

T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

“TÜRKİYE’NİN DEĞİŞİK BÖLGELERİNDEN TERMOSTABİL  
ALFA AMİLAZ ÜRETEN *Bacillus* sp. TÜRLERİNİN  
İZOLASYONU KARAKTERİZASYONU VE  
ALFA AMİLAZ GENİNİN KLONLANMASI”

Tuğba ŞİMŞEK

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

**ANKARA**

**2006**

Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU danışmanlığında Tuğba ŞİMŞEK tarafından hazırlanan bu çalışma 19/Nisan/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI IMZA:

Üye : Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ IMZA:

Üye : Prof. Dr. Çervin ÇIRAKOĞLU IMZA:

Üye : Prof. Dr. Ufuk BAKIR IMZA:

Üye : Doç.Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU IMZA:

Yukarıdaki sonucu onaylayanların

(İMZA)

Prof. Dr. Nejat AKAR

Enstitü Müdürü

**Anneme, Ablalarım ve Babamın Anısına**

**Türkiye'nin değişik bölgelerinden termostabil  $\alpha$ -amilaz üreten *Bacillus* sp. türlerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve  $\alpha$ -amilaz geninin klonlanması**

**ÖZET**

Bu çalışma kapsamında Türkiye'nin değişik bölgelerindeki doğal sıcak su kaynaklarından (kaplıca kaynaklarından) su örnekleri toplanmış ve bu örneklerden termostabil  $\alpha$ -amilaz üreten termofilik *Bacillus*'lar (optimum üreme sıcaklığı  $> 50^{\circ}\text{C}$  olan termofilik *Bacillus* türleri) izole edilmiştir ve *Bacillus* sp. OZ1 suşunda  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Bununla beraber,  $\alpha$ -amilaz enzim üretiminden sorumlu olan "*Amy E*" geni uygun primerlerin kullanımı ile uygun koşullar altında Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile (PCR) çoğaltılarak pBR322 pilazmid vektörüne takılarak uygun konukçu hücre olan ve  $\text{CaCl}_2$  ile alıcı hale getirilen *E. coli* DH $\alpha$  suşuna aktarılmış ve genin konukçu hücrede ifadesi gözlemlenmiştir. Rekombinant pilazmidi taşıyan kolonilerin enzim aktivitesi belirlenerek mature enzim aktivitesi ile kıyaslanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Amy E*,  $\alpha$ -amilaz, gen klonlanması, PCR, Termofil *Bacillus* sp., termostabil enzim

**Isolation and characterization of  $\alpha$ -amylase producing *Bacillus* sp. isolated  
from different areas of Turkey and cloning of  $\alpha$ -amylase gene**

**ABSTRACT**

In this work, water samples were collected from nature thermal springs located different areas of Turkey and from these samples, alpha amylase producing thermophile *Bacillus* sp (optimum growth temperature of  $> 50^{\circ}\text{C}$ ) were isolated and among these isolates,  $\alpha$ -amylase enzyme activity of *Bacillus* sp. OZ1 was determined by DNS method. Besides, the “*AmyE*” gene (associated with production of  $\alpha$ -amylase) which was amplified by PCR (polymerase chain reaction) reaction by use of suitable primers was cloned into pBR322 vector DNA and transformed into suitable host *E.coli* DH $\alpha$  which made competent by  $\text{CaCl}_2$ . Following transformation, the expression of gene in host cell was observed. Moreover, the enzyme activities of colonies carrying recombinant plasmid were determined and compared with that of mature enzyme.

**Anahtar Kelimeler:** *Amy E*,  $\alpha$ -amylase, gene cloning, PCR, thermophile *Bacillus* sp., thermostabile enzyme

## TESEKKÜR

10.11.1978 yılından 01.27. 2006 tarihine kadar benimle olan, basta insan olmanın sonra eğitim ve öğrenimin değerini bana öğreten her konuda bana destek olan hayati ve yaşadıkları ile her zaman gurur duyduğum benim bu günlere gelmemi sağlayan, bundan sonraki yaşamımda da varlığını ve desteğini her zaman yanımda hissedeceğim çok değerli babam Cemal ŞİMŞEK'e, her türlü sıkıntımı benimle paylaşan, her zaman arkamda olan her zaman gurur duyduğum çok değerli annem Hüsniye ŞİMŞEK'e de beni bu günlere getirdiği için teşekkür ediyorum. Ablalarım Mehtap ŞİMŞEK ŞAHİN, Serap ŞİMŞEK CALT, Sevtap ŞİMŞEK ÖZTÜRK'e çocukluğumdan bu güne kadar başarıları, yaptıkları ve insanlıkları ile doğru örnek oldukları için ve her zaman yanımda olup yol gösterdikleri, destekledikleri için teşekkür ediyorum.

Öğrenim hayatımda çeşitli sıfatlarda bir çok öğretim üyesini tanıma, değerlendirme ve kıyaslama fırsatı buldum. Bilgisi ve kişiliğine saygı duyduğum bir kaç değerli hocam oldu. Bunların en başında bana güvenip bana inanarak beni danışmanlığına kabul eden, laboratuvarında çalıştığım süre içerisinde laboratuvarının bütün imkanlarını bana açan, bilgisini, yardımını ve manevi desteğini benden esirgemeyen, birlikte bir çok sorun aştığımız çok değerli hocam Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU gelmektedir. Bununla birlikte laboratuvarında çalışmış olduğum süre içerisinde benden bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Fadime KIRAN, İlknur ALTUNTAŞ, Tuliz YILDIRIM'la dostluğumuzun ve bilimsel paylaşımımızın temelini atmış olduk. Laboratuvarında sabahlara kadar beni yalnız bırakmayan hem çalışıp hem eğlendiğimiz bu eşsiz laboratuvar ekibi ile çalışmaktan büyük keyif aldım. Zaman zaman çalışmaktan yorulup ne yapacaklarını şaşırıp alevli meyveler hazırlayarak kendime gelmemi sağlayan arkadaşlarım, hepsinin ayrı ayrı desteğini görmek beni daha güçlü yaptı. Tezimi hazırladığım süre içerisinde bana destek olan değerli arkadaşım Ediz DEMİRTAŞ'a desteğinden dolayı teşekkür ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv

I. GİRİŞ.....	1
---------------	---

II. MATERYAL ve YÖNTEM .....	17
------------------------------	----

2.1	Termostabil alfa-amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp. türlerinin izolasyonu ve tanımlanması .....	17
-----	--	----

2.1.1	Termostabil alfa-amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp. türlerinin izolasyonu.....	17
-------	---	----

2.1.1.1	Bakteriyel kültürler ve besi ortamları .....	17
---------	--	----

2.1.1.2	Kültür ortamları.....	18
---------	-----------------------	----

2.1.1.3	Tampon ve solüsyonlar .....	18
---------	-----------------------------	----

2.1.1.4	DNA markırları .....	18
---------	----------------------	----

2.1.1.5	Kimyasal Maddeler .....	18
---------	-------------------------	----

2.1.1.6	Pilazmidler .....	18
---------	-------------------	----

2.1.1.7	Solüsyon ve materyallerin sterilizasyonu .....	18
---------	--	----

2.1.1.8	Bakteriyel kültürlerin saklanması .....	18
---------	---	----

2.1.2	Termostabil alfa-amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp. türlerinin tanımlanması .....	19
-------	--	----

2.1.2.1	Glukoz testi .....	19
2.1.2.2	Katalaz testi.....	19
2.1.2.3	Metilen mavisi ile boyama.....	19
2.1.2.4	Gram boyama.....	19
2.1.2.5	Koloni morfolojisi.....	20
2.1.2.6	Spor boyama .....	20
2.1.2.7	İyodin testi ile amilolitik aktivitenin tayini.....	20
2.1.2.8	Termostabil alfa-amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunun üretmiş olduğu enzim aktivitesinin DNS yöntemi ile belirlenmesi.....	20
2.2	Termostabil <i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunda alfa amilaz üretiminin genetik yönü .....	22
2.2.1	Alfa-amilaz üretiminden sorumlu gen bölgesinin yerleşimi ..	22
2.2.1.1	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunda alfa amilaz üretiminden sorumlu olan kromozomal DNA nın izolasyonu.....	22
2.2.1.2	Kromozomal DNA üzerinden alfa amilaz geninin PCR reaksiyonu ile amplifikasyonu .....	23
2.2.1.3	Agaroz jel elektroforez.....	24
2.2.1.4	PCR ürününün agaroz jelde eldesi ve saflaştırılması..	24
2.2.1.5	PCR gen ürününün <i>HindIII</i> ve <i>PvuII</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	24
2.2.2	Vektör pBR322 üzerinde yapılan genetik manipülasyonlar.....	25
2.2.2.1	pBR322 vektörünün <i>HindIII</i> ve <i>PvuII</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	25
2.2.2.2	pBR322 restriksiyon enzim fragmantlarının agaroz jelden eldesi ve saflaştırılması .....	26



2.2.3	Rekombinant DNA molekülünün (pOZ322) oluşturulması (ligasyon).....	26
2.2.4	Konukçu <i>E. coli</i> 'nin alıcı hücre haline getirilmesi .....	27
2.2.5	pOZ322 rekombinant DNA'nın alıcı <i>E. coli</i> DH $\alpha$ hücrelerine transformasyonu .....	27
2.2.6	Rekombinant DNA molekülünü taşıyan <i>E. coli</i> DH $\alpha$ suşundan pilazmid DNA izolasyonu .....	28
2.2.7	DNA fragmentlerinin ve pilazmidlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması .....	29
III. BULGULAR .....		30
3.1	Termostabil alfa-amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp. türlerinin izolasyonu ve tanımlanması .....	30
3.1.1	Termostabil alfa-amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp. türlerinin izolasyonu .....	30
3.1.2	Termostabil alfa-amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp. türlerinin tanımlanması .....	30
3.1.2.1	Glukoz test sonuçları.....	30
3.1.2.2	Katalaz test sonuçları .....	31
3.1.2.3	Metilen mavisi ile boyama sonuçları .....	32
3.1.2.4	Gram boyama sonuçları .....	32
3.1.2.5	Koloni morfolojisi sonuçları .....	33
3.1.2.6	Spor boyama sonuçları.....	34
3.1.2.7	İyodin testi ile amilolitik aktivitenin tayini.....	34
3.1.2.8	Termostabil alfa-amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp OZ1 suşunun üretmiş olduğu enzim aktivitesinin DNS yöntemi ile belirlenmesi.....	35
3.2	Termostabil <i>Bacillus</i> sp OZ1 suşunda alfa amilaz üretiminin genetik yönü... ..	37

3.2.1	Alfa amilaz üretiminden sorumlu olan gen bölgesi.....	37
3.2.1.1	Termostabil amilaz üreten <i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşundan kromozomal DNA'nın izolasyonu .....	37
3.2.1.2	Kromozomal DNA üzerinden alfa amilaz geninin PCR reaksiyonu ile amplifikasyonu .....	38
3.2.1.3	PCR ürününün agaroz jelde eldesi, <i>HindIII</i> ve <i>PvuII</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	38
3.2.2	Vektör pBR322 üzerinde yapılan genetik manipülasyonlar....	39
3.2.2.1	pBR322 vektörünün <i>HindIII</i> ve <i>PvuII</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	40
3.2.3	Rekombinant DNA molekülünün (pOZ322) oluşturulması (ligasyon).....	41
3.2.4	pOZ322 rekombinant DNA'nın alıcı <i>E. coli</i> DH $\alpha$ hücrelerine transformasyonu .....	41
3.2.5	Rekombinant DNA molekülünü taşıyan <i>E. coli</i> DH $\alpha$ suşlarının tespiti .....	42
3.2.6	Rekombinant DNA molekülünü taşıyan <i>E. coli</i> DH $\alpha$ suşundan plazmid DNA izolasyonu .....	42
3.2.7	Rekombinant <i>E. coli</i> DH $\alpha$ suşunun üretmiş olduğu enzim aktivitesinin DNS yöntemi ile belirlenmesi .....	44
IV.	TARTIŞMA ve SONUÇ .....	47
	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>49</b>

