. Elde edilen ürün "YBKpulH" olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.25. XhoIF-BK07stopht primerleri ile YBKpul PZR ürünü kullanılarak çoğaltılan histidin etiketli BK07 pullulanaz geni: YBKpulH

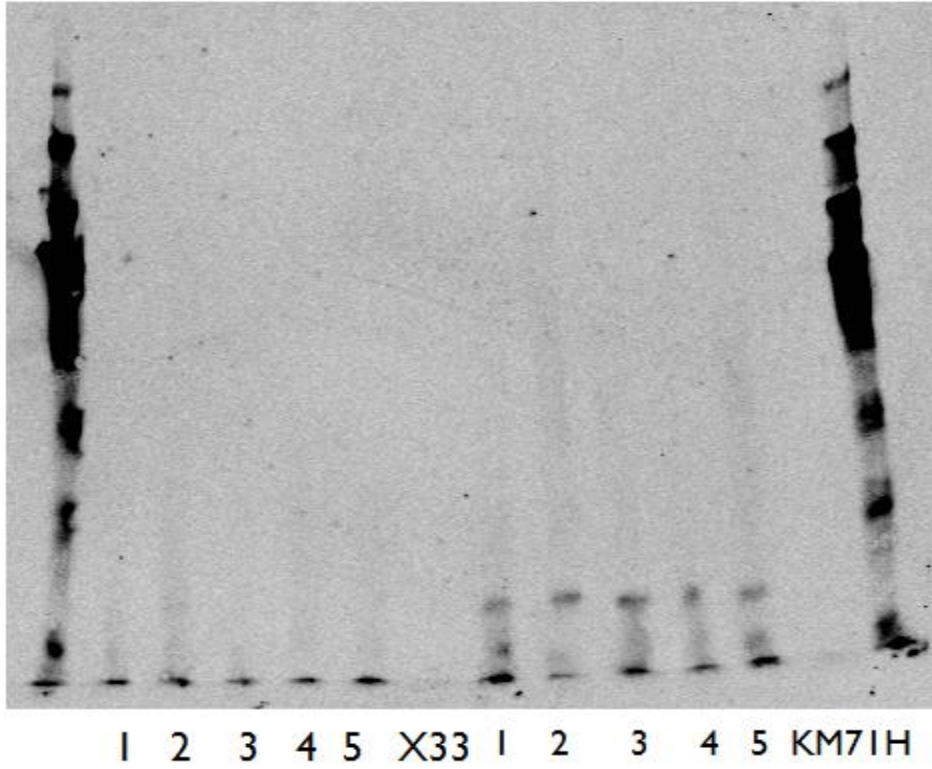
YBKpulH (elde edilen histidin etiketli yeni BK pullulanaz geni, PZR ürünü) XhoI-NotI ile kesilerek, bu restriksiyon bölgelerinden kesilerek lineer hale getirilmiş pPICZ α A ekspresyon vektörüne bağlanmıştır ve transformasyona elverişli *E.coli* XL1-Blue hücrelerine aktarılmıştır. Seçilen 6 transformant hücreden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Şekil 4.26'da elde edilen plazmitlerin (pPICZ α A-YBKpulH) doğrulanması için *SacI* enzimi ile kesildikten sonra yürütüldüğü agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Bu kesim sonucunda teorik olarak beklenen ürünler 1322 bp ve 4478 bp. uzunluğundadır.

Jelden görülen sonuca göre, 2, 3 ve 5 nolu plazmitler dondurulmuş kültür olarak saklanmış; 2 nolu plazmit dizileme merkezine gönderilmiştir. Dizileme merkezinden gelen sonuca göre BKpul ile PY22pul'a ait aminoasit dizisinin %80 (Bkz. Ek 8.4); farklı kaynaklardan izole edilen pullulanaz enzimlerinin aminoasit dizilerinin %66 (Bkz. Ek 8.5) homoloji gösterdiği görülmüştür.



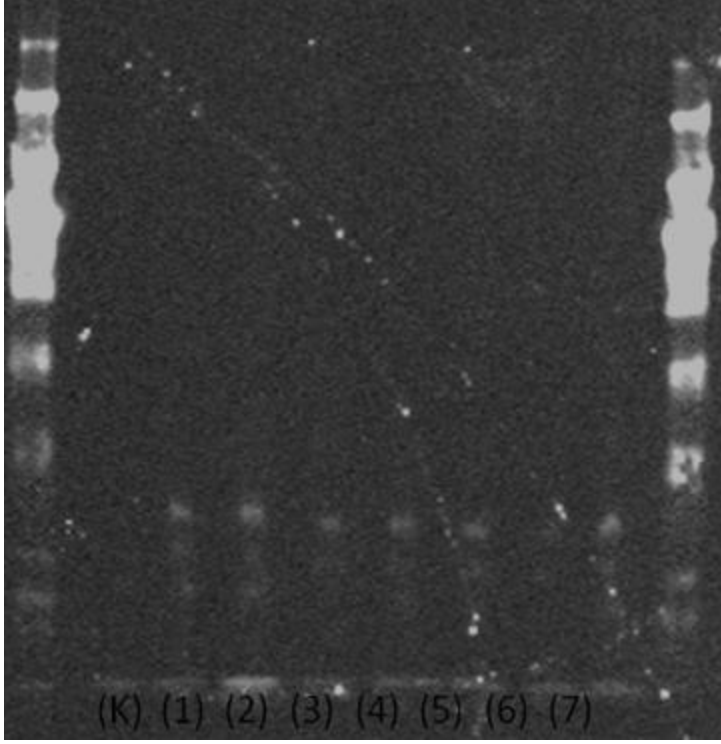
Şekil 4.26. pPICZ α A-YBKpulH plazmidinin SacI enzimi ile kesilerek doğrulanması

Dizilenen ve doğrulanan pPICZ α A-YBKpulH plazmiti *MssI* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilerek transformasyona elverişli *P. pastoris* X33 ve KM71H suşlarına aktarılmıştır. Elde edilen transformantların protein üretme yetenekleri Western blot analizi ile araştırılmıştır. Şekil 4.27'de bu analiz sonucunda elde edilen membran görüntüsü verilmiştir. Teorik olarak 85-100 kDa büyüklükleri arasında bir protein bandı beklenmektedir. Sonuca göre KM71H klonlarında proteinin üretildiği fakat degrade olduğu, X33 klonlarında ise protein üretiminin gerçekleşmediği görülmektedir.



Şekil 4.27. X33-YBKpulH (1-5) ve KM71H-YBKpulH (1-5) süpernatantları ile yapılan Western blot analizi membran görüntüsü

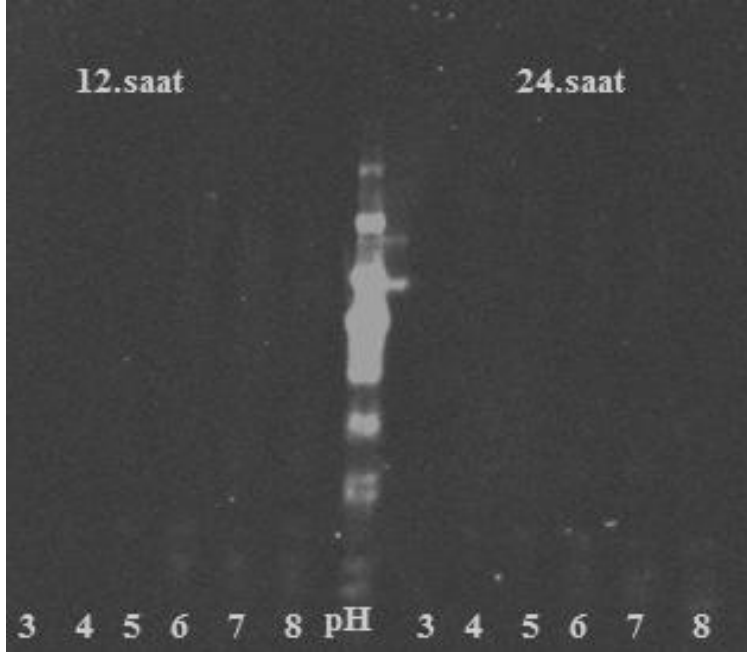
Bunun üzerine proteaz aktivitesine bağlı degradasyon olduğu düşünülerek, pPICZ α A-BKpulH plazmiti proteaz inaktif *P. pastoris* suşu olan SMD1168H'ye aktarılmıştır. SMD1168H klonlarının süpernatantları ile yapılan Western blot analizi membran görüntüsü Şekil 4.28'de verilmiştir. Fakat şekilde de görüldüğü gibi degradasyon problemi SMD1186H suşu ile de devam etmiştir.



Şekil 4.28. SMD1168H-YBKpulH klonlarının süpernantları ile yapılan Western blot analizi membran görüntüsü

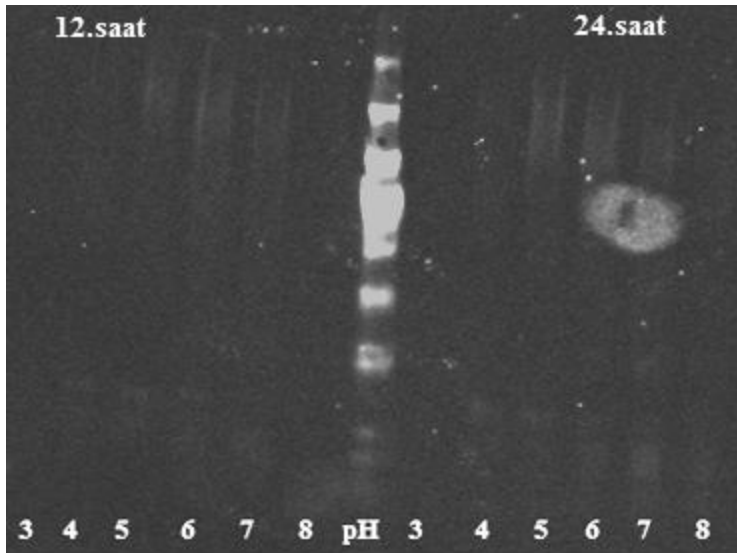
Bunun üzerine, *P. pastoris* KM71H-YBKpulH ve SMD1168H-YBKpulH transformantlarından 1 nolu klonlar alınarak farklı pH değerlerinde (*P.pastoris*'in gelişebildiği pH aralığı göz önünde bulundurularak pH 3-8'de) protein üretimi denenmiştir. Tampon sistemi olarak tek bir sistemin (disodyum hidrojen fosfat-sitrik asit) farklı pH'larda hazırlanmış çözeltileri kullanılmıştır. Bu üretimlerden 12, 24, 36 ve 48. saatlerde örnek alınarak bu örnekler ile Western blot analizi gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.29'da SMD1168H-YBKpulH klonunun pH 3-8 aralığından 12. ve 24. saatte alınan örnekleri ile Western blot analizi membran görüntüsü verilmiştir. Fakat şekilde de görüldüğü gibi degradasyon problemi devam etmiştir.