<b>EKLER.....</b>	<b>55</b>
EK-1. Bakteri izolasyonunda kullanılan kültür ortamları .....	55
EK-2. Tampon ve solüsyonlar.....	57
EK-2A Biyokimyasal testler ve boyama teknikleri.....	57
EK-2B DNA yöntemi ile amilolitik aktivitenin belirlenmesi..	59
EK-2C Kromozomal DNA izolasyonu.....	60
EK-2D Alfa-amilaz geninin PCR ile kromozomal DNA üzerinden çoğaltılması.....	62
EK-2E Agaroz jelin hazırlanması.....	63
EK-2F PCR ürününün agaroz jelden pürifikasyonu.....	64
EK-2G PCR ürününün HindIII ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	65
EK-2H pBR322 pilazmid vektörünün HindIII ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	66
EK-2I Alfa amilaz genini içeren PCR ürününün aynı enzimler ile kesilen pBR322'ye aktarılması ve rekombinant pilazmidin oluşturulması.....	67
EK-2J Alfa amilaz geni taşıyan rekombinant DNA molekülünün <i>E.coli</i> DH $\alpha$ suşuna CaCl <sub>2</sub> yöntemi kullanılarak aktarılması.....	68
EK-2K Pilazmid DNA izolasyonu.....	70
EK-3. DNA analizleri için kullanılan markırlar .....	72
EK-4. Kimyasal maddeler .....	74
EK-5. pBR322 vektörünün fiziksel haritası .....	76
EK-6. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC168 amyE gen sekansı .....	77
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>78</b>

## SİMGELER DİZİNİ

Molarite	M
Litre	L
Volt	V
Kilogram	kg
Gram	g
Mikro	μ
Piko	p
Mikro litre	μl
Enzim komisyonu	E.C.
Baz pair	bp
Kilobaz pair	kbp
Kilodalton	kDa
Siklodekstringlukoztransferaz	CGT
Deoksinukleikasit	DNA
Ribonukleikasit	RNA
Site directed mutagenез	SDM
Sodyum dodesil sulfat	SDS
Nutrient agar starch	NAS
Nutrient broth starch	NBS
Minimal besi yeri	M9
Hidrojenperoksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
DLA	Diffusion limited aggregation model
Enzim ünitesi	U
Polietilenglikol	PEG
Mikromol	μmol
Polimeraz zincir reaksiyonu	PCR
Reverse	R
Forward	F
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
Luria Bertani	LB

Isopropyl thiogalactoside	IPTG
American type culture collection	ATCC
Optik dansite	OD
Nanometre	nm
Deoksinukleitfosfat	dNTP
Bovin serum albumin	BSA
Adenozintrifosfat	ATP

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1	Amilaz enziminin katalizlediği reaksiyon .....	1
1.2	Termostabil Alfa Amilaz enziminin üç boyutlu yapısı .....	2
1.3	Amilaz molekülünün biyokimyasal yapısı .....	7
3.1	Amilolitik <i>Bacillus</i> sp. suşlarını temsilen <i>Bacillus</i> sp. OZ1' de glukoz testi.....	31
3.2	Katalaz pozitif <i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunda gaz oluşumu. ....	31
3.3	Çubuk şeklinde morfoloji gösteren <i>Bacillus</i> sp. OZ1. ....	32
3.4	Gram-pozitif <i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşu .....	32
3.5A	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunda "DLA" modelinde koloni morfolojisi .....	33
3.5B	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 suşunda "DLA" modelinde koloni morfolojisi .....	33
3.6	Malaşit yeşili ile boyanan <i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunda spor yapısı.....	34
3.7	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 (a) ve rekombinant <i>E. coli</i> DH $\alpha$ (b) suşlarının amilolitik aktivitesi koloniler etrafında oluşan zonların varlığı ile gözlenmiştir.....	35
3.8	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunda serbest glukoz miktarının spektrofotometrik tayini için kullanılan standart glukoz eğrisi (OD <sub>540nm</sub> ).....	35

3.9	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunda serbest glukoz miktarının 0-30dakika arasındaki spektrofotometrik tayini (OD <sub>540nm</sub> ).....	36
3.10	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşunda serbest glukoz miktarının 0-8 saat arasındaki spektrofotometrik tayini (OD <sub>540nm</sub> ).....	36
3.11	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşu ve <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 suşundan kromozomal DNA izolasyonu.....	37
3.12	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşuna ait kromozomal DNA ve PCR ürünü.....	38
3.13	pBR322 pilazmid vektörü ve <i>Bacillus</i> sp. OZ1 suşuna ait kromozomal DNA'dan elde edilen PCR ürünü manüpülasyonların birlikte görüntülenmesi.....	39
3.14	Halkasal ve restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pBR322 pilazmid vektörü..	40
3.15	pBR322' ye ait fragment ve aynı enzimler ile kesilmiş PCR ürünü .....	41
3.16	Rekombinant pilazmidi barındıran amilolitik özellikte ampisillin dirençli <i>E. coli</i> DH $\alpha$ suşunun oluşturduğu koloniler (LB nişastalı agar + Ampisillin).....	43
3.17	Rekombinant kolonilerin seçimi için kullanılan kontrol besi yerinde gelişen koloniler (LB nişastalı agar).....	43
3.18	Rekombinant pilazmid içeren <i>E. coli</i> DH $\alpha$ suşundan rekombinant pilazmid izolasyonu.....	44
3.19	<i>E. coli</i> DH $\alpha$ suşunda serbest glukoz miktarının 0-30 dakika arasındaki spektrofotometrik tayini (OD <sub>540nm</sub> ).....	45
3.20	<i>E. coli</i> DH $\alpha$ suşunda serbest glukoz miktarının 0-8 saat arasındaki spektrofotometrik tayini (OD <sub>540nm</sub> ).....	45

3.21	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 ve <i>E. coli</i> DHα suşlarında alfa amilaz enzim aktivitesi (0-8 saat).....	46
3.22	<i>Bacillus</i> sp. OZ1 ve <i>E. coli</i> DHα suşlarında alfa amilaz enzim aktivitesi (0-30 dak).....	46



## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

1.1	Ticari olarak pazarda yer alan amilazlar.....	16
-----	---	----

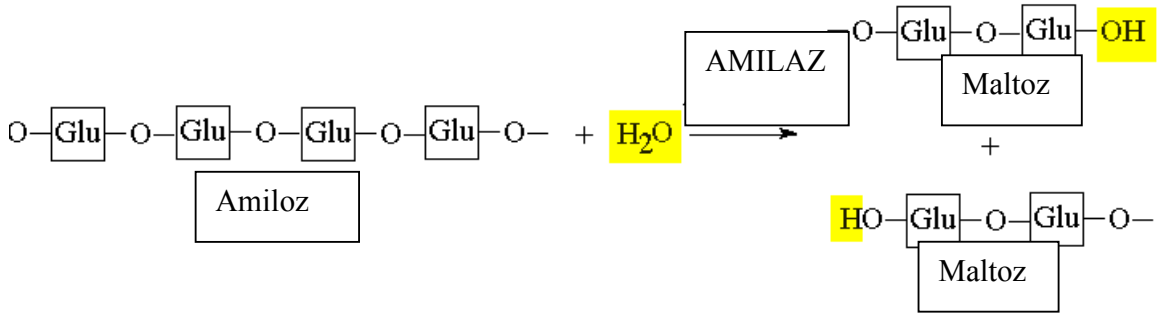
# 1. GİRİŞ

## 1.1. Termostabil Alfa Amilaz Enziminin Yapısı

Enzim komisyonu (E.C.) enzimlerin sınıflandırılmasını, katalizledikleri reaksiyonlara göre yapar. Alfa Amilaz enzimi için bu numara “3.2.1.1” olup sergilediği reaksiyon 1-4 alfa glukozidik bağların oligosakkaritlerde ve polisakkaritlerde hidrolizidir (Şekil 1.1)(Nielsen ve Borchert 2000).

Farklı kaynaklardan elde edilen alfa amilazların aminoasit sekansları bunların çeşitliliğini ortaya koyar (Asghari *et al* 2004).

Bakteriyel alfa amilaz ökaryotik benzerlerinden açık aralıkla uzaktır. Yapılan sekans çalışmalarında pankreatik alfa amilaz ile bakteriyel alfa amilaz arasında %15-20 benzerlik bulunmuştur. Yalnızca *Alteromonas haloplanctis*' in alfa amilazı ile %50 benzerlik olduğu görülmüştür (Nielsen ve Borchert 2000).



Şekil 1.1 Amilaz enziminin katalizlediği reaksiyon

Alfa amilazı kodlayan gen yaklaşık 1845 bp açık okuma çerçevesi içeren 613 aminoasitlik protein kodlayan bir bölgedir. Yaklaşık 69 kD'dur (Lo *et al* 2001).

Bununla beraber memeli ve bakteriyel alfa amilazın her ikisinde de korunmuş A,B,C bölgeleri olduğu, yapılan x-ray çalışmalarında gösterilmiştir (**Şekil 1.2**)(Nielsen ve Borchert 2000).



**Şekil 1.2** Termostabil Alfa Amilaz enziminin üç boyutlu yapısı

Bakteriyel alfa amilazlar arasındaki sekans benzerliğine bakıldığında *Bacillus Licheniformis* (BLA) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (BLA) arasında %80; *Bacillus Stearothermophilus* (BStA) ile (BLA) arasında %65 benzerlik bulunmuştur (Nielsen *et al* 2003). Yapısal benzerliklerine karşın bu enzimlerin termal dayanıklılıkları ve yarı ömürleri farklıdır.

Bütün bu bilinen alfa amilazlar korunmuş  $Ca^{+2}$  bölgeleri içerirler ve bunlar A ve B bölgelerinin iç yüzeyinde bulunur. Aktif bölgede olmasa bile direk olarak katalize iştirak ederler (Nielsen ve Borchert 2000, Nielsen *et al* 2003).

Bununla beraber bir diğer kalsiyum bağlama bölgesi (BAA)'da A ve C' nin iç yüzünde bulunmuştur (Nielsen *et al* 2003). Alfa amilazların çoğunda kalsiyum aktif bölgede bulunmuştur (Nielsen ve Borchert 2000).

Alfa Amilaz enziminin karakteristiği ve kalsiyum gereksinimi, yapısal bütünlüğü ile ilgili olup kalsiyum iyonlarının çıkarılması termostabilite de ve enzimatik aktivitede azalma ile kendini gösterir. *Bacillus sp.* cinslerinden elde edilen alfa amilazların termal inaktivasyonu buna bağlı olarak iki aşamalı bir prosestir. İlk aşamada geri dönüşümlü olarak kalsiyum iyonlarının ayrılması söz konusudur. Bunu takip eden ikinci adım tersinmez denatürasyondur (**Nielsen et al 2003**).

## 1.2. Termostabil Alfa Amilazın Termal Stabilitesi

Alfa amilaz içeren endüstriyel proseslerin çoğunun gerçekleştiği koşullarda alfa amilazın inaktivasyonu için birçok neden vardır. Bu uygulamalardaki yüksek sıcaklıklarda yapılan inkübasyon, ekstrem pH'lar, metal iyon keltalayıcıları, oksidasyon, proteinin yapısındaki katlanmaların açılması dolayısı ile denatürasyona neden olmaktadır.

Alfa amilazın termodinamik olarak stabilitesinin ölçümü proteinin katlanmış ve katlanmamış hali arasındaki serbest enerji " $\Delta G$ " ile ölçülür. Ancak delta G tam olarak belirlenememiştir. Çünkü alfa amilazın katlanmış durumdaki hali invitro olarak geri dönüşümsüzdür. *Bacillus sp.*'e ait alfa amilazın termoinaktivasyonunun iki aşamalı bir proses olduğu invitro çalışmalar sonucunda bulunmuştur. İlk erken safha olup geri dönüşümlü katlanmaların açıldığı bir asamadır. Bölgesel olarak katlanmaların açılması gözlenir. İkincisi ise tersinmez geri dönüşümsüz katlanmaların açılması ve tersinmez denatürasyonun görüldüğü aşamadır (**Nielsen ve Borchert 2000**).

Yapılan çalışmalarda alfa amilazın çoğunun hücre dışı enzimler olduğu bulunmasına karşın, son zamanlarda yapılan çalışmalarda hücre içi alfa amilaz enziminin de varlığı ortaya konulmuştur (**Liebel et al 1997**).

## 1.3. Termostabil Alfa Amilaz Enziminin Önemi

Termostabil enzimler çevreyi kirletici ajanları azaltarak biyodegradasyon yoluyla, prosesleri ekonomikleştirmek ve daha verimli hale getirmek amacı ile kullanılır (**Fujiwara 2002**).

Termostabil alfa amilazlar bu amaçla kullanılan enzimlere bir örnektir. Sayısız mikroorganizma içinde bakteri, mantar ve mayalarında bulunduğu, nişastayı degrede edebilen alfa 1-4 ve alfa 1-6 bağlarını kırma yeteneğine sahip enzimler üretirler (**Fujiwara 2002**).