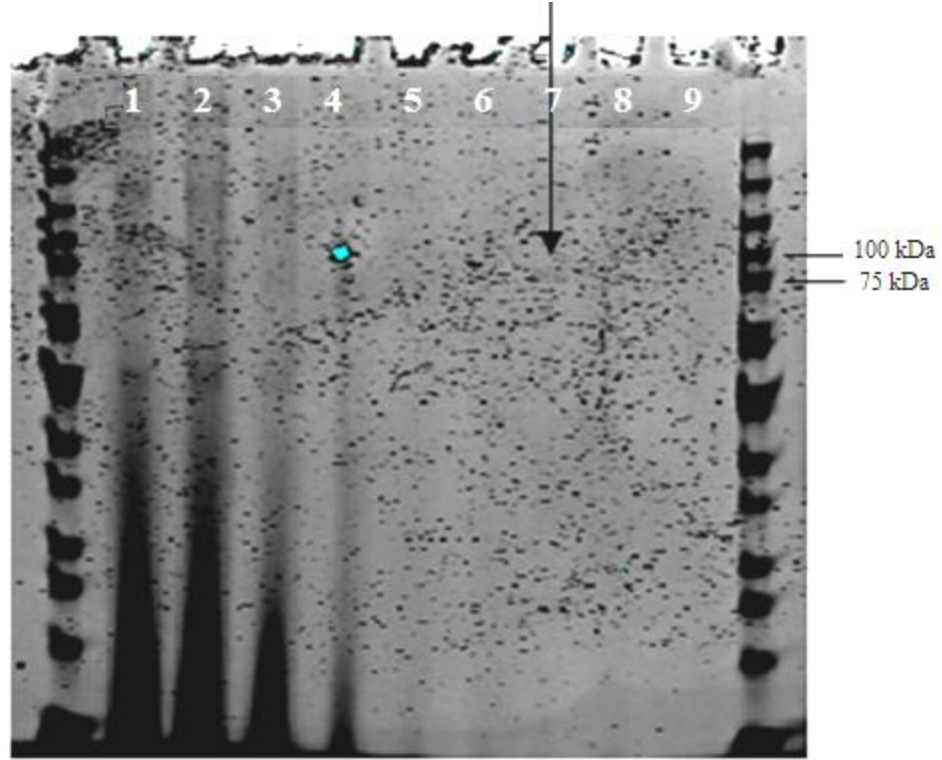
Şekil 4.29. SMD1168H-YBKpulH ile farklı pH'larda, 12. Ve 24. Saatte alınan örneklerle yapılan Western blot analizi sonucu elde edilen membran görüntüsü

Şekil 4.30'da KM71H-YBKpulH klonununun pH 3-8 aralığından 12. ve 24. saatte alınan örnekleri ile Western blot analizi membran görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.30. KM71H-YBKpulH ile farklı pH'larda, 12. ve 24. saatte alınan örneklerle yapılan Western blot analizi sonucu elde edilen membran görüntüsü

Şekil 4.30'da da görüldüğü gibi, elde edilen sonuca göre hem 12. saat hem de 24. saatte alınan örneklerde pH 5-7 arasında teorik olarak beklenen büyüklükte (85-100kDa) protein gözlenmiştir fakat keskin bir bant halinde değildir. Ayrıca bir miktar degradasyonun devam ettiği anlaşılmaktadır. Daha iyi sonuç elde edilebilmek için KM71H-YBKpulH ile pH 6'da (disodyum hidrojen fosfat-sitrik asit tamponunda) 16°C'de protein üretimi gerçekleştirilmiştir ve HisPur Ni-NTA Purification Kit ile histidin etiketli proteini saflaştırma analizi yapılmıştır. Saflaştırma aşamalarında alınan örneklerin yürütüldüğü SDS-PAGE jeli görüntüsü şekil 4.31'de

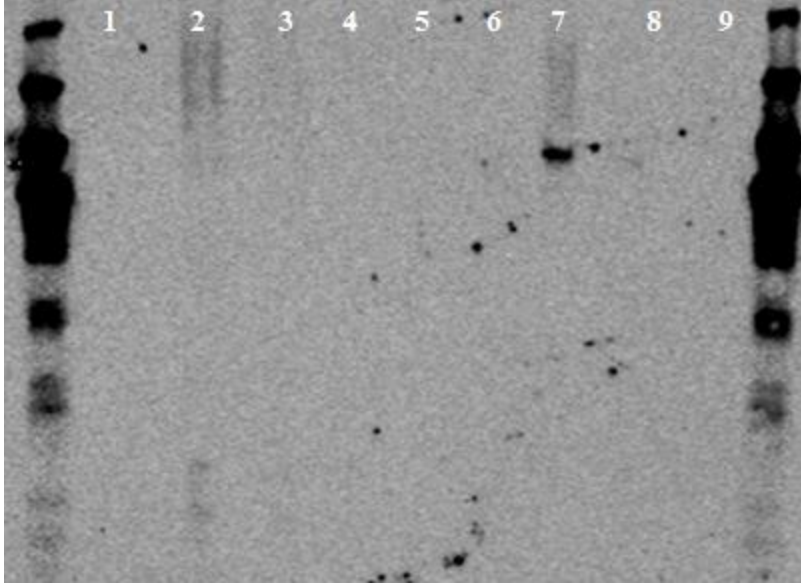


verilmiştir.

Şekil 4.31. KM71H-YBKpulH klonu ile 16°C yapılan protein üretiminden elde edilen süpernatantın histidin etiketli proteinini saflaştırılma aşamalarını gösteren SDS-PAGE jel görüntüsü (1: KM71H konukçu, 2: KM71H-YBKpulH süpernatantı, 3: Reçineye bağlanmayan süzüntü (FT), 4: I. Yıkama, 5: II. Yıkama, 6: III. Yıkama, 7: I. Elüsyon, 8: II. Elüsyon, 9: III. Elüsyon

Şekil 4.31'de örneklerin isimleri şeklin altında verilmiştir. Jel görüntüsünde de görüldüğü gibi, I. elüsyon örneğinde (7 nolu kuyucukta) ve beklenen büyüklükte (85-100 kDa) protein bandı gözlenmiştir ve bu örneğin diyalizi ile analize devam edilmiştir. Ardından saflaştırma aşamalarındaki örneklerin (I.elüsyon yerine diyalizden sonraki

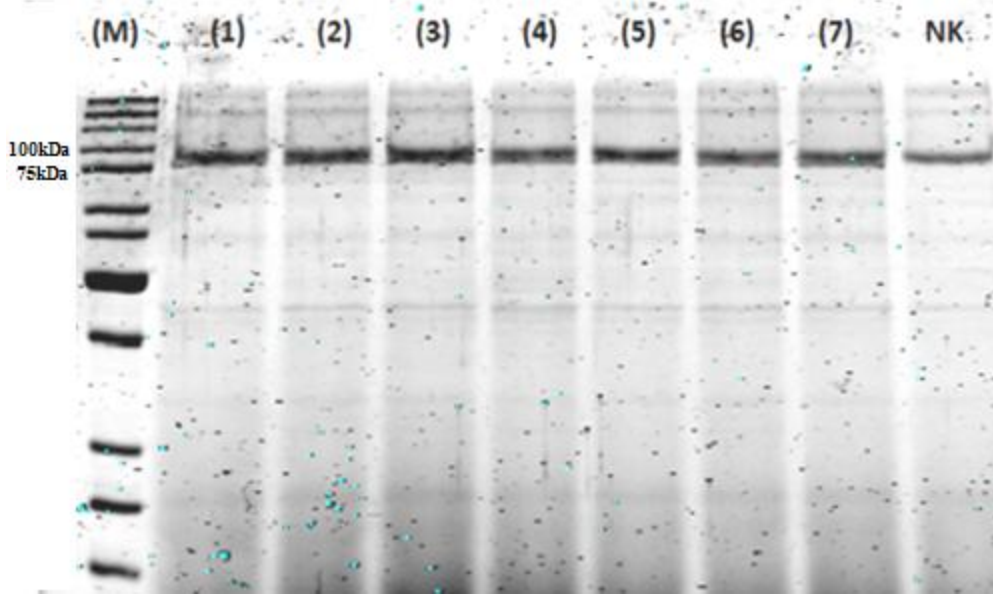
örnek) yüklendiği Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen membran görüntüsü şekil 4.32’de verilmiştir.



Şekil 4.32. Histidin etiketli proteinin saflaştırma aşamalarında elde edilen örneklerin Western blot analizi (1: KM71H konukçu, 2: KM71H-YBK_{pulH} süpernatantı, 3: Reçineye bağlanmayan süzöntü (FT),), 4: I. Yıkama, 5: II. Yıkama, 6: III. Yıkama, 7: I. Elüsyon (diyaliz edildikten sonra, yaklaşık 200 ng protein yüklenmiştir), 8: II. Elüsyon, 9: III. Elüsyon

Western blot membran görüntüsünde de görüldüğü gibi diyalizden sonra yaklaşık 81 kDa olduğu tahmin edilen protein bandının BK07 pullulanazına spesifik olduğu belirlenmiştir. Protein bandı, örnekte keskin bir bant olarak gözlenememiştir, buna proteinin glikozile olması neden olmuş olabilir fakat diyalizden sonra elde edilen bant keskin ve tek bir banttır.

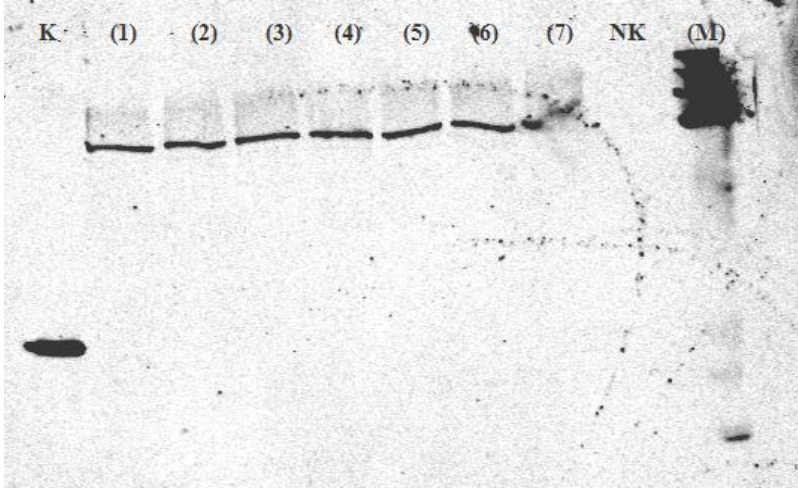
PY22 pullulanaz enzimi üretimi de KM71H klonları ile yapılmıştır. Protein üretimini gösteren SDS-PAGE jeli görüntüsü şekil 4.33’de verilmiştir.



Şekil 4.33. KM71H-PY22pul klonlarının pullulanaz üretim yeteneklerini gösteren SDS-PAGE görüntüsü. M:protein markırı, (1-7): Klonlar, NK: KM71H konukçu

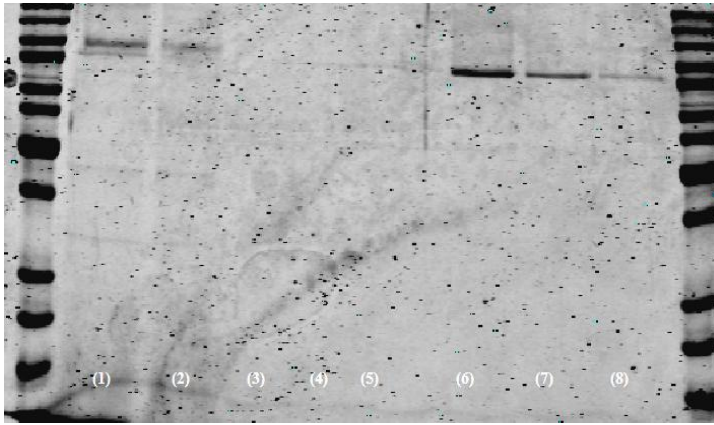
Yürütülen şeritlerde teorik büyüklük olarak 81 kDa civarında bir protein bandı görünmesi beklenmiştir. Klon örneklerinde protein bandı beklenen büyüklükte gözlenmiş ancak konukçu kontrolde de yaklaşık aynı büyüklükte ve daha ince bir bant görülmüştür. SDS-PAGE ile klonlar ve kontrol arasında yeterli ayrımın yapılamaması nedeniyle Western blot tekniği kullanılarak proteinin pullulanaz olup olmadığı araştırılmıştır.