Termofil ve hipertermofil mikroorganizmalarda amilolitik enzimlerin karakterize edilmesinde verilen önem gittikçe artmaktadır. Bunlar yalnızca biyoteknolojik potansiyelleri için değil birde termostabilite çalışmalarında kullanılmak üzere iyi bir model olmalarıyla da araştırmaların odağı olmaktadır. Termostabilite mekanizmaları alışılmamış daha termostabil özellikte enzimlerin geliştirilmesi amacı ile de protein mühendisliği çalışmalarında model olarak kullanılmaktadır (**Leveque et al 2000**). Besin maddesi içeriği olarak kullanılan en popüler polisakkarit nişastadır (**Kuruki ve Imanaka 1999**).

Enzim stabilitesinden dolayı endüstriyel proseslerin gerektirdiği haşın, zorlu koşullardaki reaksiyonlar için mezofillerle çalışmak tercih edilmez. Bu enzimlerin keşfi biyokataliz alanında büyük bir etki yaratmıştır. Sonuçta bu enzimler mezofilik benzerlerinin yaşayamadığı koşullarda eşsiz biyokatalistlerdir (**Demirjian et al 2001**). Hücre içi enzim olan alfa amilaz hücre dışı enzimlere göre daha termostabildir (**Cowan 1997**).

Alfa amilazın endüstriyel önemi bu enzim ile yapılan çalışmaların popülaritesini arttırmıştır (**Laderman et al 1993**). Alfa amilaz güçlü bir hidrolitik enzimdir ancak bir içten etkili enzim olan CGTase (Siklodekstringlukotransferaz) alfa amilaza göre düşük hidrolitik özelliكتedir Çünkü dıştan etkili bir enzimdir. *Thermoanaerobacter* ve *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*' ten elde edilmiştir (**Leemhuis et al 2002**).

CGTase (E.C.2.4.1.19.) nişastayı siklodekstrinlere çevirir. Bu yapılar geniş ölçüde yiyecek, kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanılır. CGTase ile alfa amilazın katlanmaları çok benzerdir. Aktif merkez A bölgesindedir, aminoasit sekansları ise düşük benzerlik gösterir ve yaklaşık 70-75 kDa' dır (**Wind et al 1995**).

Termofil özellikteki mikroorganizmalardan elde edilen termostabil enzimler kalıtsal stabilitelelerinden dolayı birçok ticari uygulamada kullanılmaktadır. En geniş kullanım

alanına sahip termostabil enzim alfa amilazdır. Alfa amilazın mezofilik ve termofilik benzerleri incelendiğinde katlanmış durumda olan daha yüksek yapısal esneklik göstermiştir. Buda entropik stabilizasyondan sorumludur. Amilolitik termostabil enzimler kullanılarak tek adımlı işlemler ile glukoz üretiminin maliyeti düşürülüp kaliteli ürün üretme oranı artırılması hedeflenmektedir (**Haki ve Raksit 2003**).

Termostabil alfa amilaz kullanımı ile işlemlerdeki yüksek sıcaklıklarda bakteriyel ve viral kontaminasyon riski en aza iner (**Fujiwara 2002**).

Alfa amilaz enziminin yüksek sıcaklıklara adapte olma özelliği genetik olarak kodlanmıştır. Biyofiziksel ve yapısal çalışmaların ortaya koyduğu modeller gösterir ki, bu adaptasyon bir dizi modifikasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda termal stabilite artmakla beraber proteinlerin rijit ve dayanıklı yapısı denaturasyona karşı dayanıklı hale gelir (**Eichler 2001**).

#### **1.4. Termostabil Alfa Amilaz Enziminin Endüstrideki Yeri**

Ticari olarak piyasaya sürülen Beta amilazların optimal aktivasyonu 60<sup>0</sup>C civarında olup farklı *Bacillus sp.* türlerinden izole edilmiştir. ‘Termamil ve Fungamil’ ticari olarak satılan iki iyi bilinen amilolitik enzimdir. Bunlar Dünya çapında glukoz şurubu ve farklı derecelerde dekstroz içeren dekstroz şuruplarının eldesinde kullanılır (**Haki ve Raksit 2003**).

Amaç aynı prosesin farklı termofil ve hipertermofil mikroorganizmalar ile mezofilik benzerlerinin karşılaştırılmalı çalışmalarıyla tek bir organizma ile tüm işlem basamakların yerine geçebilecek tek bir basamak elde etmektir (**Stetter 1999**).

Termostabil alfa amilazların termostabilite ve aktivite için kalsiyum iyonlarına gerek duymaması mezofilik alfa amilazlardan termofilik amilazları ayıran bir diğer önemli noktadır (**Laderman et al 1993**).

Nişasta endüstrisinin göz önünde bulundurduğu bir diğer önemli nokta aktivitesi için kalsiyum iyonuna gerek duyan alfa amilazların yarattığı problemlerdir. Bunlar kalsiyum oksalat kristallerine dönüşerek prodesteki boruların tıkanmasına sıcaklık değıştiricilerinin

bozulmasına neden olmaktadır. Kalsiyum bağımlı olan alfa amilaz üretimi girişimleri termofillerden protein mühendisliği ile ileri biyoteknolojik teknikler kullanılarak “site-directed mutagenesis” yolu ile yüksek derecede Kalsiyum bağımsız termostabil alfa amilaz elde edilmiştir. Bu enzim ‘Termamyl LC’ olup ticari olarak patentlidir (**Haki ve Raksit 2003**).

*P. woesei*’ den üretilen alfa amilaz 40-130°C arasında aktivite gösterir. *P. furiosus*’ tan üretilen termostabil amilolitik enzim yalnızca kompleks polisakkaritlerin varlığında etkilidir. Bu enzim optimal aktivitesini 100°C’ de göstermektedir. Çok stabil alfa glikosidaz ise çok çeşitli denatüre edici ajanların varlığında (100mM dihidrotreitol ve 1M üre vb.) oldukça dikkat çekici termal stabilite gösterir (**Fujiwara 2002**).

Yapılan girişimlerin araştırmaların çoğunun temelinde endüstrideki bu ihtiyaca cevap verebilmek için farklı kaynaklardan farklı özellikler gösteren termofil ve hipertermofil bakterilerin izole edilip tanımlanması ve stabil enzimlerin ortaya çıkartılması yatmaktadır (**Haki ve Raksit 2003**).

Bunun endüstriyel kullanımlarına *P. Furiosus*’dan elde edilen ‘Pfu’ ve *T. Maritima*’ dan elde edilen ‘UIT ma’ hata düzeltme sırasındaki yüksek yararlılığından dolayı ticari olarak kullanıma sunulmuş termostabil enzimlerdir.

Gelecekte hipertermofillerin ve termofillerin karakterize edilmiş bütün varyeteleri sahip oldukları çok çeşitli özellikleri göz önüne alınarak enzimatik proseslerde enzim kaynağı olarak kullanılacaktır. Bu konu ile ilgili enzim profilleri ve kaynağının karakterizasyonlarının yapıldığı araştırmalar sürmektedir (**Huber ve Stetter 1998**).

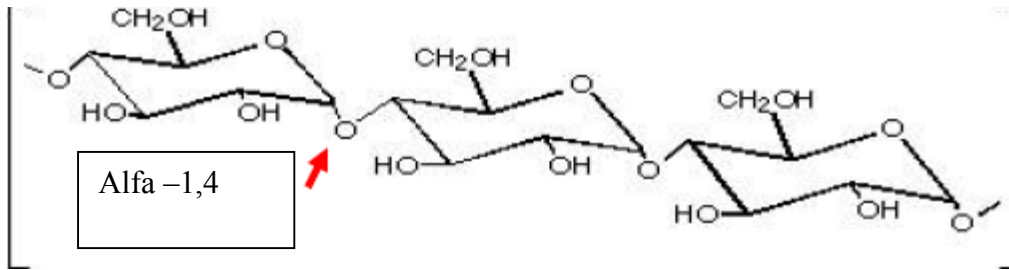
## **1.5. Termostabil Alfa Amilaz Enziminin Endüstrideki Kullanım Alanları**

### **1.5.1. Alfa Amilaz ve Nişasta Endüstrisi**

Nişasta kompleks yapısından dolayı depolarizasyon için uygun kombinasyonlarda enzime gerek duymaktadır. Depolimerizasyon polimerin oligosakkaritlere ve küçük şekerlere glukoz ve mannoz gibi ayrılması işlemidir (**Bertoldo ve Antranikian 2002**).

Niřastadan endüstriyel glukoz üretimi amilolitik enzimlerden oluşan iki aşamalı bir prosestir. Her bir enzimin nişasta üzerindeki etkisi farklıdır. Jelatinizasyondan sonraki ilk aşama olan likitleştirmede konsantre nişasta süspansiyonu'nun %30-40'ı polimerizasyonun farklı derecelerinde çözünebilir dekstrin solüsyonuna çevrilir. İkinci aşama boyunca sakkarifikasyonda dekstrinler glukozu hidroliz olurlar (Leveque *et al* 2000).

Nişasta her yerde bulunan ve kolayca erişilebilen enerji kaynağıdır. Bitki hücrelerinde veya köklerinde nişasta genellikle sitoplazmada büyük granüller halinde depo edilir. Nişasta glukoz ünitelerinin alfa 1-4 veya alfa 1-6 glukozidik bağları ile bağlanmasından oluşan bir glikopolimerdir (Şekil 1.3). Nişastanın iki ağır komponenti vardır. Bunlardan biri Amiloz olup alfa 1-4 bağlarının doğrusal polimerik yapıda bir araya gelmesinden oluşur ve nişasta polimerinin %15-25' ini oluşturur.



**Şekil 1.3** Amilaz molekülünün biyokimyasal yapısı

Nişasta polimerinin bir diğer komponenti ise Amilopektindir. Amilopektinin yapısında alfa 1-4 bağlarını oluşturduğu doğrusal glikopolisakkarit omurgasından her 17-26 üniteye bir alfa 1-6 bağları ile dallanmalar bulunur (Bertoldo ve Antranikian 2002.)

Bazı substratlar yalnızca ekstrem koşullar altında degrede olup enzim tarafından işlenebilir hale gelirler. Buna en iyi örnek nişastadır. Bazı substratlar ise suda çözünmeyenler, organik solventlere gerek duyarlar. Termostabil enzimler bu koşullarda denaturantlara karşı yüksek stabiliteleri olduğu için tercih edilmektedirler (Fujiwara 2002).

Çözünebilir nişasta çözünmeyen nişastaya göre enzim için daha iyi bir substrattır. Bu nedenle nişastanın jelatinizasyonu gerekmektedir. Buda 70°C gibi yüksek bir sıcaklıkta



gerçekleşir. Şimdi ise nişasta endüstrisi 90-100°C' lerde termostabil alfa amilaz kullanarak bu işlemi daha kısa sürede ve daha verimli bir şekilde gerçekleştirebilmektedir.

Alfa amilaz iki kategoriye ayrılır. Hidroliz edecekleri nişastanın miktarına bağlı olarak likitleştirici alfa amilaz %30-%40 ve sakkarifikasyonda kullanılan alfa amilaz %50-%60' ını hidroliz eder.

Termofilik alfa amilaz nişasta likitleştirme de kullanılır ve dekstrinlerin ve dallanmış dekstrinlerin üretiminde ve polimerizasyonun farklı adımlarında kullanılır **(Leveque et al 2000)**.

### **1.5.2. Alfa Amilaz ve Deterjan Endüstrisi**

Termostabil Alfa amilaz enziminden deterjan endüstrisinde de yararlanılmaktadır. İlk endüstriyel enzimin 1925 yılında deterjan uygulamalarında kullanıldığı ortaya çıkmıştır. Bu uygulama ile insanların ufukları açılmış ve kimyasal katalizin yerine enzimatik kataliz uygulaması fikri doğmuştur. Deterjan endüstrisinde ekstrem koşullarda dayanıklılığını aktivitesini koruyan enzimlere gerek duyulmaktadır. Alkali pH, yüksek sıcaklık, surfaktan maddelerin varlığı enzim aktivitesini inhibe eder. Denaturantlara tolere edebilen bu termofilik enzimler bu amaçla deterjan endüstrisinde kullanılır **(Fujiwara 2002)**.

Kimyasal reaksiyonlarda organik solventlerin olduğu durumlarda viskozitenin azalması ve düffüzyon artışı aynı anda yüksek sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Bunun sonucunda reaksiyon oranı yükselir **(Eichler 2001)**.

Alkalin alfa amilazın bileşiminden ağır deterjanlar ve otomatik makine deterjanlarında özellikle Avrupa'da yararlanılır. Deterjanların çalıştığı pH aralığı 8-11'dir. *Bacillus sp.* likitleştirici alfa amilazın çoğu *Bacillus stearothermophilus*, *B. Licheniformis*, *B. Thermoamyloliquefaciense*'den üretilmektedir. Ancak pratik uygulamalar için çok verimli değildir. **(Lo et al 2001)**.

Nişasta içeren lekelerin, kıyafet ve fayanslardaki nişasta lekeleri gibi önemli sorun kaynağı olan kirlerin çıkarılmasında faydalanılır. Nişastanın çözünürlüğü yüksek derecede

sıcaklığa bağlıdır. Buda termostabil alfa amilazın deterjan endüstrisinde kullanımını gerektirir.

Deterjan uygulamalarında pH oldukça alkalidir, çevre çok oksidedir yani enzim surfaktanlara karşı direnmek zorundadır. Metal iyon kelatlayıcı ajanlar ve proteazlar da sıklıkla deterjanlara eklenen diğer faktörlerdir (**Nielsen ve Borchert 2000**).

### **1.5.3. Alfa Amilaz ve Tekstil**

Tekstilde kullanılan iplik dokuma işlemi sırasında eğilebilir. İpliğin daha dayanıklı sağlam olması gerekmektedir. Bunun için çok sıcak nişasta kullanılır. Nişasta ipliği çok dayanıklı sağlam hale getirir. Böylece dokuma sırasındaki uygunsuz koşullar ve stres altında iplik dayanıklılığını korur.

Elbiseler dokuma tezgahından geldikten sonra bitirme operasyonu “finishing proses” denen bir takım işlemlerden geçer. Bu proseslerde kirlerin çıkarılması için de birçok kimyasal kullanılır.

Bunun dışında dokuma operasyonu sırasında kaplamaları, yağlama sırasında kırılmaları ve eğilmeleri önler. Kullanılan geniş ölçekli bu nişasta termostabil alfa amilaz tarafından işlemler tamamlandıktan sonra çıkarılmakta, yani ortadan kaldırılmaktadır.

Tekstil endüstrisinde kullanılan alfa amilazlar yani enzimler surfaktanlarla karışık halde ticari olarak satılabildikleri gibi saf enzim olarakta satılmaktadır. Yüksek sıcaklıklara için tasarlanmış alfa amilazlar olduğu gibi düşük sıcaklıklar için tasarlanmış alfa amilazlarda kullanılmaktadır.

Deri endüstrisinde tabakhanedeki işlemlerde farklı konsantrasyonlarda renklendirme ve koyulaştırma proseslerinde de kullanılmaktadır. Ticari olarak ‘TEXZYME’ vb. markalar adı altında dünya pazarında yerini almıştır.

#### 1.5.4. Alkol Üretimi ve Alfa Amilaz

Alfa amilaz enzimi endüstride alkol üretmek amacı ile kullanılmaktadır. Ham madde olarak alkol üretmek amacı ile kullanılan nişasta içeren maddeler amiloglukozidaz ve alfa amilaz enzimleri ile muamele edilirler. Ortamda bulunan nişasta polimeri yeterince parçalandıktan sonra ortama fermantasyon amacı ile maya aşıl原因arak prosese devam edilir.

Alkol endüstrisinde alkol üretiminde büyük nişasta moleküllerini küçük şekerlere ayırmak amacı ile kullanılır. Bu yıkım iki aşamalı bir işlemdir ve enzimle katalizlenen sakkarifikasyon ve likitleştirme aşamalarından oluşur.

Alkollü içecek olan biranın üretiminde ham madde olarak kullanılan arpadaki nişastanın parçalanması için alfa amilaz enzimi kullanılmakta ve bu sırada fermente edilebilen şekerler açığa çıkmaktadır (**Wiseman 1987**).

Bira üretiminde nötral alfa amilazların kullanımı tercih edilmektedir İçecek alkol ve fel etanol endüstrisinde alkol üretimi sırasında enerjiyi korumak için nişasta düşük sıcaklıklara özel alfa amilaz enzimi kullanılarak likitleştirilir. Burada kullanılan düşük sıcaklıkta stabil alfa amilazlar 'SEB-AMYL-1, SEB -AMYL-BLA' gibi bakteriyel yada fungal kökenlidir. Bunlar ticari olarak pazarda bulunmaktadır. Bunlar jelatinize nişastanın viskozitesini çok hızlı bir şekilde azaltır.

Sakkarifikasyonun başlangıcında 'SEBamyl-GL' likit nişastayı fermente şeker çevirmek için kullanılır. SEB-amyl çok yüksek sıcaklıklarda mükemmel şekilde aktivitesini korur. Damıtma ve sakkarifikasyonu eş zamanlı hale getirir.

#### 1.5.5. Meyve suyu Üretimi ve Alfa Amilaz

Sulandırılmış içeceklerin ve meyve sularının üretiminde nişastanın hidroliz edilmesi gerekmektedir ve bunun için alfa amilaz enzimi kullanılmaktadır (**Bibel et al 1998**).

Meyve suyu endüstrisinde kullanılan alfa amilaz enzimi özellikle armut ve elma sularının üretilmesinde berraklaştırma işleminde kullanılırlar. Meyve suları yapılırken toplanılan meyvelerin tam olgunlaşmamış olanlarındaki nişasta oranı oldukça yüksektir ve bu meyve suyunda bulanıklığa neden olur. Bu sorunun çözümü alfa amilaz enzimi ile mümkündür (**Li et al 2004**).

Glukoz izomeraz enzimi ile glukoz şuruplarında fruktoz düzeyi yüksek şuruplar elde edilir. Bu şuruplar çok tatlı olup meşrubat üretiminde de kullanılır.

### **1.5.6. Ekmek yapımı ve Alfa Amilaz**

Glukoz şurubundan elde edilen yüksek tatlılıktaki fruktoz şurupları ekmekçilikte ve pasta yapımında kullanılmaktadır. Alfa amilaz enzimi ekmek yapımında ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden dolayı ve raf ömrünü iki üç gün daha uzatmasından dolayı yaygın kullanılmaktadır.

## **1.6. Termostabil Alfa Amilaz Enziminin Ham Nişasta İşlenmesi Prosesindeki Rolü**

Bütün nişastanın enzimatik döngüsü üç aşamadan oluşur. Jelatinizasyon aşaması nişasta granüllerinin çözünerek viskoz süspansiyon haline gelmesini sağlar. Likitleştirmede ise bölgesel hidrolizler ile viskozitenin kaybolması sağlanır. Sakkarifikasyon aşamasında ise daha ileri hidroliz ile glukoz maltoz gibi basit monosakkaritler oluşur. (**Haki ve Raksit 2003**). Nişastanın kaynağına göre jelatinizasyon da gerekli optimal sıcaklık değişikliği göstermektedir.

İçten etkili enzimler olan beta amilaz glukoamilaz ve alfa glukoamilaz sonlanmamış bölgelerden substrata atak yaparlar ve maltoz gibi küçük iyi bilinen oligosakkaritlere ayırırlar.

Nişastanın diğer amilazlar için kullanışlı hale gelebilmesinde alfa amilaz anahtar rol oynar. Nişastanın işlenmesi prosesini ekonomik hale getirebilmek için jelatinizasyonunda 100-110°C'de ve likitleştirmede 80-90°C'deki yüksek sıcaklıklarda alfa amilazın aktif

olması arzu edilmektedir. Bu uygulamalar için daha fazla termostabil özellik taşıyan alfa amilazların kaynaklarının bulunması gerekmektedir (**Sidhu et al 1997**).

Alfa amilazlar arasında orijinler farklı kaynaklardan olsa bile homologiler vardır (**Kuruki ve Imanaka 1999**). Bütün termofilik ve archeal kökenli alfa amilazlar monomerik enzimler olup moleküler ağırlıkları 42 ile 68 kD arasında değişir (**Leveque et al 2000**).

Alfa amilaz içten etkili bir enzimdir. Nişastanın rasgele bir tavırla dağınık şekilde alfa1-4 glukozidik bağlarını hidrolize ederek doğrusal oligosakkaritleri ve dallanmış oligosakkaritleri oluştururlar. Bekleme süresince dıştan etkili enzimler nişasta substratının sonlanmamış uçların sonlarından atak yaparlar ve oligosakkaritleri ve monosakkaritleri oluştururlar (**Haki ve Raksit 2003**).

Alfa amilaz hücre dışı bir enzimdir. Hücre dışı enzimler hücre içi enzimlere göre daha yüksek termostabiliteye sahiptir (**Cowan 1997**).

Alfa amilaz ailesindeki enzimlerin katalitik bölgelerindeki rezidüleri alfa durumundaki bağları kırma mekanizmaları tüm üyelerinde kesin bir şekilde korunmuştur, ancak bunları birbirinden ayıran ürünlerinin ve reaksiyon spesifikliğinin çok geniş kapsamlı olmasıdır (**Leemhuis et al 2002**).

Jelatinizasyon nişastanın su ile yüksek sıcaklıklarda ısıtılması ile mümkün olur. Nişasta su ile yalnızca yüksek sıcaklıklarda çözünür bunu hemen takiben prosesin ikinci aşamasına geçilmesi zorundadır ve soğutmak için aradan zaman geçmemelidir. Bu nedenle kullanılan enzimlerin mutlaka yüksek termostabilitesi olması gerekmektedir (**Haki ve Raksit 2003**).

Likitleştirmede nişastanın işlenmesi için çok gerekli ve temel bir tekniktir. Likitleştirme işlemi uygunsuz olarak tamamlanırsa bunun sonucu olarak çeşitli komplikasyonlar ortaya çıkacaktır. Bunlar, bulanıklık, zayıf filtrasyon vb. olup direk olarak ürünün kalitesini ve miktarını etkileyen önemli faktörlerdir. İdeal likitleştirme için en önemli adım bu aşamanın uygun miktarda alfa amilaz içermesidir ve bu aşamadaki

sıcaklığın 105°C sıcaklığa ulaşmasıdır. Bunun için denatüre olmayan termostabil alfa amilaza gerek duyulmaktadır (**Tachibana et al 1996**).

### **1.7. Endüstriyel Uygulamalarda Rekombinant DNA teknolojisi kullanımı**

Alfa amilaz enziminin yüksek fazda üretimi genetik manüplasyonlar ve medya mühendisliği ile başarılmıştır. Enzimin daha fazla miktarda üretilmesi medya manüplasyonları ile de mümkün hale getirilebilmektedir. Belirli çevrede yaşayan mikroorganizmaların hayatta kalma stratejisinin bir parçası metabolizma ürününü dış çevreye boşaltmasıdır (**Tanyıldızı et al 2005**).

Termofiller ve ekstrem termofiller üzerinde yoğunlaşan çalışmalara ile *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis sp. thermus sp.* gibi termostabil alfa amilazları üreten bakterilerin sorunlu bölgenin izolasyonu ve Site Directed Mutagenes, SDS ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak mezofilik taşıyıcılara klonlanması ve üretimin artırılması mümkündür (**Sidhu et al 1997**).

*E. coli*'de rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak ekspresyonu yapılan termostabil enzimler endüstrideki uygulamalar için yarar sağlamaktadır. Ancak bunların enzimatik karakteristikleri ve üç boyutlu yapıları doğal olanlardan farklıdır (**Fujiwara 2002**).

Termostabil rekombinant alfa amilaz enziminin *E.Coli*'de ekspresyonundan sonra %85 den fazla enzim aktivitesi belirlenmiştir (**Linden et al 2000**).

*E.coli* laboratuarda ve endüstride heterelog proteinlerin üretiminde geniş alanda kullanıma sahiptir. Heterelog proteinler *E.coli*'de hücre içi olarak ekspres edilmiştir. Rekombinant proteinin periplasmik boşluğa ekspresyonunun sayısız avantajı vardır. Sayısız heterelog protein *E.coli*'nin periplasmik boşluğunda salgılatılmıştır. Bunlar antibadi fragmentleri, Ribonükleaz A, HIV-1 reseptörleri, İnterleukin-2 vb. heterelog proteinlerdir (**French et al 1996**).

Periplazmik yüzeyde rekombinant proteinlerin üretilmesi ile stoplazmik proteinler ile kontamine olmuş rekombinant protein oranı çok azdır ve buda sonradan yapılması gereken purifikasyon işlemini çok kolay hale getirir (**Demirkan et al 2005**).