Membran görüntüsü Şekil 4.34'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi klonlarda protein bandı gözlenmiştir fakat gen aktarılmamış KM71H klonunda, SDS-PAGE'de gözlenen bant Western Blot sonucunda gözlenmemiştir. Böylece iki bandın (pullulanaz ve konukçunun hücre dışı proteininin) birbirine çok yakın büyüklükte olduğundan SDS-PAGE'de ayrılamadığını ancak bantlardan birinin pullulanaz enzimine spesifik olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 4.34. Western blot analizi sonucu membran görüntüsü. K: Western kontrolü için histidin etiketli kontrol protein, (1-7): Klonlar, NK: Negatif kontrol, (M): Protein standardı

HisPur Ni-NTA Purification Kit ile histidin etiketli PY22 pullulanaz proteinini saflaştırma analizi yapılmıştır. Saflaştırma aşamalarında alınan örneklerin yürütüldüğü SDS-PAGE jeli görüntüsü şekil 4.35'te verilmiştir.



Şekil 4.35. Histidin etiketli PY22 pullulanazının süpernatanttan saflaştırılması aşamalarını gösteren SDS-PAGE jeli görüntüsü (1: KM71H-PY22pulH süpernatantı, 2: Reçineye bağlanmayan süzüntü (FT), 3: I. Yıkama, 4: II. Yıkama, 5: III. Yıkama, 6: I. Elüsyon, 7: II. Elüsyon, 8: III. Elüsyon)

SDS-PAGE analizinde saflaştırılan proteinin moleküler ağırlığının protein standardında gözlenen 85-100 kDa bantları arasında bulunduğu görülmekte ve 90 kDa

olduğu tahmin edilmektedir. Normalde nükleotid dizisinden 81 kDa civarında büyüklüğe sahip olması beklenen proteinin daha büyük molekül ağırlığına sahip olarak ekspres edilmesi maya sisteminde ekspresyon sırasında glikozile olmuş olması ile açıklanabilir.

4.2.9. Enzim üretimi için optimum indüksiyon süresinin belirlenmesi

Protein üretiminde optimum indüksiyon süresinin belirlenmesi için daha önce de anlatıldığı gibi 1 gece YPD besiyerinde geliştirilen kültürden, 20ml BMGY besiyerine başlangıç OD'si 0.1 olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. İnkübasyonun (28°C'de) 18-20. saatinde 12-15 OD'ye gelişimleri sağlanmış olan hücreler hasat edilerek BMMY besiyerine geçirilmiştir. BK07 pullulanaz enziminin üretimi 16°C'de, PY22 pullulanaz enziminin üretimi 28°C' Her 24 saatin sonunda örnek alınmış ve kalan kültüre son konsantrasyon %1 olacak şekilde %100 metanol ile indüksiyon yapılmıştır.

Her 24 saatte bir örnek alınarak, enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçülmüştür. Ayrıca indüksiyon boyunca hücrelerin OD'si de takip edilmiştir. Elde edilen veriler BK07 pullulanazı için çizelge 4.1'de, PY22 pullulanazı için çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. BK07 pullulanazının farklı indüksiyon sürelerinde elde edilen verileri

	24.sa	48.sa	72.sa	96.sa	120.sa
Hücre OD değeri	34	45	46	49,2	51,5
Enzim aktivitesi (U/ml)	5,75	8,46	7,63	2,83	3,56
Protein miktarı (µg/ml)	56,5	58,7	63,1	65,4	67,6
Spesifik enzim aktivitesi (U/mg)	101	144	121	43	52

BK07 pullulanaz enzimi için elde edilen veriler en yüksek enzim aktivitesinin 48.saat örneğinde olduğunu göstermiştir. Enzim aktivitesi, hücre yoğunluğunun 34 OD'den 45 OD'ye çıktığı 48.saatte yaklaşık 1.5 kat artış göstermiştir. Hücreler 48-72.saatler arasında 1 OD artarken enzim aktivitesinde 48.saate göre %10 oranında azalma tespit edilmiştir. OD artış oranındaki düşüş hücrelerin durağan faza girdiğini

göstermekte ve durumun enzim aktivitesini de etkilediği görülmektedir. Enzim aktivitesi 96.saatte ise, 48.saate göre %70 oranında düşmüştür. Enzim aktivitesindeki bu düşüş, hücre çoğalma hızının düşmesi, ortamda metabolitlerin artması ve durağanda fazda parçalanmış hücrelerin hücre içi proteaz enzimlerinin süpernatanta geçerek protein degradasyonuna neden olması ile açıklanabilir.

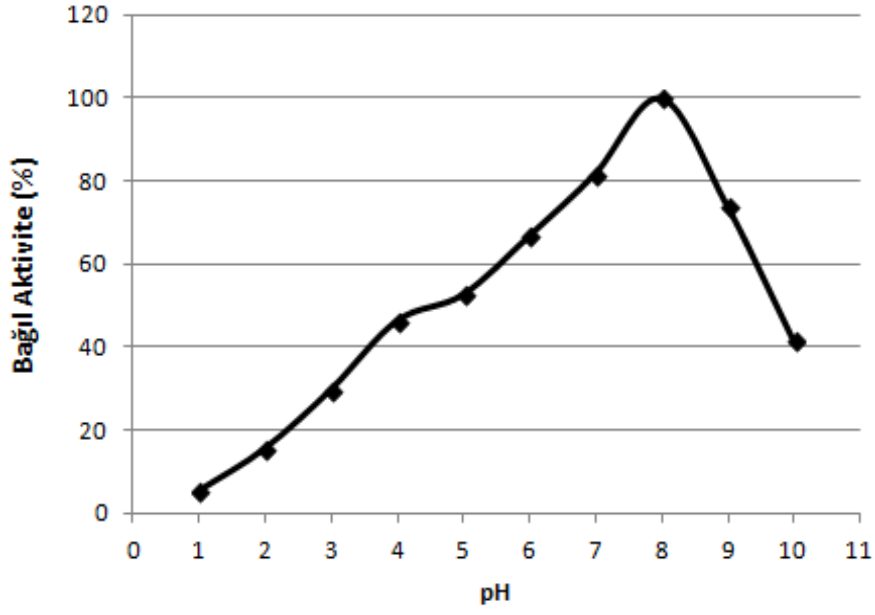
Çizelge 4.2. PY22 pullulanazının farklı indüksiyon sürelerinde elde edilen verileri

	24.sa	48.sa	72.sa	96.sa	120.sa
Hücre OD değeri	30,32	48	54,2	45,4	40,3
Enzim Aktivitesi (Unit/ml)	2,52	2,95	3,56	0	0
Protein miktarı (µg/ml)	55	57,5	82	136	131
Spesifik enzim aktivitesi (U/mg)	46	51	43	0	0

BK07 pullulanaz enzimi için elde edilen veriler en yüksek enzim aktivitesinin U/ml olarak 72.saat örneğinde olduğunu göstermiştir. Fakat spesifik aktivite bazında (U/mg) düşünüldüğünde en yüksek aktivite 48.saate gözlenmiştir. 72.saatteki protein artış oranındaki yükselme hücrenin durağan faza girmiş olması nedeni ile parçalanmış hücrelerin hücre içi proteinlerinden kaynaklanıyor olabilir. 72.saatten sonra 96.saatte alınan örneklerde hücrelerin yoğunluğunda düşüş gözlenmiştir. Protein miktarındaki yüksek artış oranı ve enzim aktivitesinin gözlenmemesi bunun sebebinin parçalanmış hücrelerin proteazlarından kaynaklı degradasyonu olarak değerlendirilebilir.

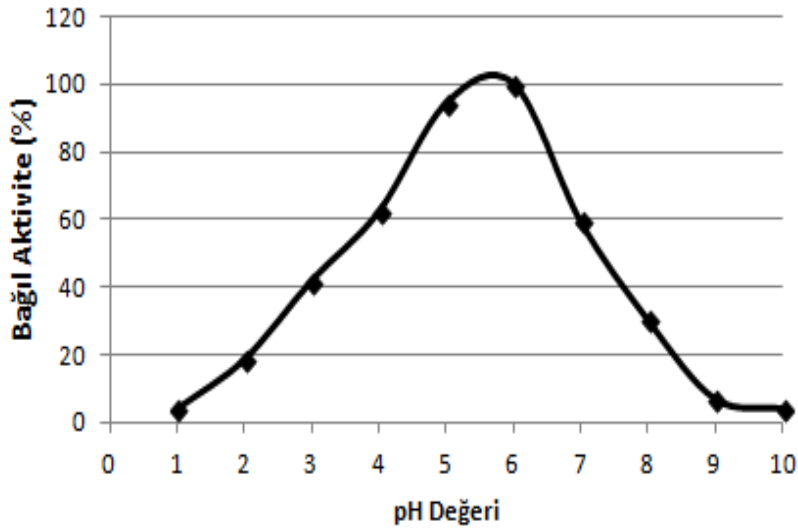
4.2.10. Enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi

Üretilen rekombinant pullulanaz enzimlerinin optimum pH değerinin saptanması için sodyum-asetat (pH 3-6); sodyum-fosfat (pH 7-8) ve glisin-NaOH (pH 9-10) tampon sistemleri kullanılmıştır. Sabit sıcaklık (37°C) ve farklı pH'larda yapılan enzim reaksiyonları sonucunda elde edilen veriler Bk pul için şekil 4.36'da, PY22 pul için şekil 4.37'de gösterilmiştir.



Şekil 4.36. Farklı pH değerlerinde BK07pul enziminin sergilediği aktivite

BK07 pullulanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği PH aralığının pH 7-9 arasında olduğu tespit edilmiştir. Enzim optimum aktivitesi pH 8’de gösterirken, pH 7’de % 82, pH 9’da %74 aktivite sergilemiştir.

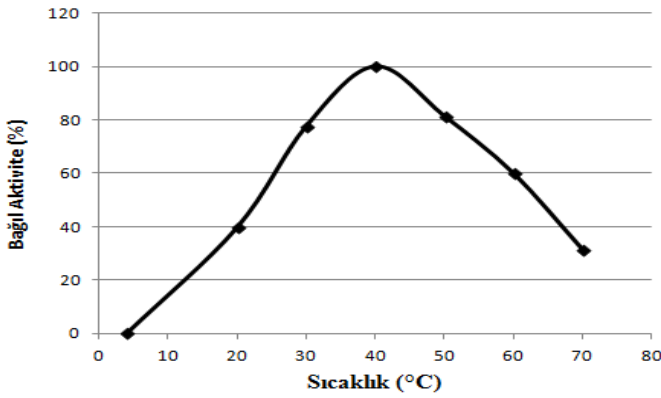


Şekil 4.37. Farklı pH değerlerinde PY22pul enziminin sergilediği aktivite

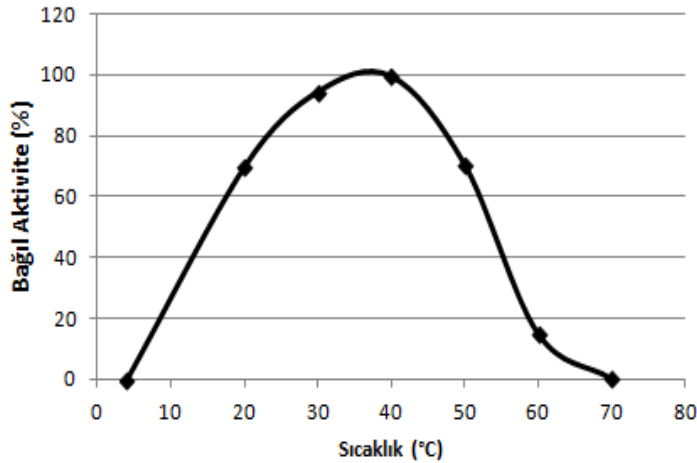
PY22 pullulanaz enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı ağırlıklı olarak pH 5-6 arasında yer almıştır. Enzim optimum aktivitesini pH 6'da gösterirken, pH 5'te %94 aktivite gözlenmiştir.