*Bacillus* 'un mutant suşları alfa amilaz üretiminde daha yeteneklidir. *Bacillus sp* türlerinin mutant suşları mutagenez yolu ile gözlemlenir ve elde edilir (**Ikram-ul-Haq et al 2005**).

Alfa amilaz geni farklı *Bacillus sp* türlerinden izole edilerek *E.coli*'de çok fazla miktarda ürün elde etmek için ekspres ettirilmiştir. *E.coli* tarafından çok az sayıda yabancı gen ürününün de büyüme medyumuna salındığı tespit edilmiştir. Buda saf üretim için bir avantajdır (**Demirkan et al 2005**).

Nişasta endüstrisinin göz önünde bulundurduğu bir diğer önemli nokta aktivitesi için kalsiyum iyonuna gerek duyan alfa amilazların yarattığı problemlerdir. Bunlar kalsiyum oksalat kristallerine dönüşerek prosesteki boruların tıkanmasına sıcaklık değiştiricilerin bozulmasına neden olmaktadır.

Kalsiyum bağımlı olan alfa amilaz üretimi girişimleri termofillerden protein mühendisliği ile ileri biyoteknolojik teknikler kullanılarak yüksek derecede kalsiyum bağımsız termostabil alfa amilaz elde edilmiştir. Bu enzim 'Termamyl LC' olup ticari olarak patentlidir (**Haki ve Raksit 2003**).

Genetik mühendisliği her ne kadar " Talior-made" enzimlerin yapımına olanak tanısa da aminoasit kompozisyonlarını değiştirerek, termostabil enzimler hala deneme aşamasındadır. Bunun nedeni halen protein termostabilite sınırlarının moleküler mekanizmasının tam olarak anlaşılınmamış olmasıdır. Ekstrem termofiller ve termofiller talior-made enzim tasarımında iyi bir modeldir (**Andrade et al 1999**).

## 1.8. Ticari Olarak Satılan Amilazlar ve Kaynakları

Ticari olarak kullanıma sunulan bakteriyel kaynaklı alfa amilazlar mikroorganizmalar kaynak alınarak üretilmiştir (Çizelge 1.1).

*Bacillus licheniformis*

*Bacillus subtilis*

*Bacillus stearothermophilus*

*Bacillus polymxa*

*Bacillus mesentericus*

*Bacillus macerns*

*Bacillus vulgaris*

*Bacillus megaterium*

*Pyrococcus woesei*

*Pyrococcus furiosus*

*Pyrococcus sp. KOD1*

*Thermomonospora fusca*

*Thermococcus profundus*

*Thermotoga maritima*

*Aspergillus niger*

*Aspergillus oryzae*

*Dictioglomus thermophilum*



**Çizelge 1. 1. Ticari olarak pazarda yer alan amilazlar**

<b>ADI</b>	<b>KULLANIM AMACI</b>
<b>AMG(Amyloglucosidase Novo)</b>	Dekstrinleri glukoza çevirir.
<b>BAN (Bakteriyel Amylase Novo)</b>	İki adımlı likitleştirmede da nişastayı dekstrine çevirir.
<b>DEXTRANASE</b>	Ham şekerli sudaki dextranları parçalar.
<b>FİNİZYM</b>	Tahıl nişastasını hidroliz ederek filtrelenebilirliğini artırır.
<b>FRUCTOZYME-L</b>	İnulini fruktoza hidroliz eder.
<b>FUNGAMYL</b>	Fungal alfa amilaz olup yüksek maltozlu dekstrin şurubu yapar ekmek yapımı ve ham nişastanın işlenmesinde kullanılır.
<b>TERMAMYL,Type LS</b>	Geliştirilmiş termosatbil tek adımlı likitleştirme işlemi için kullanılır.
<b>TERMAMYL</b>	Tek adımlı Likitleştirme için nişastanın dekstrine dönmesini sağlayan termostabil alfa amilazdır.
<b>TRORUZYME</b>	Termostabil CGT ase dir.
<b>MALTOGENASE</b>	Özel glukoz şurupları ve yüksek maltoz içeren şurupların yapımında kullanılır.
<b>AQUAZYME 240 L</b>	Kağıt yapımında nişastanın düşük saklıklarda modifikasyonu için kullanılır.
<b>FUNGAMYL-800 L</b>	Kağıt yapımında nişastanın düşük saklıklarda modifikasyonu için kullanılır.
<b>THERMOZYME</b>	Tekstil endüstrisinde haşılama işleminde kullanılır.
<b>FUNGAMYL SUPER</b>	FUNGAMYL in geliştirilmiş şeklidir.
<b>NOVAMYL</b>	Ekmek yapımında kullanılan eşsiz bakteriyel maltogenik amilazdır.
<b>FUNGAMYL 800</b>	Alkolyapımında fermantasyon zamanını kısaltmak için kullanılır.
<b>LIQUOZYME</b>	Yüksek ısıda gerçekleşen likitleştirme işleminde alkol yapımında kullanılır.
<b>DURAMYL</b>	Protein mühendisliği ile geliştirilmiştir Termamyl varyantıdır. Çok yüksek ısılara dayanıklı olup ham nişasta işlenmesi prosesinde kullanılır.

Kaynaklar: <http://www.freepatentsonline.com>  
<http://www.delphion.com>  
<http://www.inventions-patents.net>

## BÖLÜM II

### MATERYAL ve YÖNTEM

#### 2.1 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus sp.* türlerinin izolasyonu ve tanımlanması

##### 2.1.1 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus sp.* türlerinin izolasyonu

Balıkesir ili civarındaki, sıcaklıkları 55-90°C arasında değişen sıcak su kaynaklarından alınan (Bigadiç-Hisarköy, Susurluk-Kepekler, Sındırgı-Hisaralan, Balya Ilıcaları, Edremit-Güre kaplıcaları) su örneklerinden *Bacillus sp.* türleri izole edilmiştir. Alınan su numunelerinden, karbon kaynağı olarak %1'lik nişasta'nın kullanıldığı M9 besi yerine ekim yapılmıştır. M9 besi yerinde 65°C'de 200 rpm'de 72 saat geliştirilmeye bırakılan kültürler daha sonra NAS katı besi yerine saflaştırılmak amacıyla sürme şeklinde ekilmiş ve 48 saatlik inkübasyon neticesinde NAS katı besi yerinde gelişen farklı koloniler tek çekilerek NBS sıvı besi yerinde 65°C'de 200 rpm'de 72 saat geliştirilmiştir. NBS besi yerinde gelişen kültürlerden NAS katı besi yerine seri çizgi ekimler yapılmak suretiyle koloniler saflaştırılmıştır (Laderman *et al* 1993; Bolton *et al* 1997).

##### 2.1.1.1 Bakteriyel kültürler ve besi ortamları

Balıkesir civarı sıcak su kaynaklarından toplanmış olan su örneklerinden *Bacillus sp.* türlerinin izolasyonları için içerikleri EK 1'de verilen M9 Nişasta, NAS ve NBS besi yerleri kullanılmıştır

Transformasyon çalışması için konukçu olarak kullanılan *Escherichia coli* DH $\alpha$  suşunun üremesi için içeriği EK 1'de verilen LB (Luria-Bertani) besi yeri kullanılmıştır. Transformantların üremesi için ise aynı besi ortamı ile hazırlanan katı besi yerine ampisillin ve nişasta eklenerek uygun ortam sağlanmıştır.

### **2.1.1.2 Kültür ortamları**

Çalışmada kullanılan kültür ortamları ve hazırlanışları **EK 1**'de verilmiştir

### **2.1.1.3 Tampon ve solüsyonlar**

Çalışmada kullanılan tampon ve solüsyonların hazırlanışı **EK 2**'de verilmiştir

### **2.1.1.4 DNA Markırları**

Çalışma boyunca kullanılan DNA Markırları **EK 3**'de verilmiştir

### **2.1.1.5 Kimyasal Maddeler**

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları **EK 4**'de verilmiştir

### **2.1.1.6 Pilazmidler**

Ampisillin (Amp) ve Tetrasiklin (Tet) direnç genleri ile beraber kendi replikasyon orijinine sahip olan *Escherichia coli* pBR322 pilazmidi *Bacillus* sp. OZ1 suşundaki alfa-amilaz geninin klonlanmasında vektör olarak kullanılacaktır. pBR322 vektörünün haritası **EK 5**'de verilmiştir

### **2.1.1.7 Solüsyon ve materyallerin sterilizasyonu**

Çalışma süresince kullanılan tüm cam malzemelerin sterilizasyonu için pastör fırını kullanılmıştır (160°C de 2 saat). Solüsyon ve mikrobiyal besi ortamlarının sterilizasyonu ise otoklav'da yapılmıştır (121°C de 15 dak).

### **2.1.1.8 Bakteriyel kültürlerin saklanması**

NBS sıvı besi yerinde geliştirilen kültürlerden 22. saatte 1 ml alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüplerinde 10.000 rpm'de 75 sn santrifuj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Bu işlem üç sefer tekrarlanmıştır. Pellet 1ml dH<sub>2</sub>O ile 10.000 rpm'de 75 sn santrifuj edilerek

yıkanmış ve süpernatant atılmıştır. Pellete 1 ml %50'lik Gliserol ilave edilerek elde edilen stok kültür -20°C'de saklanmıştır (**Malhotra et al 2000**).

## **2.1.2 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus* sp. türlerinin tanımlanması**

### **2.1.2.1 Glukoz testi**

Karbon kaynağı olarak %1'lik Glukoz (basit seker) ilave edilerek hazırlanmış olan 5ml NB sıvı besi yerine Bromtimol mavisi eklenerek boyalı besi yeri hazırlanmıştır. Uygun besi yerinde (NBS) aktifleştirmiş olduğumuz kültürler 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktararak 13.000 rpm'de 60 sn santrifuj edilerek supernatant atılmıştır. Elde edilen pellet'e 1ml dH<sub>2</sub>O eklenerek 13.000 rpm'de 60sn santrifuj edilerek tekrar yıkanmış ve elde edilen supernatant atılmıştır. 200µl boyalı besi yeri ile toplanmış olan pellet daha sonra hazırlanmış olan bu 5 ml'lik besi yerine inoküle edilmiş ve bir gece uygun sıcaklıkta (65°C) inkübe edilerek renk değişimi gözlenmiştir (**William et al 2001**) (**EK-2A**).

### **2.1.2.2 Katalaz testi**

NAS katı besi yerinde gelişen saf kolonilerin üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak gaz çıkışı gözlenmiştir. Gaz çıkışı, bakterilerin hidrojen peroksidazı kullandığını gösteren pozitif bir sonuçtur (**William et al 2001**) (**EK-2A**).

### **2.1.2.3 Metilen mavisi ile boyama**

Lamel üzerine 10µl saf su damlatılır bakteri kültürü homojenize edilmiş ve lamel havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Lamelin üzerine Metilen mavisi damlatılarak 3-5 dakika bekletilmiş ve akabinde saf su ile yıkanmıştır. Hava akımı ile kurutulan lamellerin üzerine immersiyon yağı damlatılarak bakterilerin morfolojileri ışık mikroskobunda gözlenmiştir (**William et al 2001**) (**EK-2A**)

### **2.1.2.4 Gram boyama**

İncelenecek materyal steril şartlarda alınarak temiz bir lam üzerine homojen bir şekilde yayılmış ve hava akımı ile kurutulmuştur. Alevden geçirilerek fikse edilen lam

Kristal violet boyası ile 1 dakika muamele edilmiş, daha sonra lugol solüsyonu damlatılarak 1-2 dakika beklenmiştir. Su ile yıkanarak etanol ile 30 saniye dekolorize edilmiş ve üzerine sulu Bazik Fuksin damlatılarak 30 sn bekletilmiştir. Su ile tekrar yıkanan ve hava akımı yardımı ile kurutulan lamellerin üzerine immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunda gözlenmiştir (**William et al 2001**) (**EK-2A**).

#### **2.1.2.5 Koloni morfolojisi**

Besin azaldığında ya da agar konsantrasyonu düştüğünde *Bacillus* sp. türlerinin koloni morfolojisi (Diffusion limited aggregation model) DLA modeli şeklinde kolonizasyon göstermektedir (**Lacasta et al 1999**).

#### **2.1.2.6 Spor boyama**

*Bacillus* cinslerine ait türlerin oluşturduğu sporların etrafındaki duvar oldukça kalın olduğu için Malaşit yeşili ile boyama yapılmıştır (**William et al 2001, Çökmüş et al 1995**) (**EK 2A**).