4.2.11. Enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi için, BKpul için pH 8'de (optimum pH), PY22pul için pH 6'da (optimum pH) 4-70°C arasında farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen veriler BKpul için şekil 4.38'de, PY22pul için şekil 4.39'da verilmiştir.



Şekil 4.38. Farklı sıcaklık değerlerinde BK07pul enziminin sergilediği aktivite

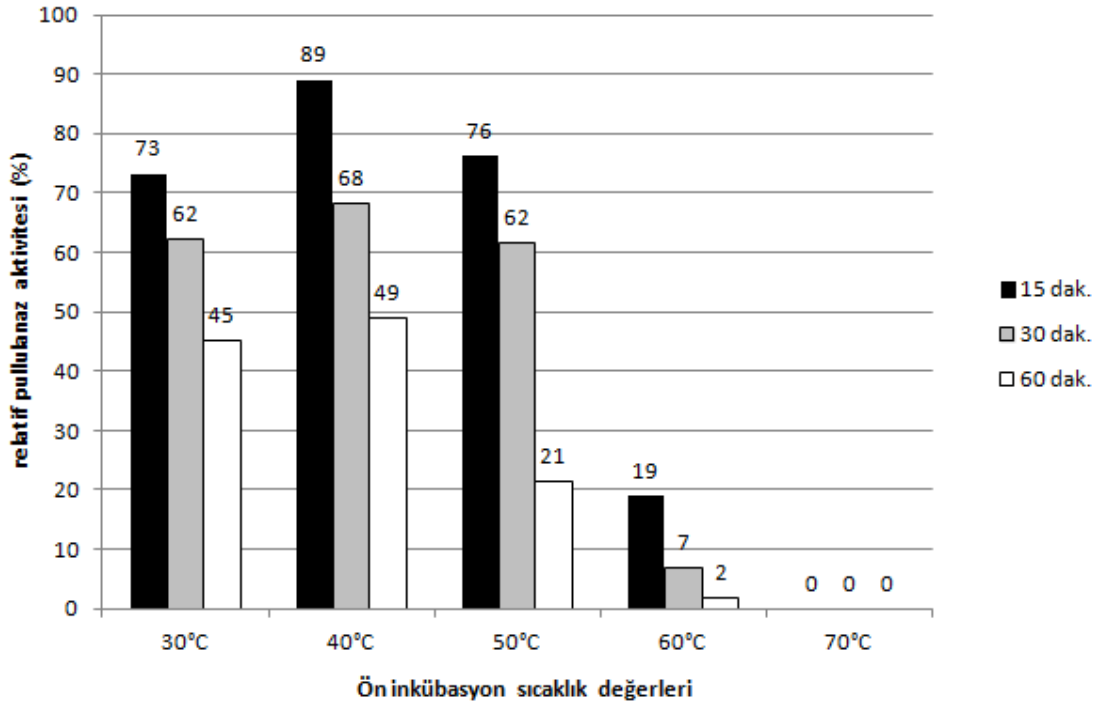


Şekil 4.39. Farklı sıcaklık değerlerinde PY22pul enziminin sergilediği aktivite

BKpul, optimum pH'sı olan pH 8'de en yüksek aktiviteyi 40°C'de göstermiştir. Elde edilen sonuçlar enzimin 20°C'de optimum aktivitenin %40'ı, 30°C'de %78'i, 50°C'de %81'i düzeyinde bağıl aktivite ile çalıştığını göstermiştir. PY22pul, optimum pH'sı olan pH 6'da en yüksek aktiviteyi 40°C'de göstermiştir. Enzim 20°C'de optimum aktivitenin %70'i kadar aktivite gösterirken, sıcaklık 30°C'ye yükseldiğinde aktivite %94 düzeyine çıkmış, 50°C'de ise %71 aktivite tespit edilmiştir.

4.2.12. Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin termal stabilitesini saptamak için 30-70°C sıcaklık aralığında 30 ve 60 dakika süre ile ön inkübasyonu gerçekleştirilmiş, ardından enzimin kalan aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar BKpul için şekil 4.40'da, PY22pul için şekil 4.41'de verilmiştir.

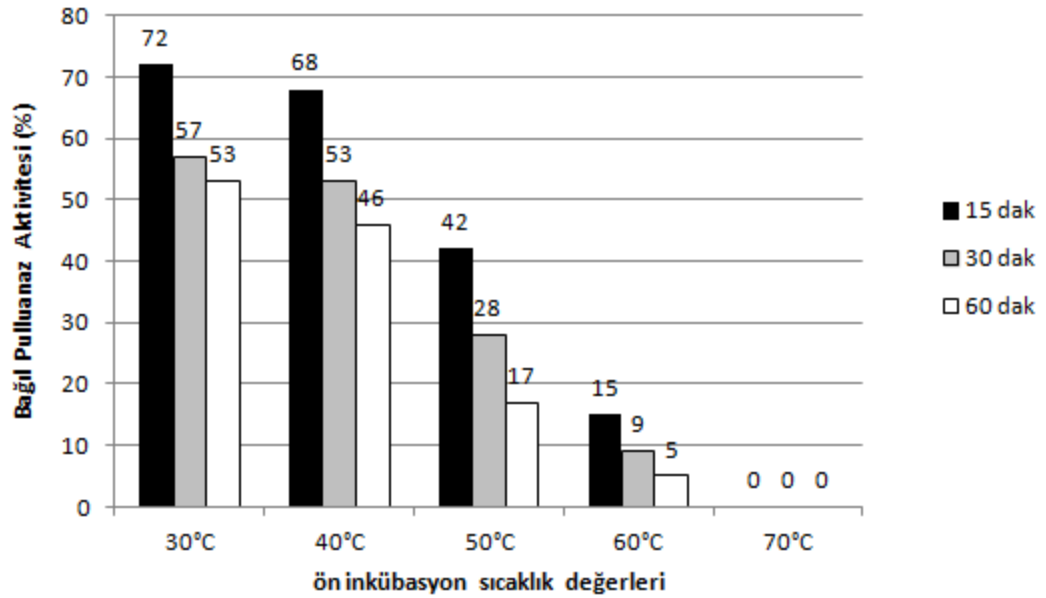


Şekil 4.40. BK07 Pullulanaz enziminin termal stabilite sonuçları

Sonuçlar değerlendirilirken aktivite bağıl olarak hesaplanmıştır. Ön inkübasyona tabi tutulmamış örneğin aktivitesi %100 aktivite olarak kabul edilmiş ve bu değer BK07 pullulanazı için 5,7 U/ml'dir. BKpullulanaz enzimin termal stabilitesinin en yüksek

olduğu değer 40°C olarak tespit edilmiştir ve bu sonuç enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ile uyum göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde 30 ve 50°C'deki termal stabilite değerleri, 40°C'ye göre daha düşüktür fakat ilk 30 dakika bu fark çok yüksek değildir. 30 dakikanın sonunda 30°C'de ve 50°C'de çalışan enzimler %62; 40°C'deki enzim ise %68 düzeyinde aktivite ile çalışmaktadır. Enzim 60°C'de 15 dakika süren ön inkübasyon sonunda aktivitesinin ancak %20'sini koruyabilmiştir. Ön inkübasyon sıcaklığı 70°C'ye yükseldiğinde ise 15 dakikada enzimin tüm aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.41. PY22 Pullulanaz enziminin termal stabilite sonuçları

PY22'nin ön inkübasyona tabi tutulmamış örneğinin aktivitesi (%100 aktivite) ise 2,35 U/ml olarak ölçülmüştür. PY22 pullulanaz enziminin, 30 ve 40°C'de 1 saat sürenin sonunda aktivitesinin yaklaşık olarak %50'sini koruduğu gözlenmiştir. Enzimin, 30 ve 40°C'deki termal stabilitesine ait elde edilen veriler birbirlerine oldukça yakındır ve bu iki sıcaklık enzimin termal stabilitesinin en yüksek olduğu sıcaklık değerleridir. Enzim aktivitesi, 50°C sıcaklıkta 15 dakika süre sonunda optimum koşullardaki aktivitesinin %50'si düzeyine düşerken, 1 saatin sonunda %20'sine düşmüştür. Enzimin 60°C'de 15 dakika inkübasyonu aktivitesinde %85 oranında

kayıba neden olurken, 70°C'de 15 dakika süre sonunda enzim tüm aktivitesini kaybetmektedir.

4.2.13. Pullulanaz Aktivitesi Tayini

Nicel pullulanaz aktivitesi tayini metot kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi ölçümleri, optimum koşullar yani BKpul için pH 8'de ve 40°C'de, PY22pul için pH 6'da 40°C'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında protein saflaştırma işleminin ve CaCl₂ ile EDTA ilavesinin enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırılmıştır.

Histidin etiketli proteinlerin pürifikasyonu (Histag pürifikasyon) işlemi ile BK07 pullulanazını içeren süpernatant 10 kat konsantre edilmiştir. Fakat süpernatantta 4.3 U/ml olarak ölçülen enzim aktivitesi, 0,458 U/ml düzeylerine düşmüştür. Bu düşüşün sebebi proteinin histidin etiketi kısmında gerçekleşmiş olabilecek bir degradasyon sonucu, proteinin etiketini kaybetmesi ve pürifikasyon işleminde proteinin nikel kolona bağlanamayarak kaybı olabileceği gibi, saflaştırma aşamalarında da protein ve/veya aktivite kaybı gerçekleşmiş olabilir. Bunun üzerine enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesinde, CaCl₂ ve EDTA ilavesinin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılmasında süpernatant ile çalışılmıştır.

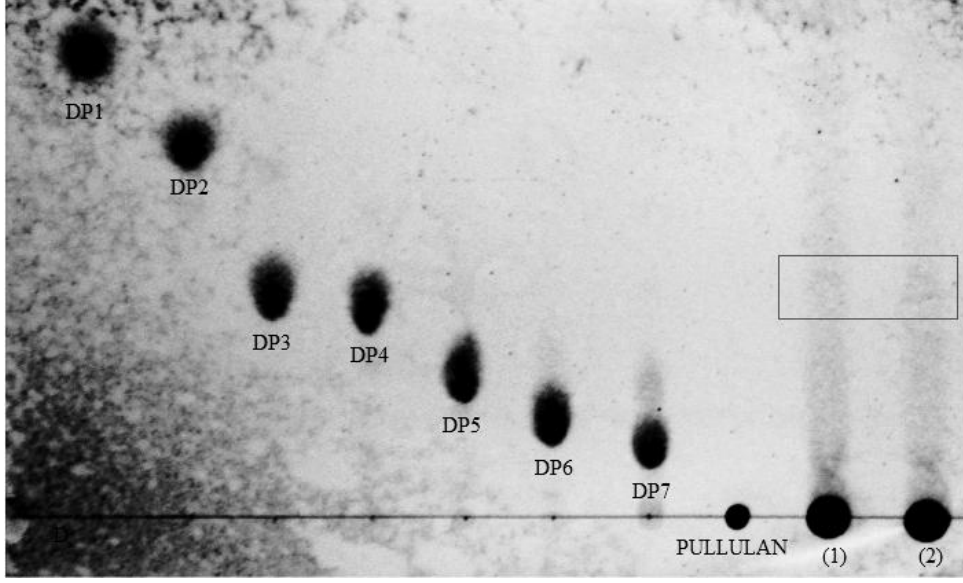
Yapılan çalışmalar BKpul enzim aktivitesinin, 2mM CaCl₂ ilavesi ile %73 oranında arttığını, 2mM EDTA ilavesi ile ise %8 oranında düştüğünü göstermiştir.

Histidin etiketli proteinlerin pürifikasyonu (Histag pürifikasyon) işlemi ile PY22 pullulanazını içeren süpernatant 11 kat konsantre edilmiştir ve 2mM CaCl₂ varlığında aktivitesi, süpernatant aktivitesinin (2.063 U/ml) yaklaşık 2,5 katına çıkarak 4,985 U/ml olarak kaydedilmiştir. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi ve CaCl₂ ve EDTA ilavesinin enzim aktivitesi üzerinde araştırılması saflaştırılmış ve diyaliz edilmiş örnekler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler 2mM CaCl₂ ilavesinin enzim aktivitesini %89 oranında artırdığını, 2mM EDTA ilavesinin ise enzim aktivitesinin tamamen inhibe ettiğini göstermiştir.

4.2.14. Rekombinant pullulanaz enziminin hidroliz ürünlerinin belirlenmesi

Rekombinant enzimin hidroliz ürünlerinin belirlenmesi için, başlangıçta HPLC analizi düşünülmüştür ancak HPLC’de (Shimadzu SPD-M20A, Japonya) RID dedektörü kullanılarak elimizde mevcut bulunan amin (Inertsil NH₂) ve C18 (Nucleosil 5) kolonları ve uygun taşıyıcı fazlar ile denemeler yapılmıştır. Ancak, kolonlar ile standart seyreltileriyle yürütülen denemelerde pullulanaza özgü hidroliz ürünü olan maltotrioz standardı için pik gözlenememiştir.

Bunun üzerine daha hızlı ve pratik bir metot olan TLC yönteminden faydalanılmıştır. Saflaştırılmış PY22 pullulanaz enzimi çözeltisi ile gerçekleştirilen enzim reaksiyonu sonucunda elde edilen TLC plaka görüntüsü Şekil 4.42’de verilmiştir. Enzim aktivitesi düşük saptandığından, reaksiyon ürünlerinin TLC plakasında saptanabilir olabilmesi için reaksiyon sona erdiğinde reaksiyon çözeltisi 60°C’de 45 dakika süreyle konsantre edilmiştir (Eppendorf Concentrator Plus, Almanya). Bu nedenle elde edilen TLC plaka görüntüsünde, örneklerde ((1) ve (2)) pullulan konsantrasyonu daha yüksek gözlenmiştir. Enzim aktivitesi düşük olduğu için substrat büyük ölçüde hidrolize uğramadan kalmış ve hidroliz ürünü (maltotrioz) bandı DP3 standardı ile aynı seviyede, ancak çok solgun şekilde gözlenebilmiştir.



Şekil 4.42. Saflaştırılmış enzimin reaksiyon ürünlerini gösteren TLC plakası. DP1-DP7: 10'ar μg 1-7 monomer ünitelerden oluşan şeker standartları (Sigma-Aldrich); pullulan (Sigma-Aldrich); 1 ve 2 enzim reaksiyonu çözeltisidir

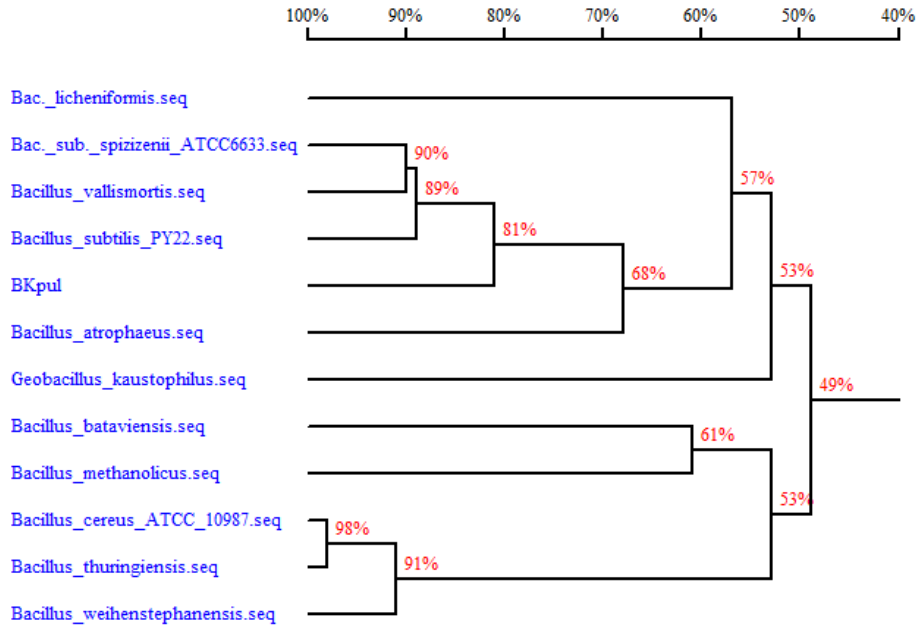
BK07 pullulanaz enzimi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar, pürifikasyonda yaşanan problem nedeni ile süpernatant çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin düşük olmasının yanında süpernatanttan gelen kirlilik de hidroliz ürünlerinin TLC analizi tespit edilebilmesini güçleştirmiş ve bu nedenlerden dolayı TLC plakasında spesifik hidroliz ürünleri net bir şekilde görüntülenememiştir (TLC plaka görüntüsü verilmemiştir).

5. TARTIŞMA

Yapılan çalışma ile yerel izolat olan ve daha önce yapılan bir çalışmada *B. subtilis* doğrulanarak BK07 izolatından pullulanaz enzimini kodlayan gen izole edilmiştir ve dizisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar BK07 ve PY22 pullulanaz enzimini kodlayan genlerin hem aminoasit hem de nükleotit bazında %80 oranında aynı olduğunu göstermiştir. BK07 ve PY22 pullulanazlarının aminoasit bazında karşılaştırılması Ek 8.6'da, nükleotit dizisi bazından karşılaştırılması Ek 8.8'de verilmiştir.

BK07 pullulanaz enzimini kodlayan gen dizisi, farklı kaynaklardan izole edilen diğer pullulanaz enzimleri ile protein bazında %66, nükleotit bazında %67 aynılık göstermektedir. BK07 pullulanazının diğer pullulanazlarla aminoasit bazında karşılaştırılması Ek 8.7'de, nükleotit dizisi bazından karşılaştırılması Ek 8.9'da verilmiştir.

Farklı kaynaklardan izole edilen pullulanazların homoloji ağacı ise Şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1. Farklı kaynaklarda izole edilen pullulanaz enzimlerinin homoloji ağacı

Şekilde de görüldüğü gibi BK07 pullulanazının protein olarak en yakın olduğu gen kaynakları *B. subtilis spizizenii* ATCC6633, *B.vallismortis* ve *B. subtilis* PY22 olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma ile BK07 ve PY22 izolatlarının pullulanaz enzimlerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar iki enziminde optimum çalıştığı sıcaklık değerinin 40°C olduğunu, PY22'nin optimum çalışma pH'sının 6 iken BK07'nin pH 8 olduğu tespit edilmiştir. İki enzimin termal stabilitesi üzerine yapılan çalışmaların sonucu ise 40°C'de 1 saat inkübasyon süresi sonunda, BK07 pullulanaz aktivitesinin %89, PY22 pullulanaz aktivitesinin ise %68 seviyesine düştüğünü göstermiştir. Bu sonuç BK07'nin termostabilitesinin PY22'ye nazaran daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışmalar BKpul enzim aktivitesinin, 2mM CaCl₂ ilavesi ile %73 oranında arttığını, 2mM EDTA ilavesi ile ise %8 oranında düştüğünü göstermiştir. PY22 pullulanazından alınan sonuçlar ise 2mM CaCl₂ ilavesinin enzim aktivitesini %89 oranında artırdığını, 2mM EDTA ilavesinin ise enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiğini göstermiştir.

Bu sonuçlar CaCl₂'nin her iki enzimin de aktivitesini artırdığını göstermiştir. Bu bulgular Ling vd (2009) tarafından yapılan çalışmada 2mM CaCl₂ varlığında pullulanaz aktivitesinde %70 artış kaydetmeleriyle benzerlik göstermektedir.

EDTA'nın ise BK07 pullulanaz aktivitesi üzerine önemli düzeyde etki etmezken, PY22 pullulanazının aktivitesini tamamen inhibe ettiğini tespit edilmiştir. Buradan BK07'nin çalışması için 2 değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duymazken, PY22'nin enzim aktivitesi için 2 değerlikli metal iyonlarına ihtiyaç duyduğu sonucuna varılabilir.

İki enzim için de en yüksek enzim aktivitesi 48.saat sonunda hasat edilen hücrelerde belirlenmiştir. Aktivite değeri BK07 pullulanazında 8,46 U/ml, PY22 pullulanazında 2,95 U/ml olarak tespit edilmiştir.

Literatürde, çalkalamalı inkübatörde yapılan enzim üretimlerinde, Samah vd (2008), *B. flavothermus* KWF1 pullulanazı ile başlangıçta 0.791 U/ml, optimize edilmiş koşullarda 3.498 U/ml aktivite kaydetmişlerdir. Salleh vd. (2006), *Exiguobacterium* sp. MAAC-1 pullulanazının başlangıç aktivitesini 0.126 U/ml bulurken, optimize edilmiş koşullarda 1.208 U/ml olarak tespit etmişlerdir. Iqbal (1994), yerel *Bacillus* sp. izolatlarından elde edilen pullulanaz aktivitelerini ölçmüştür. İzolatların pullulanaz aktivitesi ağırlıklı olarak 1.11-6.00 U/ml olarak gözlenmiştir, en yüksek aktivite ise 19.50 U/ml olarak bildirilmiştir.

Ling (2006), *Raoultella planticola* DSMZ 4617 pullulanazının çalkalamalı inkübasyon ile 500 ml hacimde üretiminde 0.32 U/ml, optimize edilmiş besiyeri kompozisyonu ile fermentörde 2L hacimde üretiminde 2.22 U/ml aktivite kaydetmiştir.

Abdel-Naby vd (2011), *B. licheniformis* NRC22 pullulanazının aktivitesinin, kesikli ve sürekli fermentasyon üretimlerinde incelemişlerdir. Kesikli fermentasyon ile 18 U/ml enzim aktivitesi elde ederken, sürekli fermentasyon ile 14.8 U/ml enzim aktivitesi elde etmişlerdir. İmmobilize edilmiş hücrelerden, sürekli fermentasyon üretimi ile elde edilen aktivite ise 16.8 U/ml olarak saptanmıştır.

Bertoldo vd (2004), “YNWGYDP” olmak üzere yedi aminoasitten oluşan bölgenin korunmuş bölge olduğunu ve tüm pullulanaz tip I enzimlerinde bulunduğunu ve pullulanaz tip II enzimlerinin bu korunmuş bölgeyi içermediğini bildirmiştir. Yamashita vd (1997), bu korunmuş bölgenin α -1,6 glikozidik bağlarının degradasyonunda veya enzimin substrata bağlanmasından sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışma ile elde edilen, PY22 ve BK07 pullulanazına ait aminoasit dizilerinde (sırası ile Ek 8.4 ve Ek 8.5) bu bölgenin (YNWGYDP) bulunduğu görülmektedir ve bu sonuç elde edilen rekombinant enzimlerin pullulanaz tip I sınıfına girdiğini göstermektedir. Bu durumda pullulan substratının α -1,6 glikozidik bağlarının hidrolizi ile beklenen hidroliz ürünü de maltotriozdur.