#### **2.1.2.7 İyodin testi ile amilolitik aktivitenin tayini**

Çizgi ekimleri yapılan *Bacillus* sp. OZ1 suşu 65°C de, rekombinant *E.coli* DH $\alpha$  suşu ise 35 C° de 1 gece geliştirilmiştir. Petrilerde geliştirilen bakteri kolonilerinin tüm yüzeyine hazırlanmış olan iyot solüsyonundan yayılmış (**EK 2A**) ve oda sıcaklığında 1 gece inkübe edilmiştir.

#### **2.1.2.8 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus* sp. OZ1 suşunun ürettiği enzim aktivitesinin DNS yöntemi ile belirlenmesi**

Gelişimlerinin beşinci saatinde *Bacillus* OZ1 ve *E.coli* DH $\alpha$  suşlarından 50 ml alınarak 10.000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant kaba enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır (**EK 2B**). Kaba enzim çözeltisi ve 0,1 M NaK tamponu ile hazırlanmış % 1'lik nişasta içeren kaba substrat çözeltisi 1.5/2.5 ml oranında karıştırılmış ve 60°C'de hazırlanmış olan su banyosuna bırakılmıştır. Karışımdan 30 dakika içerisinde değişik zamanlarda ve 3, 4, 5, 6, 7, ve 8. saatlerde 4 ml alınarak içerisinde 1 ml DNS olan

tüplere konulmuş ve spektrofotometrede 540 nm'de OD ölçümü yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ile serbestleşen glikoz miktarı esasına dayanarak enzimin aktivite ünitesi hesaplanmıştır. Bir enzim ünitesi reaksiyon koşulları altında bir dakikada 1 mikromol glukoz eşdeğeri serbestleştiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Başlangıç reaksiyon oranını hesaplamak amacı ile *Bacillus OZ1* ve *E.coli DHα* suşlarından 5 saatlik gelişim sonrasında yine aynı yöntemler kullanılarak enzim izole edilmiş ve 0 ila 30 dakikalar arasında 3'er dakikalık aralıklar ile örnekler alınmış, DNS ile reaksiyona sokularak spektrofotometrede 540 nm'de OD ölçümü yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ile serbestleşen glikoz miktarı esasına dayanarak enzimin aktivite ünitesi hesaplanmıştır.

Spektrofotometreyi sıfırlamak amacı ile 2.5 ml substrat ve enzim yerine 1.5 ml tampon 1ml DNS içeren tüpte karıştırılmıştır.

Kör olarak moleküler ağırlığı 180,2 olan Glukoz kullanılmış ve eğimi hesaplanmıştır. Glukoz 0, 50, 100, 150, 200 ve 250 gr hazırlanarak 4 ml 0,1 M NaK tamponu içerisinde ayrı ayrı tüplerde çözülmüştür. Karışım 1ml DNS bulunan tüplere aktarılmış ve 540 nm'de OD ölçümü yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ile eğim hesaplanmış ve bulunan bu değer hesaplamalarda kullanılmıştır.

Aktivite ünitesi hesabı :

$$\frac{\text{Reaksiyon eğimi (OD/dk)}}{\text{Standart glukoz eğimi (OD/dk)}} \times \frac{\text{Reaksiyon hacmi (ml)}}{\text{Enzim hacmi (ml)}} \times \frac{1\mu\text{M}}{\text{Glukoz MA}} = \text{EU} \quad (\mu\text{M}/\text{min.ml})$$

## 2.2 Termostabil *Bacillus* sp. OZ1 suşunda alfa-amilaz üretiminin genetik yönü

### 2.2.1 Alfa-amilaz üretiminden sorumlu olan gen bölgesinin yerleşimi

#### 2.2.1.1 *Bacillus* sp. OZ1 suşunda alfa-amilaz üretiminden sorumlu olan kromozomal DNA'nın izolasyonu

*Bacillus* sp. OZ1 suşundan kromozomal DNA izolasyonu için Ausubel 1994 yöntemi (Ausubel *et al* 1994) bir kaç modifikasyon yapılarak uygulanmıştır. Kromozomal DNA izolasyonu için geç logaritmik fazdaki kültür kullanılmıştır. Alınan 1.5 ml'lik kültür, 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve pellet soğutulmuş TES tamponu ile resüspanse edilmiştir. Gram (+) *Bacillus* sp türlerinin hücre duvarı 10µl Lizozim ile enzimatik olarak 65°C'de 10 dakika inkübe edilmek suretiyle parçalanmıştır. Hücre zarı 30µl %10'luk SDS ile eritilmiştir. Açığa çıkan hücre proteinleri 3µl Proteinaz K enzimi ile 55°C'de 10 dakika bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Nükleik asitlerin proteinlerden ve diğer makro moleküllerden ayrılması amacıyla eşit hacimde Fenol ilave edilmiş ve 45°C lik su banyosunda çalkalanmış ve akabinde 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 10 dakika 12.000 rpm'de +4°C'de santrifuj edilerek üst faz alınmıştır (EK 2C).

Hacmin iki katı kadar % 95'lik Etanol ilave edilerek buzda 10 dakika bekletilmiştir. Santrifüje tekrarlanmı, etanol pelletten uzaklaştırılmı ve 4µl RNase ilave edilerek 30 dak 45°C'deki su banyosunda yarım saat bekletilerek RNA molekülleri degrades edilmiştir. Bu işlemi takiben tekrar 3µl Proteinaz K enzimi ile 15 dakika 45°C'deki su banyosunda muamele edilmiştir. Örneğe eşit hacimde Fenol-Kloroform ilave edilerek 15 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. 10 dakika 12.000 rpm'de +4°C'de santrifuj edilerek üst faz yeni tüpe alınmıştır. Eşit hacimde Kloroform-İzomil alkol ilave edilerek santrifuj işlemi tekrarlanmıştır. Üst faz yeni bir tüpe alınarak üzerine 1/10 hacim 5M NaCl ve hacmin iki katı kadar etanol eklenerek bir gece -20°C'de bekletilmiştir (EK 2C).

İkinci gün 15 dakika 12.000 rpm'de +4°C'de santrifuj edilerek DNA presipite edilmiştir. % 95'lik Etanol ilave edilerek 5 dakika 12.000 rpm'de +4°C'de santrifuj edilerek DNA çöktürülmüştür. Bunun amacı nükleik asitlerden tuz rezidülerinin tamamının ayrılmasını sağlamaktır. Etanol pelletten tamamen uzaklaştırıldıktan sonra elde edilmiş olan kromozomal DNA daha ileri manipülasyonlarda kullanılmak üzere TE tamponu içerisinde +4°C'de saklanmıştır.

### **2.2.1.2 Kromozomal DNA üzerinden alfa-amilaz geninin PCR reaksiyonu ile amplifikasyonu**

OZ1'e ait kromozomal DNA üzerinde alfa amilaz üretiminden sorumlu olan ve büyüklüğü *Bacillus* sp'ler arasında 1,5 -1,9 kb arasında değişiklik gösteren *Amy E* gen bölgesi (**EK 6**) uygun primerler yardımı ile PCR'da (polimeraz zincir reaksiyonu) çoğaltılmıştır (**Maniatis et al 1982, Sumitani et al 1998, Worthington et al 2003**).

#### **Kullanılan primerler:**

Reverse ( 5'-CCA ACA AAA CCC GCT CCG ATT A-3' )

Forward (5'- ATG TTT GCA AAA CGA TTC AAA A -3' )

#### **PCR protokolü (EK-2D):**

95°C 3 dakika	1 siklus
95°C 30 sn	
55°C 1 dakika	30 siklus
68°C 3 dakika	
68°C 10 dakika	1 siklus



### 2.2.1.3 Agaroz jel elektroforez

5 µl'lik 6X izleme boyası (0.07% bromtimol mavi, 7% SDS, 33% gliserol) solüsyonuna TE buffer içerisinde çözülmüş DNA dan 10 µl eklenmek suretiyle DNA numuneleri hazırlanmıştır. Numuneler 0.8% lik TBE (Tris Borate buffer) ile hazırlanmış ve 0.5 µg/ml EtBr içeren agaroz jelde 5V/cm olacak şekilde ortalama 3-5 saat süresince yürütülmüştür (**Maniatis et al 1982**) (**EK 2E**). Elde edilen bantlar KODAK Jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

### 2.2.1.4 PCR ürününün agaroz jelden eldesi ve saflaştırılması

Oluşan PCR ürünü '**düşük kaynama sıcaklığı noktası yardımı ile DNA'nın jelden alınması**' yöntemine uygun olarak alınıp saflaştırılmıştır (**William et al 2001**). Bu yöntemde istenilen DNA fragmentini içeren bölge bisturi yardımı ile agaroz jelden kesilerek alınmış ve istenilen fragmenti içeren jel parçası 65°C'deki su banyosunda 5 dakika süre bekletilerek tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Toplam hacim belirlenerek üzerine 2.5 katı kadar 20 mM Tris pH:8 ve 1mM EDTA karışımı ilave edilerek 65°C'de 2 dakika süre ile bekletilmiş ve toplam hacim kadar fenol ilave edilerek iki dakika süre ile karıştırılmıştır. 10 dakika 14.000 rpm de santrifuj edilerek üst faz yeni tüpe alınmıştır. Bu işlemi takiben fenol-kloroform (1:1) karışımı ile tekrar 10 dakika 14.000 rpm' de santrifuj edilerek üst faz yeni tüpe alınmıştır. Eşit hacimde kloroform ilave edilerek 10 dakika 14.000 rpm de santrifuj edilerek DNA çöktürülmüş, üst faz atılmış ve pellet 1/10 hacim 3M Sodyum Asetat ve iki hacim etanol karışımı ile çözülmüştür. %70'lik Etanol ile 10 dakika 14.000 rpm de santrifuj edilerek yıkandıktan sonra pellet kurutularak etanol tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha ileriki çalışmalarda kullanılması için pellet TE tamponunda çözümlenerek +4°C'de saklanmıştır (**EK 2F**).

### 2.2.1.5 PCR gen ürününün HindIII ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesimi

Saflaştırılan DNA fragmentinin HindIII ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesilebilmesi için reaksiyon karışımı (16 µl dH<sub>2</sub>O, 2 µl 10X restriksiyon tamponu, 0.5 µl 100X Bovine Serum Albumin (BSA), 2µl PCR ürünü olan DNA) hazırlanmıştır. Karışıma 0.5µl HindIII ve 0.5µl PvuII ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır ve 37°C'de 3 saat su

banyosunda inkübe edilmiştir. Reaksiyon, final konsantrasyonu 0.25M olan NaCl'den 20µl ve hacmin iki katı kadar etanol ilave edilmesi neticesinde durdurulmuş ve bir gece -20°C'de bekletilmiştir. İkinci gün 15 dakika 14.000 rpm'de +4°C'de santrifuj edilerek DNA presipite edilmiştir. % 95'lik Etanol ilave edilerek 5 dakika 12.000 rpm'de +4°C'de santrifuj edilerek DNA çöktürülmüştür. Tüpler oda sıcaklığında ağızları açık bırakılarak etanolün tamamen uçması için bekletilmiş ve elde edilen pellet, daha ileri manipülasyonlarda kullanılmak üzere TE tamponu içerisinde +4°C'de saklanmıştır (**Sumitani et al 1998**) (**EK 2G**).

## 2.2.2 Vektör pBR322 üzerinde yapılan genetik manipülasyonlar

pBR322, 4363 bp büyüklüğünde ve üzerinde bir çok endonükleaz enziminin kesim noktaları olan halkasal yapıda bir vektör'dür (**EK 5**). Bu vektör üzerinde Ampisillin ve Tetrasiklin direnç geni bulunmaktadır. Bu genler yardımı ile rekombinant pilazmidin seçilmesi hedeflenmektedir. Yaptığımız çalışmada 4363 bp büyüklüğündeki pBR322 vektörü *HindIII* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve 2066 bp ve 2297 bp büyüklüğünde iki fragment elde edilmiştir. 2297 bp büyüklüğünde olan ve vektörün replikasyon orijini OriC ve Ampisillin direnç genini taşıyan bu fragment çalışmanın daha ileriki aşamalarında kullanılmıştır (**Balbas et al 1986**).