Bertoldo ve Antranikian (2002), pullulanaz tip I enziminin pullulanda ve dallanmış oligosakkaritlerde α -1,6 bağlarını spesifik olarak hidrolize ederek yıkılma ürünleri olarak maltotrioz ve lineer oligosakkaritleri oluşturduğunu belirtmişlerdir.

6. SONUÇ

1. Bu projede çalışmaya temel oluşturan *Bacillus* soyları Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde tamamlanmış olan bir çalışma ile sünmüş ekmeğ için izole edilmiştir (Erem 2007). Bu bağlamda potansiyel pullulanaz üreticisi olabileceği düşünülen yerel olarak izolale edilen bakteri suşlarında (K1, K4, K5, N2, N12 ve N16) pullulanaz geni araştırılmıştır. Tüm analizlere pozitif kontrol olarak *Bacillus subtilis* PY22 (*B. subtilis* 168 mutantı) suşu dahil edilmiştir.
2. Yerel izolatlardan BK07'den ve pozitif kontrol olarak çalışmada yer verilen PY22'den tüm gen halinde pullulanaz geni izole edilerek gen dizisi belirlemiştir. Sonuç bu iki proteinin birbiri ile %80 oranında aynı olduğunu göstermiştir.
3. BK07 ve PY22 pullulanaz genlerine PZR yolu ile histidin etiketleme yapılmış ve pPICZ α A vektörüne bağlanarak *P. pastoris*'te aktarılmış ve çalkalamalı inkübatörde erlende protein üretimleri gerçekleştirilmiştir.
4. Hücre dışında üretilen proteinlerin tespit edilmesi için SDS-PAGE ve Western analizleri yapılmıştır ve elde edilen veriler, BK07 pullulanazının yaklaşık 81 kDa, PY22 pullulanazının ise yaklaşık 90 kDa olduğunu göstermiştir.
5. Enzim aktivitesi 48.saat sonunda hasat edilen örneklerde en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Bu örneklerde BK07 pullulanaz aktivitesi 8,46 U/ml, PY22 pullulanaz aktivitesi 2,95 U/ml olarak tespit edilmiştir. Toplam protein miktarına göre hesaplanan spesifik enzim aktiviteleri ise sırası ile 144 U/mg ve 51 U/mg olarak saptanmıştır.
6. *P. pastoris*'te üretilen BK07 ve PY22 pullulanaz enzimlerinin optimum çalışma koşulları (optimum pH ve optimum sıcaklık) araştırılmıştır. En yüksek aktiviteyi BK07 pullulanazı 40°C sıcaklıkta pH 8'de gösterirken; PY22 pullulanazı 40°C sıcaklıkta pH 6'da göstermiştir.

7. BK07pul ve PY22pul enzimlerinin farklı sıcaklık ve sürelerde ön inkübasyonu yapıldıktan sonra kalan aktiviteleri ölçülerek, termal stabiliteleri tespit edilmiştir. İki enzim için de termal stabilitenin en iyi olduğu, en yüksek sıcaklık değeri 40°C olarak saptanmıştır ve bu sonuç enzimin optimum sıcaklık değeri ile uyum göstermiştir. Elde edilen verilere göre, BK07 pullulanaz aktivitesi, 40°C’de (pH 8’de) 1 saat inkübasyon sonunda %89; PY22 pullulanaz aktivitesi ise 40°C’de (pH 6’da) 1 saat inkübasyon sonunda %68 seviyesinde korunmuştur.
8. Enzim aktivitesi üzerinde +2 değerlikli metal iyonlarının etkisinin olup olmadığı ve CaCl₂ varlığının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Enzim reaksiyon çözeltisinde 2mM CaCl₂ varlığı BK07 pullulanazının aktivitesini %73 oranında artırırken, PY22 pullulanazının aktivitesini %89 oranında artırmıştır. 2mM EDTA BK07 pullulanazının aktivitesini etkilemezken, PY22 pullulanazının aktivitesini inhibe etmiştir. Bu sonuç, BK07 pullulanazının aktivite gösterebilmesi için +2 değerlikli iyonlara gerek duymadığını fakat PY22 pullulanazının aktivitesinde +2 değerlikli iyonların rolünün olduğunu göstermektedir.
9. Bertoldo vd. (2004), “YNWGYDP” olmak üzere yedi aminoasitten oluşan bölgenin korunmuş bölge olduğunu ve tüm pullulanaz tip I enzimlerinde bulunduğunu ve pullulanaz tip II enzimlerinin bu korunmuş bölgeyi içermediğini bildirmiştir. Sırası ile EK 8.4 ve EK 8.5’te görüldüğü gibi PY22 ve BK07 pullulanazına ait aminoasit dizilerinde bu bölgenin bulunması her iki enzimin de pullulanaz tip I sınıfına girdiğini işaret etmektedir.
10. Bertoldo vd. (2004), pullulanın α -1,6 bağlarını hidroliz eden pullulanaz tip I enzimlerinin beklenen hidroliz ürününün maltotrioz olduğunu belirtmiştir. TLC yöntemine göre gerçekleştirilen hidroliz ürünleri analizinde enzim aktivitesinin testin duyarlılığına göre düşük kalması sebebiyle enzimin son ürünü olması beklenen maltotrioz bandı PY22 pullulanaz enzimi ile solgun şekilde gözlemlenmiştir. BK07 pullulanaz enzimi ile gerçekleştirilen reaksiyonlar, pürifikasyonda yaşanan problem nedeni ile süpernatant çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin düşük olmasının yanında süpernatanttan gelen kirlilik de hidroliz ürünlerinin TLC analizi tespit edilebilmesini güçleştirmiş

ve bu nedenlerden dolayı TLC plakasında spesifik hidroliz ürünleri net bir şekilde görüntülenememiştir

Bu çalışma ile elde edilen *P. pastoris* KM71H-PY22pul ve *P. pastoris* KM71H-BK07pul suşları kullanılarak pullulanaz enziminin üretim veriminin ve enzim aktivitesinin artırılması üzerine çalışılabilir. Bunun için fermentörde üretimi ve optimizasyonu; ve ayrıca hücre dışı sıvının daha verimli şekilde (örneğin histidin saflaştırmada kullanılan farklı tekniklerden faydalanılarak) saflaştırılması için farklı teknikler denenebilir.

Rekombinant enzimin termal stabilitesinin artırılması yada optimum çalışma koşullarının değiştirilmesi gibi, enzimin özelliklerini geliştirecek ve değiştirecek çalışmalar da protein mühendisliği teknikleri ile mümkündür.

7. KAYNAKLAR

- ABDEL-NABY, M.A., OSMAN, M.Y. and ABDEL-FATTAH, A.F. 2011. Production of Pullulanase by Free and immobilized cells of *Bacillus licheniformis* NRC22 in Batch and Continuous Cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27, 2903-2911.
- ARA, K., SAEKI, K., IGARASHI, K., TAKAIWA, M., UEMURA, T., HAGIHARA, H., LAWAI, S. and ITO, S. 1995. Purification and Characterization of an Alkaline Amylopullulanase with Both α -1,4 and α -1,6 Hydrolytic Activity from Alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. *Biochimica et Biophysica Acta* 1243: 315-324.
- BERTOLDO, C., DUFFNER, F., JORGENSEN, P.L. and ANTRANIKIAN, G. 1999. Pullulanase Type I from *Fervidobacterium pennavorans* Ven5: Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 2084–2091.
- BERTOLDO, C. and ANTRANIKIAN, G. 2002. Starch-Hydrolyzing Enzymes from Thermophilic Archaea and Bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 151-160.
- BERTOLDO, C., ARMBRECHT, M., BECKER, F., SCHAFER, T., ANTRANIKIAN, G. and LIEBL, W. 2004. Cloning, Sequencing and Characterization of a Heat- and Alkali-Stable Type I Pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, no. 6: 3407-3416.
- BRUNSWICK, J.M., KELLY, C.T. and FOGARTY, W.M. 1999. The Amylopullulanase of *Bacillus* sp. DSM 405. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 170-175.
- CEREGHINO, G.P. and CREGG, J.M. 1999. Application of Yeast in Biotechnology: Protein Production and Genetic Analysis. *Current Opinion Biotechnology*. Vol.10: 422-427.
- CEREGHINO, G.P., SUNGA, A.J., CEREGHINO, J.L. and CREGG, J.M. 2001. Expression of Foreign Genes in the Yeast *Pichia pastoris*, In Genetic Engineering: Principles and Methods. Editor: SETLOW, J. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Vol.23: 157-169.
- DEMAIN, A.L. 2005. Industrial Mycology: Past, Present and Future. Editor: AN, Z. *Handbook of Industrial Mycology*. Marcel Dekker, New York. 1-25.
- EREM, F., CERTEL, M. and KARAKAŞ, B. 2009. Identification of *Bacillus* Species Isolated From Ropey Breads Both with Classical Methods and API

Identification Kits, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22, 2, 201–210.

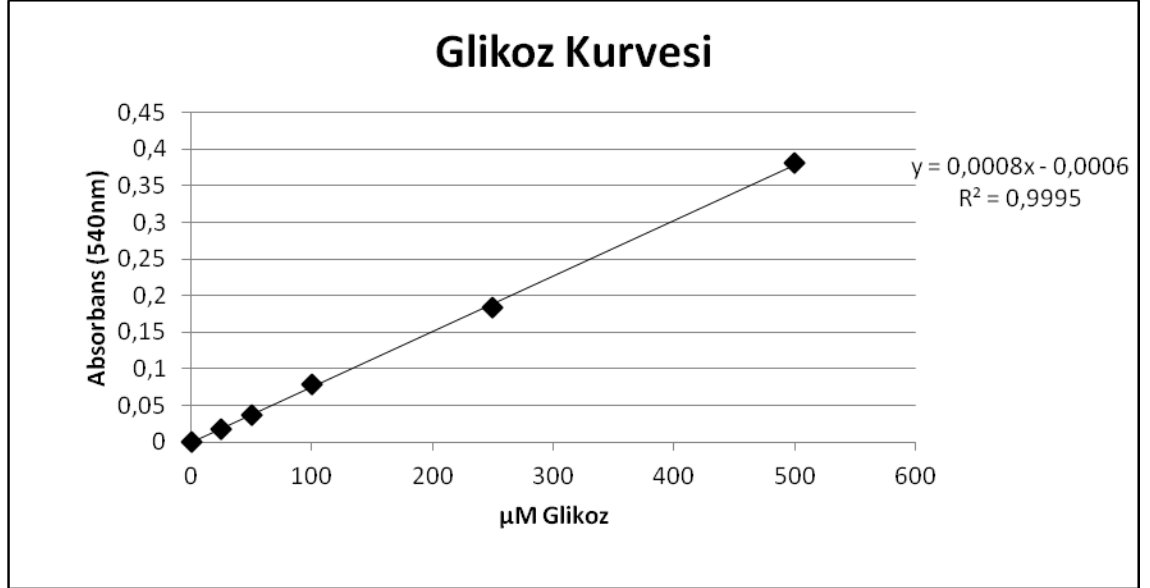
- ERRA-PUJADA, M., FLORENT CHANG, P.H., DEBEIRE, P., DUCHIRON, F. and O'DONOHUE, M.J. 2001. Purification and Properties of the Catalytic Domain of the Thermostable Pullulanase Type II from *Thermococcus hydrothermalis*. *Biotechnology Letters* 23: 1273-1277.
- HATADA, Y., SAITO K., HAGIHARA, H., OZAKI, K. and ITO, S. 2001. Nucleotide and Deduced Aminoacid Sequence of an Alkaline Pullulanase from the Alkaline Bacterium *Bacillus* sp. KSM-1876. *Biochemica and Biophysica Acta* 1545: 367-371.
- HIGGINS, D.R. and CREGG, J.M. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods of Molecular Biology*. Vol. 103:1-15.
- HYUN, H.H. and ZEIKUS J.G. 1985. Regulation and Genetic Enhancement of Glucoamylase and Pullulanase Production in *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Journal of Bacteriology*, 164, 3, 1146-52.
- IQBAL, J. 1994. *Studies on the Production of Thermostable Pullulanase by Bacillus Species*. Phd. Thesis. University Of The Punjab.
- KIM, T.J., PARK, W.S., CHOI S.K., YOON, Y.J., PARK, K.H. and KIM, J.W. 2000. Molecular Cloning and Characterization of a Thermostable Pullulanase from a *Thermus* Strain IM6501. *Food Science Biotechnology* 9(3): 188-194.
- KOCH, R., CANGANELLA, F., HIPPE, H., JAHNKE, K.D. and ANTRANIKIAN, G. 1997. Purification and Properties of a Thermostable Pullulanase from a Newly Isolated Thermophilic Anaerobic Bacterium, *Fervidobacterium pennavorans* VEN5. *Applied and Environmental Microbiology* 63, no. 3: 1088-1094.
- LEATHERS, T.D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol*, 62: 468-473.
- LEE, M.J., LEE, Y.C. and KIM, C.H. 1997. Intracellular and Extracellular Forms of Alkaline Pullulanase from an Alkaline *Bacillus* sp. S-1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 337, 2, 308-316.
- LING, H.S. 2006. Production of Pullulanase by *Raoultella planticola* DSMZ 4617 Using Sago Starch as Carbon Source, (Phd. Thesis), Malaysia Putra University.
- LING, H.S., LING T.C., Mohamad, R. and Ariff A.B. 2009. Characterization of Pullulanase Type II from *Bacillus cereus* H1.5, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5, 4, 170-179.

- MESSAOUD, E.B., AMMAR, Y.B., MELLOULI, L. and BEJAR, S. 2002. Thermostable Pullulanase Type I from New Isolated *Bacillus thermoovorans* US105: Cloning, Sequencing and Expression of the Gene in *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 827-832.
- NAIR, S.U., SINGHAL, R.S. and KAMAT M.Y. 2006. Enhanced Production of Thermostable Pullulanase Type 1 Using *Bacillus cereus* FDTA 13 and Its Mutant, Production of Pullulanase from *B. cereus*, *Food Technology and Biotechnology*, 44, 2, 275–282.
- REDDY P.R.M., SWAMY M.V. and SEENAYYA G. 1998. Purification and Characterization of Thermostable β -amylase and Pullulanase from High Yielding *Clostridium thermosulfurogenes* SV2, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 89-94.
- ROY, A., MESSAOUD, E.B. and BEJAR, S. 2003. Isolation and Purification of an Acidic Pullulanase Type II from Newly Isolated *Bacillus* sp. US149. *Enzymes and Microbial Technology*, 33, 720-724.
- SAHA, B.C., MATHUPALA, S.P. and ZEIKUS, J.G. 1988. Purification and Characterization of A Highly Thermostable Novel Pullulanase From *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochemical Journal* 252(2): 343-348.
- SALLEH, M. Md., ILLIAS, R., HASSAN, O., KAMARUDDIN, K. and SHAHAB N. 2006. *Cloning and Expression of Pullulanase a Gene from Locally Isolated Bacillus*. (Proje sonuç raporu). Faculty of Science, Skudai, Johor. (Unpublished).
- SAMAH, R.A., MAHMOOD, N.A.N., MAU, G.K., HASSAN O. and ILLIAS, R.M. 2008. Production of Thermostable Pullulanase from *Bacillus flavothermus* KWF-1: Medium Development Using Experimental Design with Data Transformation. *Jurnal Teknologi*, 49, 383-396.
- SAMBROOK, J. and RUSSEL, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
- SINGH, R.S., SAINI, G.K. and KENNEDY, J.F. 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* 73, 515-531.
- SINGH, R.S., SAINI G.K. and KENNEDY J.F. 2010. Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, 80, 401–407.
- TANIMOTO, T., OMATSU, M., IKUTA, A., YUKI, N., MURAKAMI, H., NAKANO, H. and KITAHATA, S. 2005. Synthesis of Novel Heterobranching β -Cyclodextrins Having β -D-N-Acetylglucosaminyl-Maltotriose on the Side Chain. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69(4): 732-739.

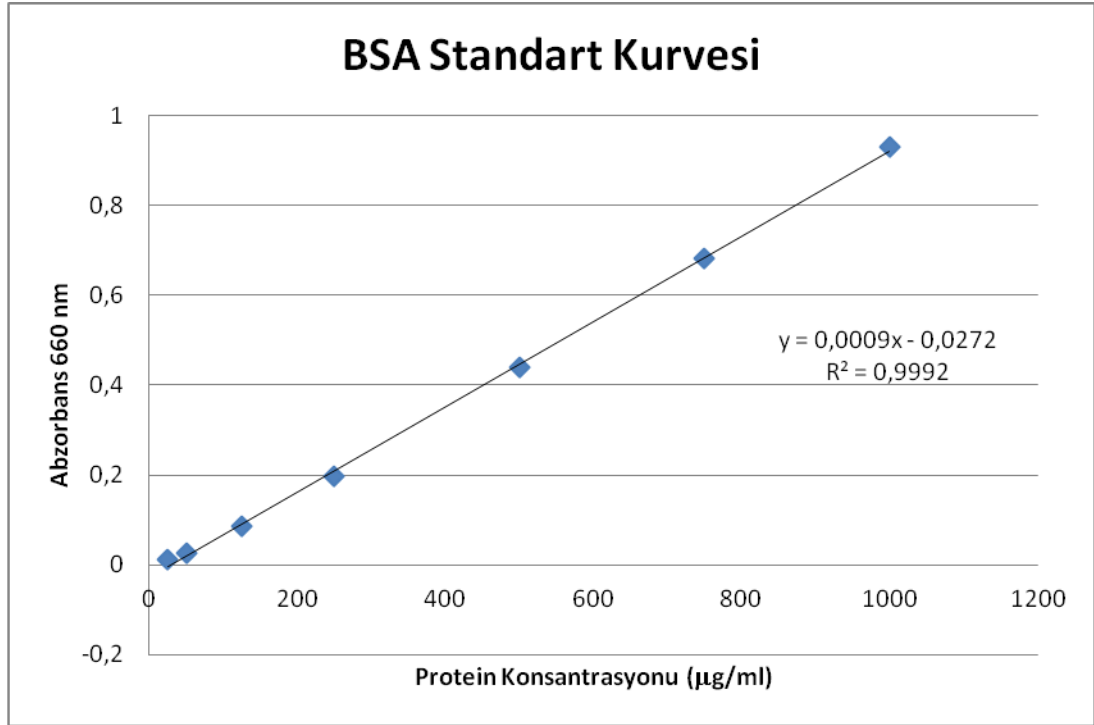
- STEFANOVA, M.E., SCHWERDTFEGER, R., ANTRANIKIAN, A. and SCANDURRA, R. 1999. Heat-Stable Pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*: Characterization and Refolding After Guanidinium Chloride-Induced Unfolding. *Extremophiles* 3: 147-152.
- VAN DER MAAREL, M.J.E.C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG J.C.M., LEEMHUIS H. and DIJKHUIZEN L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology* 94:137–155.
- WU, S. and LETHWORTH G.J. 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques* 36:152:154.

8. EKLER

Ek 8.1. DNS Analizi İçin Glikoz Kalibrasyon Eğrisi



Ek 8.2. Toplam Protein Miktarının Hesaplanmasında Kullanılan Standart Protein (BSA) Kurvesi



Ek 8.3. PZR Çalışmaların Kullanılan Primerler ve Sekansları

Primer	Sekans
WGF1	ATGGTCAGCATCCGCCGACG
WGR1	CCGTTCCGATGCCGTTTACTGC
PrF1	CTCCAAATTGGCGCGGTCATCCGGACG
PrF2	ATGCATACAATTGGGGATATAACCCGCTTCA
PrR2	TGAAGCGGTTATATCCCCAATTGTATGCAT
PrR1	ATCATTGCCAACGCCGGTGCC
XhoIF	CTCTCGAGAAGAGAATGGTCAGCATCCGCCG
NotIR	GCGGCCGCTCAAGCAAACCTTAAGATCTGATG
Pul22NotIHTR	TTGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGAT GAGCAAACCTTAAGATCTGATG
168pul-520F	TGGATGGAAACAGTTGACC
168pul-551R	GCCTTGGCATACTGGTCAA
168pul-991F	CGAGTCATTCTGGATGTTGT
168pul-1180R	AATAGACCACGCAATCCG
168pul-1507F	GGATGGAAGGCATTAGCAC
168pul-158R	AAAGGTGTGATTGTCGTGTG
410F	ACCAATCCAGTGACAGCATC
461R	ATAAACGGAACTCCCTGGG
446F	ACACGCTTCAAATGACACG
504R	ATCTCCAGCCACTGTAACG
pulATGF	ATGGTCAGCATCCGCCGACGCTTCGAAG
1F	TTCTCCATCCATGAAAACAGCGG
2F	AAT TGG GGA TAT AAC CCG CTT CAT TT
2R	AAA TGA AGC GGG TTA TAT CCC CAA TT
3F	ACG GCA CCG GCG TTG GCA ATG A
4R	CATTTTATCCCAAAGGTGTGATTGTCGTG
5R	TATAAGATAACCGTTCCGATGCCGTT
puladpSTOP	TCAAGCAAACCTTAAGATCTGATGCTAAA TATAAGATAACCGTTCCGATGCCGTT
BK07stopht	TTGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGAT GAGCAAACCTTAAGATCTG

Ek 8.4. pJET-PY22pul Plazmidi ile Elde Edilen Pullulanaz Geni Nükleotid Dizisi ve Genin Kodladığı Rekombinat Proteininin Amino Asit Dizisi