### 2.2.2.1 pBR322 vektörünün *HindIII* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesimi

Çalışmamızda, pBR322 pilazmidini  $\alpha$ -amilaz gen bölgesini taşımak üzere vektör olarak kullanılmıştır. *HindIII* ve *PvuII* ile kesilen pBR322 klonlama vektörüne OZ1'in kromozomal DNA'sında yer alan ve uygun primerlerin kullanımı ile PCR'da çoğaltılan ve yine aynı restriksiyon enzimleri ile kesilen  $\alpha$ -amilaz gen bölgesi takılmıştır (**Maniatis et al 1982**).

pBR322 vektör pilazmidinin uygun restriksiyon enzimleri ile kesilebilmesi için reaksiyon karışımı (16 µl dH<sub>2</sub>O, 2 µl 10X restriksiyon tamponu, 0.5µl 100X BSA, 2µl pBR322 vektör DNA karıştırılır) hazırlanmıştır. Karışıma 0.5µl *HindIII* ve 0.5µl *PvuII* ilave edilerek reaksiyon başlatılmış ve 37°C'de 3 saat su banyosunda inkübe edilmiştir.

Reaksiyon, final konsantrasyonu 0.25M olan NaCl'den 20µl ve hacmin iki katı kadar etanol ilave edilmesi neticesinde durdurulmuş ve bir gece -20 C°'de bekletilmiştir. İkinci gün, 15 dakika 14.000 rpm'de +4°C'de santrifuj edilerek DNA presipite edilmiş ve %95'lik etanol ilave edilerek 5 dakika 12.000 rpm'de +4C°'de santrifuj edilmek suretiyle DNA çöktürülmüştür. Bunun amacı nükleik asitlerden tuz rezidülerinin tamamının ayrılmasını sağlamaktır. Tüpler oda sıcaklığında ağızları açık bırakılarak etanol'ün tamamen uçması için bekletilmiş ve elde edilen pellet, daha ileri manipülasyonlarda kullanılmak üzere TE tamponu içerisinde +4°C'de saklanmıştır (**Maniatis et al 1982**) (**EK 2H**).

#### **2.2.2.2 pBR322 restriksiyon enzim fragmentlarının agaroz jelden eldesi ve saflaştırılması**

pBR322 restriksiyon enzim fragmentlarından (2066 bp ve 2297 bp); 2297 bp büyüklüğünde olan ve vektörün replikasyon orijini (OriC) ve Ampisillin direnç genini taşıyan fragment '**düşük kaynama sıcaklığı noktası yardımı ile DNA'nın jelden alınması**' yöntemine uygun olarak jelden alınıp saflaştırılmıştır (**William et al 2001**).

#### **2.2.3 Rekombinant DNA molekülünün (pOZ322) oluşturulması (Ligasyon)**

OZ1 kromozomal DNA'sı üzerinde yer alan ve alfa amilaz genini taşıyan *Amy E* gen bölgesi uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu DNA fragmenti *HindIII* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen *Amy E* gen bölgesinin ligasyonu yine aynı enzimlerle kesilmiş olan PBR322 vektörüne yapılmıştır (**Maniatis et al 1982, Dong et al 1997**).

Ligasyon için enzimlerle kesilmiş PCR ürününden 5µl, enzimlerle kesilmiş pBR322'den (~2.3kbp) 7µl, 5 mM ATP 1µl, 10X ligasyon tamponu 10µl, dH<sub>2</sub>O 10µl, T4 DNA ligaz 2µl olmak üzere soğutulmuş steril ependorf tüplerinde ligasyon karışımı hazırlanmıştır (**EK 2I**). Ligasyon için uygun koşullar 16°C'de 24 saat boyunca sağlanmış ve elde edilen rekombinant pilazmid "**pOZ322**" olarak isimlendirilmiştir.

#### 2.2.4 Konukçu *E. coli*'nin alıcı hücre haline getirilmesi

Çalışmaya başlamadan 48 saat önce *E. coli* DH $\alpha$  suşu Luria Bertani agarlı besi yerine ekilerek 37°C'de geliştirilmiştir. Gelişen koloniler Luria Bertani sıvı besi yerine aktarılarak yine 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bir gece bekletilen kültürlerden 1ml alınarak yeni hazırlanmış 100 ml LB sıvı besi yerine inoküle edilmiş ve 600 nm'de OD=0.4 olana kadar yaklaşık 2-3 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır (**Maniatis et al 1982, Inoue et al 1990**).

LB sıvı besi yerinde gelişen kültürler 50 ml'lik falkon tüplerine alınarak buzda 20 dakika süre ile bekletilmiş, +4°C'de 3.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonraki aşamalarda hücrelerin sürekli soğuk kalmasına dikkat edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra hücreler 6 ml soğutulmuş 0.1M CaCl<sub>2</sub> ile karıştırmış ve 30 dakika süresince buzda bekletildikten sonra +4°C'de 3.000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra hücreler 1.6 ml soğutulmuş %15'lik gliserol içeren 0.1M CaCl<sub>2</sub> ile süspanse edilmiş ve soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 140µl olacak şekilde dağıtılmış (**EK 2J**) ve *E. coli* DH $\alpha$  suşu artık rekombinant DNA molekülünün aktarımı için alıcı hale getirilmiştir (**Frank 1997**).

#### 2.2.5 pOZ322 rekombinant DNA'nın alıcı *E. coli* DH $\alpha$ hücrelerine transformasyonu

Önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüpüne CaCl<sub>2</sub> ile alıcı hale getirilmiş *E.coli* DH $\alpha$  suşundan 100µl ve rekombinant DNA molekülü "**pOZ322**" den 25µl koyarak karışım 30 dakika buzda bekletilmiştir. Buzdan alınan örnekler 37°C'de su banyosuna alınarak 1 dakika sıcaklık şoku uygulanarak hücre yüzeyinde oluşan porların açılması sağlanmıştır. Karışıma, önceden hazırlanmış ve 37°C'de bekletilmiş Luria Bertani (LB) sıvı besi yeri eklenerek 37°C'de 1 saat üretilmiştir (**Maniatis et al 1982, Frank 1997**).

Rekombinant DNA molekülünü içeren bakteri kolonilerinin seçilmesi için %1'lik nişasta ve 50 µg/ml ampicillin içeren LB agarlı katı besi yerine transformasyonu gerçekleştirilen kültürden 200 µl dragaski yardımı ile yayılmıştır. Kontrol olarak nişasta içeren ancak ampicillin içermeyen LB katı besi yeri kullanılmıştır.

Bu arada, rekombinant DNA molekülünü içermeyen reaksiyon karışımı da aynı koşullarda hazırlanarak bu karışım ampisillin ve %1'lik nişasta içeren katı LB besi yerine ekilmiş ve petriyer 6 gün süre ile 37°C gelişmeye bırakılmıştır (**Frank 1997**).

### **2.2.6 Rekombinant DNA molekülünü taşıyan *E. coli* DH $\alpha$ suşundan pilazmid DNA izolasyonu**

Ampisillin ve nişasta içeren LB besi yerinde 18 saat üremeye bırakılan kültürlerden yine aynı sıvı besi yerine %10'luk (5ml=500  $\mu$ l) inokülasyon yapılmış ve uygun koşullarda (37°C) 3-3.5 saat inkübe edilerek 10.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre çökeltisi hava akımı ile kurutulduktan sonra hücreler 379 $\mu$ l sakkaroz tamponunda çözülerek 37°C'de 5 dakika bekletilmiştir. 96.5 $\mu$ l lizozim çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 5 dakika beklemeye bırakılmıştır. 48.2 $\mu$ l Tris EDTA uygulamasından sonra %20 SDS çözeltisinden 27.6 $\mu$ l eklenerek 37°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Yüksek rpm de 30 sn santrifuj edildikten sonra yeni hazırlanmış 3N NaOH çözeltisinden 27.6 $\mu$ l ilave edilmek suretiyle tüpler yatay zeminde 10 dakika süreyle ters düz edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 49.6 $\mu$ l 2M Tris HCl eklenmiş ve düz zeminde 3 dakika süreyle karıştırılmıştır. +4°C'de tutulan 5M NaCl çözeltisinden 71.7 $\mu$ l ve %3 NaCl ile doyurulmuş Fenol çözeltisinden 700  $\mu$ l ilave edildikten sonra tüpler +4°C'de 15.000 rpm'de 20 dakika santrifuj edilmiş ve üst faz dikkatlice başka bir tüpe alındıktan sonra üzerine 700  $\mu$ l kloroform/izoamilalkol eklenmiştir. Tekrar +4°C'de 15.000 rpm'de 20 dakika santrifuj edilerek alınan üst faza eş hacimde izopropanol eklenmiş (**EK 2K**) ve ekstraktlar bir gece -20°C'de bekletilmiştir (**O'Sullivan ve Klaenhammer 1993**).

İkinci gün tüpler +4°C'de 15.000 rpm'de 20 dakika santrifuj edilmiş, DNA çökeltisi oda sıcaklığında kapak açık bırakılarak hava akımı ile kurutulmuş ve üzerine 20 $\mu$ l Tris-EDTA çözeltisi eklenerek pellet çözülmüştür.

Elektroforez uygulamasından önce 2 $\mu$ l RNase eklenerek 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiş ve % 0.7' lik agaroz jel kullanılarak 90 V'da 3-3.5 saat yürütülen bantlar daha sonra KODAK jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

### 2.2.7 DNA fragmentlerinin ve pilazmidlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması

Moleküler ağırlık hesaplamasında, cccDNA ve Lamda DNA marker'larının elektroforetik hareketleri ile büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır. Kullanılan markerlerden  $\lambda$  DNA ve ccc DNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarılmıştır. İstatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek Agaroz jeldeki fragmentlerin büyüklükleri saptanmıştır. (Raghava 2001, Elder ve Southern 1983). Bunlar dikkate alınarak hazırlanan FORTRAN'ın bir programı olan Turbo Pascal programına uygun olarak MSDOS formatında hazırlanmış 'Program GEL Version 2/18/89 JRT' ile bilinmeyen fragmentlerin tahmini büyüklükleri hesaplanmıştır.

## BÖLÜM III

### BULGULAR

#### 3.1 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus* sp. türlerinin izolasyonu ve tanımlanması

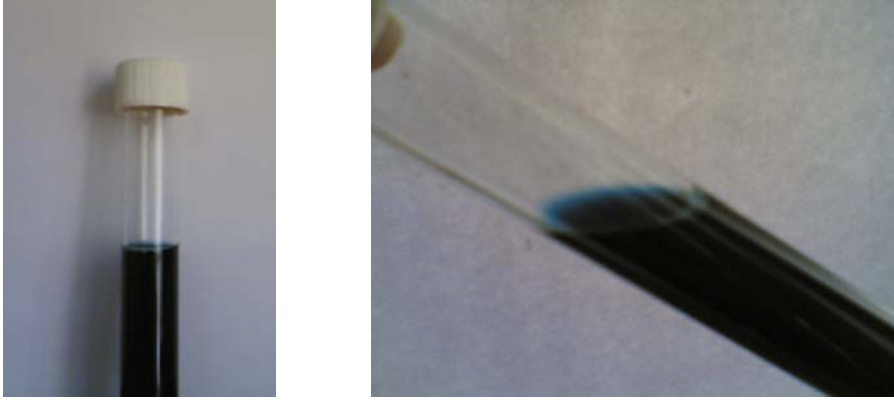
##### 3.1.1 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus* sp. türlerinin izolasyonu

Balıkesir ili civarında, sıcaklıkları 55-90°C arasında değişen farklı sıcak su kaynaklarından toplanan su örnekleri laboratuvar ortamına getirildikten sonra *Bacillus* sp. türlerinin izole edilmesi için %1'lik nişasta içeren M9 besi yerine ekimleri yapılmıştır (yayma ekim). M9 katı besi yerinde 65°C'de 200 rpm'de 72 saat geliştirilen kültürler M9 sıvı besi yerine alınarak aynı koşullarda tekrar üretilmiş ve akabinde NAS katı besi yerine yayma şeklinde ekimleri yapılmıştır. NAS katı besi yerinde 65°C'de 200 rpm'de 48 saat gelişen farklı koloniler tek çekilerek NBS sıvı besi yerinde 65°C'de 200 rpm'de 48 saat geliştirilmiştir. NBS besi yerinde geliştirilen kültürlerden NAS katı besi yerine seri çizgi ekimler yapılmak suretiyle *Bacillus* sp olduğu düşünülen 14 koloni saflaştırılmıştır.