718 AA(2154 bases), MW=80967	
1	ATGGTCAGCATCCGCCGAGCTTCGAAGCGTATGTCGATGACATGAATATCATTACTGTT
1	M V S I R R S F E A Y V D D M N I I T V
61	CTGATTCCTGCTGAACAAAAGGAAATCATGACACCGCCGTTTCGGCTTGAGACAGAAATA
21	L I P A E Q K E I M T P P F R L E T E I
121	ACAGATTTTCTCTGGCTGTCAGGGAGGAATACTCCCTTGAAGCAAAATACAAGTACGTC
41	T D F P L A V R E E Y S L E A K Y K Y V
181	TGCGTATCCGACCATCCTGTGACATTTGGAAAAATCCATTGCGTCAGAGCATCCAGCGGC
61	C V S D H P V T F G K I H C V R A S S G
241	CACAAAACGGATCTCCAAATTGGCGCGGTCATCCGGACGGCAGCGTTTGATGACGAATTT
81	H K T D L Q I G A V I R T A A F D D E F
301	TATTATGACGGAGAGCTGGGCGCCGTTTATACCGGGATCATAACCGTATTTAAAGTATGG
101	Y Y D G E L G A V Y T A D H T V F K V W
361	GCGCTGCTGCAACCTCAGCTGCTGTCAAGCTTTCACACCCCAATAAAAAGCGGGCGCACA
121	A P A A T S A A V K L S H P N K S G R T
421	TTCCAAATGACTCGCTTGGAAAAAGGCGTCTATGCCGTTACGGTCACAGGTGACCTTAC
141	F Q M T R L E K G V Y A V T V T G D L H
481	GGATATGAGTATTTGTTTTGCATCTGCAACAATTCAGAATGGATGGAAACAGTTGACCAG
161	G Y E Y L F C I C N N S E W M E T V D Q
541	TATGCCAAGGCTGTGACTGTAAATGGAGAGAAGGGCGTCGTCTTGCGCCGGATCAAATG
181	Y A K A V T V N G E K G V V L R P D Q M
601	AAATGGACTGCTCCTCTTAAACCATTCTCACACCCTGTGGATGCCGTCATCTATGAGACG
201	K W T A P L K P F S H P V D A V I Y E T
661	CATCTTCGCGACTTCTCCATCCATGAAAACAGCGGCATGATAAACAAGGGAAAATACTTA
221	H L R D F S I H E N S G M I N K G K Y L
721	GCGCTGACGGAAACTGATACACAAACCGCAAATGGCAGTTCTTCGGGATTAGCGTATGTA
241	A L T E T D T Q T A N G S S S G L A Y V
781	AAAGAGCTTGGTGTGACACATGTGGAGCTTCTGCCGGTGAATGATTTTGCCGGAGTTGAT
261	K E L G V T H V E L L P V N D F A G V D
841	GAAGAGAAGCCGCTTGATGCA <u>TACAATTGGGGATATAACCCG</u> CCTTCATTTCTTTGCCCCG
281	E E K P L D A <u>Y N W G Y N P</u> L H F F A P

901 GAGGGAAGCTATGCCTCAAATCCTCATGATCCTCAAACGAGAAAAACAGAGCTGAAACAA
 301 E G S Y A S N P H D P Q T R K T E L K Q

 961 ATGATCAATACCCTGCATCAGCACGGTCTGCGAGTCATTCTGGATGTTGTTTTAACCAT
 321 M I N T L H Q H G L R V I L D V V F N H

 1021 GTGTATAAGAGGGAGAATTCCCCCTTTGAAAAGACAGTGCCCGGTTATTTTTTCCGGCAC
 341 V Y K R E N S P F E K T V P G Y F F R H

 1081 GACGAATGTGGGATGCCATCAAACGGCACCGGCGTTGGCAATGATATTGCATCAGAAAAGA
 361 D E C G M P S N G T G V G N D I A S E R

 1141 AGGATGGCAAGAAAATTCATTGCGGATTGCGTGGTCTATTGGCTTGAAGAATACAATGTT

 381 R M A R K F I A D C V V Y W L E E Y N V

 1201 GACGGCTTCCGCTTTGATCTCCTCGGGATTTTAGATATTGACACCGTGCTTTATATGAAA
 401 D G F R F D L L G I L D I D T V L Y M K

 1261 GAGAAAGCAACTAAGGCAAAGCCCGGAATCCTGCTTTTTTGAGAAGGGTGGGACCTGGCT
 421 E K A T K A K P G I L L F G E G W D L A

 1321 ACACCGCTGCCGCATGAACAGAAAGCTGCTTTGGCGAACGCGCCAAGAATGCCGGGCATC
 441 T P L P H E Q K A A L A N A P R M P G I

 1381 GGCTTTTTTAATGATATGTTTTCGTGACGCTGTAAAAGGGAACACCTTTCACCTTAAGGCA
 461 G F F N D M F R D A V K G N T F H L K A

 1441 ACAGGGTTTGCCTCGGCAACGGTGAATCAGCACAAAGCTGTGATGCATGGAATTGCCGGG
 481 T G F A L G N G E S A Q A V M H G I A G

 1501 TCTTCCGGATGGAAGGCATTAGCACCGATTGTTCCGGAACCAAGCCAGTCCATCAATTAT
 501 S S G W K A L A P I V P E P S Q S I N Y

 1561 GTCGAATCACACGACAATCACACCTTTTGGGATAAAAATGAGCTTTGCGCTTCCTCAAGAA
 521 V E S H D N H T F W D K M S F A L P Q E

 1621 AATGACAGCCGAAAGCGAAGCAGGCAAAGGCTTGCAGCCGCGATTATTTTGCCTTGCCCAA
 541 N D S R K R S R Q R L A A A I I L L A Q

 1681 GGGGTGCCGTTTATTACAGCGGCCAGGAATTTTTCCGGACGAAGCAGGGAGTGGAAAAC
 561 G V P F I H S G Q E F F R T K Q G V E N

 1741 AGCTATCAATCCAGTGACAGCATCAACCAGCTCGACTGGGATCGCCGTGAAACATTCAAA
 581 S Y Q S S D S I N Q L D W D R R E T F K

 1801 GAAGATGTTCACTATATCCGCAGGCTGATCTCGCTGAGAAAAGCGCATCCTGCATTCCGT
 601 E D V H Y I R R L I S L R K A H P A F R

 1861 CTTAGGTCCGCTGCAGACATCCAGGCCATCTTGAATGCTTGACGCTAAAAGAACACCTT

621	L R S A A D I Q R H L E C L T L K E H L
1921	ATCGCATAACAGGCTTTATGATCTTGACGAGGTTGACGAATGGAAAGATATCATTGTTATC
641	I A Y R L Y D L D E V D E W K D I I V I
1981	CATCACGCGAGTCCAGACTCCGTCGAGTGGAGGCTGCCAAACGACATACCTTATCGGCTT
661	H H A S P D S V E W R L P N D I P Y R L
2041	TTATGTGATCCATCAGGATTTTCAGGAAGACCCAACAGAAATCAAGAAAACGGTTGCAGTA
681	L C D P S G F Q E D P T E I K K T V A V
2101	AACGGCATCGGAACGGTTATCTTATATTTAGCATCAGATCTTAAGAGTTTTGCTTGA
701	N G I G T V I L Y L A S D L K S F A *

Ek 8.6. BK07 Pullulanaz Geni ile PY22 Pullulanaz Geninin Aminoasit Dizilerinin

Karşılaştırılması

Bacillus subtilis PY22	MVSIRRSFEAYVDDMNIITVLIPAEQKEIMTPPFRLETEITDFPLAVREEYSLEAKYKYV	60
BKpul	MVSIRRSFEAYADEMNIITVLIPADQKDTFTPPFQLETDTAETPLTVSQEWQTEGKCKYV	60
Consensus	mvsirrsfeay d mniitvlipa qk tppf let pl v e e k kyv	
Bacillus subtilis PY22	CVSDHPVTFGKTHCVRASSGKTKDLQIGAVVRTAAFDDEFYYDGELGAVYTDHITVFKVW	120
BKpul	CVAEQPVTFGKTHHVRASGGKTKDLQIGAVVRTDAFDAFFYYDGELGAVYTSDYTFKFW	120
Consensus	cv pvtfgk h v as g ktdlqigav rt afd fyydgelgavyt d t fkw	
Bacillus subtilis PY22	APAATSAAVKLSHPKSGRTFQMTREKGVYAVTVTGDLHGVEYLFICNNSSEWMETVDQ	180
BKpul	APAATSAAVKLSHPKSGHTLQMTRENGVYAVTVAGDLHGVEYVYRICNNEWTEVTFD	180
Consensus	apaatsaavklshp ksg t qmtr e gvyavtv gdlhgvey icnn ew etvd	
Bacillus subtilis PY22	YAKAVTVNGEKGVVLRPDQMKWTAPLKPFSHPVDATVYETHRDFSIHENSGMKNKGKYL	240
BKpul	YAKAVTVNGEKGVVLRPDQNSAPSLAPFSHPVDATVYEMHTRDFSIHENSGMKNKGKYA	240
Consensus	yakavtvngekgvvlrpdq l pfs pvda iye h rdfsihensgm nkgky	
Bacillus subtilis PY22	ALTEDTTOTANGSSSGLAYVKELGVTHVELLEVNDEAGVDEEKPLDAYNWGYNPLHFFAP	300
BKpul	ALAEQDTKTKANGSSITGLSYLKELGVTHIELLEINDVAGVDEENPLAYNWGYNPLHFFAP	300
Consensus	al etdt t ngss gl y kelgvth ellp nd agvdee pl aynwgy nplhffap	
Bacillus subtilis PY22	EGSYASNPHDPQTRKTELKQMIINTLHQHGLRVILDVVFNHVKRENSPFPEKTVPGYFFRH	360
BKpul	EGSYASNPHDPQTRNTEVKQMIHTLHQHGLRVILDVVFNHVKRENSPFPEKTVPGYFFRH	360
Consensus	egsyasnphdpqtr te kqmi tlhqhglrvildvv nhvy re spfektvpgyffrh	
Bacillus subtilis PY22	DECGMPSNGTGVGNDIASERRMARKFIADCVVYVWLEEYVNDVGRFRFDLLGILDITVLYMK	420
BKpul	DOFGMPSNGTGVGNDIASERRMARKFITDCVMYVWVKEVDVGRFRFDLLGILDITVLYMK	420
Consensus	d cgm sngtgv gndiaserrmarkfi dcv yw ey vdgfrfdllgildi tvl mk	
Bacillus subtilis PY22	EKATKAKPGILLFGEGWDLATPLPEQKAALANAPRMPGIGFFNDMFRDAVKGNTFHLKA	480
BKpul	EKASEVVKPGILLFGEGWDLATPLPEQKATLANASKMPGVGFNDMFRDAVKGNTFHLAA	480
Consensus	eka kpgillfgegw dlatplp eqka lana mpg gffnd frdavkgn tfh a	
Bacillus subtilis PY22	TGFALGNESAAQAVMGIAGSSGWKALAPVPEPSQSINYVESHDNHTFWDKMNSFALPQE	540
BKpul	AGFALGNGETETVMGIAGSSGWKETAPLVSAAPSQSINYVESHDNHTFWDKMNLALPQE	540
Consensus	gfalgnge vm giagssgw k ap v psqsinyveshdnhtfwdkm alpqe	
Bacillus subtilis PY22	NDSRKRSRQRLAAAIILLAQGVFFIHSGQEFFRRTKQGVENSYQSSDSINQLDWRRETFK	600
BKpul	SDSRKRSRQKLATAIILLAQGVFFIHSGQEFFRRTKQGVENSYQSSDSINQLDWSRCETFK	600
Consensus	dsrkrsrq la aillaqgvffihsgqeffr rtkqgvensyqssdsinqldw r etfk	
Bacillus subtilis PY22	EDVHYIRRLISLRKAHPAFLRSAAADIQRHLECLTLKEHLIAYRLYDLDEVDEWKDIIVI	660
BKpul	QDVNYVHRLISLRKAHPAFLRTSSADIQRCLLECLALKEHLIAYRLFNLGAVDEWEEIIVI	660
Consensus	dv y rrlislrkahpafrl s adiqr lecl lkehli yrl l vdew iivi	
Bacillus subtilis PY22	HHASPDSVEMRLPNDIPYRLLCDPSGFQEDPTEIKKTVAVNGIGTVILYLASDLKSFA	718
BKpul	HHASPDSVITWLPKDKAYRLLCDTDEGRADSGEIKKAVAVNGIGTVILYLASDLKSFA	718
Consensus	hhaspdsv w lp d yrllcd gf d eikk vavngigtvilylasdlksfa	

ÖZGEÇMİŞ

Fidan ERDEN, 1987 yılında Kdz. Ereğli’de doğdu. İlköğretim ve liseyi Kdz. Ereğli’de tamamladı. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde lisans öğrenimine başladı. 2010 yılında Mühendislik Fakültesi ikincisi ve onur öğrencisi olarak Gıda Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen bu kurumda öğrenimine devam etmektedir.