##### 3.1.2 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus* sp. türlerinin tanımlanması

###### 3.1.2.1 Glukoz test sonuçları:

Ortamdaki glukoz seviyesinin azalması, mavi renkteki besi yerinin sarı renge dönmesi neticesinde fiziksel olarak gözlenmektedir. Çalışmamızda, izole edilen kültürlerin tamamının karbon kaynağı olarak basit bir şeker olan glukozu kullanmadıkları besi yerinde renk değişiminin olmaması ile gözlemlenmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1** Amilolitik *Bacillus* sp. suşlarını temsilen *Bacillus* sp. OZ-1’de glukoz testi

### 3.1.2.2 Katalaz test sonuçları:

*Bacillus* sp. türleri katalaz pozitif özellik göstermektedir. NAS besiyeri üzerinde üremeye bırakılan saf kolonilerin üzerine hidrojen peroksit damlatılmıştır. İzole edilen amilolitik özellikteki 14 adet *Bacillus* sp. kültürünün katalaz pozitif olduğu ve hidrojen peroksiti kullanarak su ve oksijen oluşturduğu kolonilerdeki gaz çıkışı ile fiziksel olarak gözlenmiştir (Şekil 3.2).

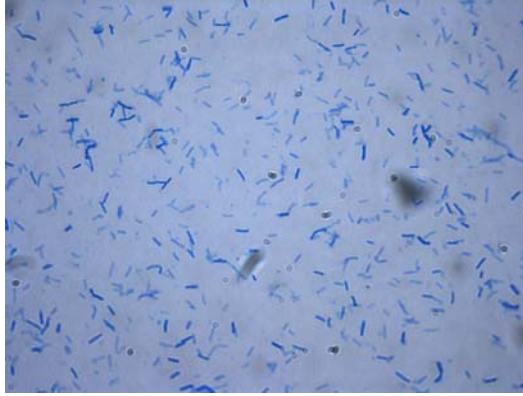


**Şekil 3.2** Katalaz pozitif *Bacillus* sp. OZ-1 suşunda gaz oluşumu



### 3.1.2.3 Metilen mavisi ile boyama sonuçları:

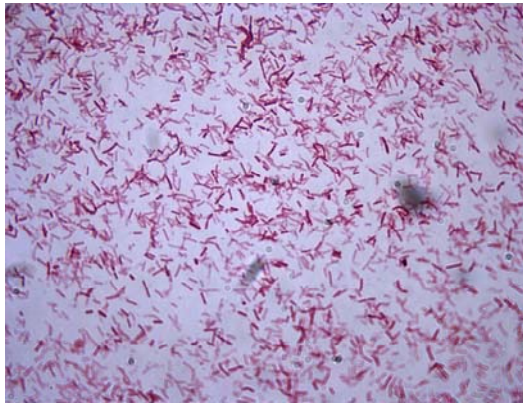
Hazırlamış olduğumuz preparatların üzerine immersiyon yağı damlatılarak bakterilerin morfolojileri ışık mikroskobunda gözlenmiştir. Gözlem sonuçları izole etmiş olduğumuz amilolitik özellikteki 14 adet *Bacillus* sp. suşunun basil şeklinde olduğu ışık mikroskobu (OLYMPUS) altında gözlenmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3** Çubuk şeklinde morfoloji gösteren *Bacillus* sp. OZ1

### 3.1.2.4 Gram boyama sonuçları:

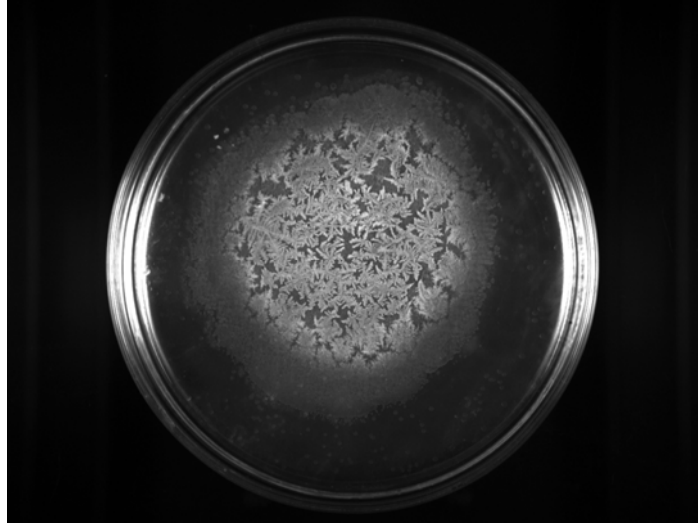
Hazırlamış olduğumuz preparatın üzerine immersiyon yağı damlatılarak boyanma özelliği ışık mikroskobunda gözlenmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda, izole etmiş olduğumuz amilolitik özellikteki 14 adet *Bacillus* sp. suşunun Gram (+) olduğu ve mikroskop altında mavi-mor renkte basiller şeklinde kendilerini gösterdikleri gözlenmiştir (Şekil 3.4).



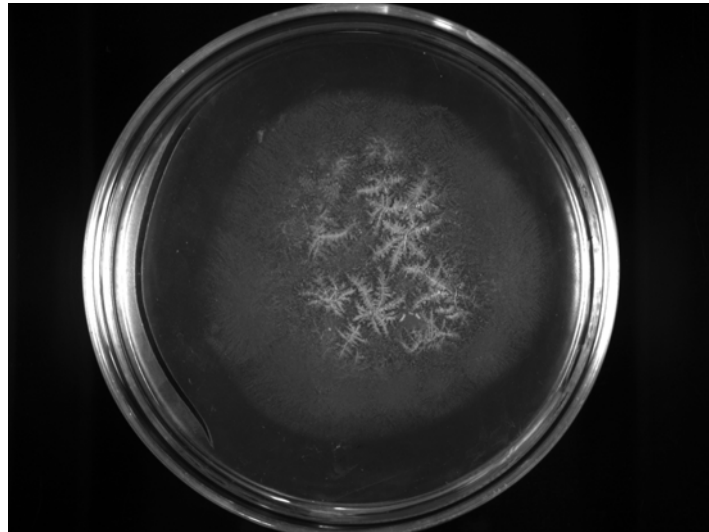
**Şekil 3.4** Gram-pozitif *Bacillus* sp. OZ1 suşu

### 3.1.2.5 Koloni morfolojisi sonuçları:

İzole edilen amilolitik termofilik özellikteki *Bacillus* sp. ler NAS katı besi yerinde 65°C’de 72 saat inkübe edildiğinde besi yeri içeriğine ve gelişen bakterinin türüne göre DLA (Diffusion Limited Aggregated model) modelinde koloni morfolojisi göstermiştir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu ile birlikte takip edilen izolatlarımızın *Bacillus* sp. kolonilerin göstermiş olduğu DLA modelinde aynı koloni morfolojilerini göstermiştir (Şekil 3.5 a ve b).



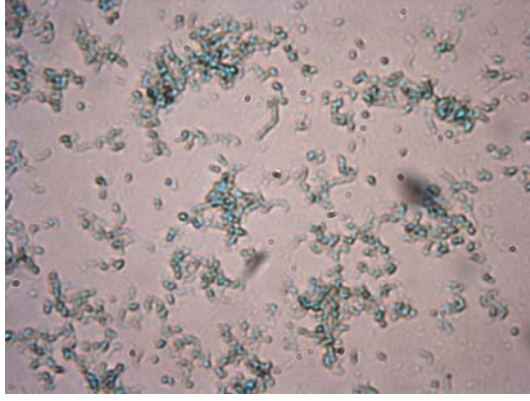
**Şekil 3.5a** *Bacillus* sp. OZ1 suşu “DLA” modelinde koloni morfolojisi göstermiştir



**Şekil 3.5b** *Bacillus subtilis* ATCC 6633 “DLA” modelinde koloni morfolojisi göstermiştir

### 3.1.2.6 Spor boyama sonuçları:

Oda sıcaklığında 1 gece uygun sıvı besiyerinde (Nutrient broth + Nişasta) bekletilerek spor oluşumu sağlanan *Bacillus* sp. lerden alınan sıvı numune lam üzerine yayma yapılarak havada kurutulmuş, ardından alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Lam kurutma kağıdı ile kaplanarak üzerine % 1-2' lik Malaşit yeşili damlatılmış ve kurutma kağıdı kuruyana kadar bek alevinde tutulmuştur. Lam çeşme suyu ile yıkanmış ve üzerine sulu bazik fuksin damlatılarak 30 sn beklenmiştir. Örnek, su ile yıkanarak hava akımı yardımı ile kurutulmuş ve immersiyon yağı ile 100X büyütmede ışık mikroskobu altında sporlar görüntülenmiştir (Şekil 3.6).

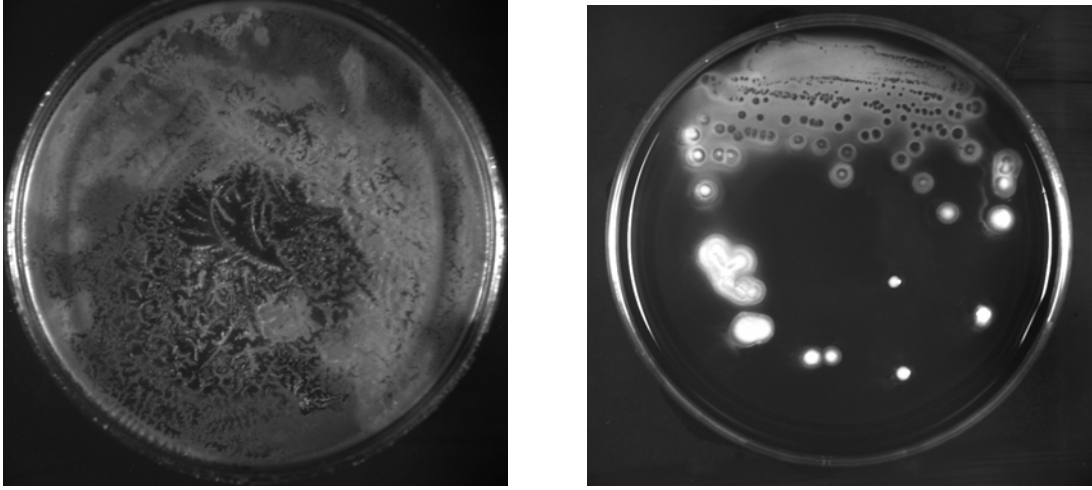


**Şekil 3.6** Malaşit yeşili ile boyanan *Bacillus* sp. OZ1 suşunda sporların gözlenmesi

Bu parametreler doğrultusunda yapılan karakterizasyon işleminin neticesinde, izole etmiş olduğumuz amilolitik özellikteki 14 adet *Bacillus* sp. suşunun birbirleri ile aynı özellikleri sergilediği gözlemlendiğinden çalışmamızın geri kalan kısmı bu suşlar arasından seçilen bir tanesi (*Bacillus* sp. OZ1) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.2.7 İyodin testi ile amilolitik aktivitenin belirlenmesi

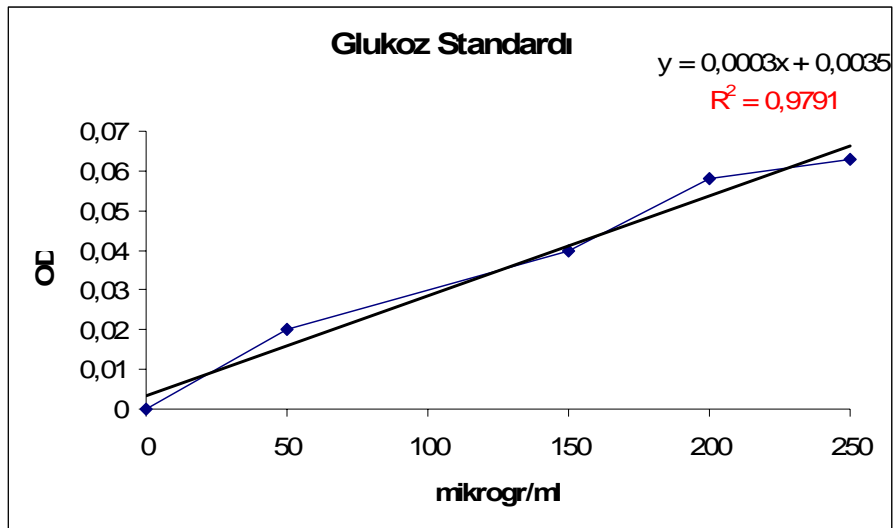
İyot bir amilaz indükatörüdür. Ortamdaki amilaz enziminin varlığı; koloniler etrafında oluşan zonlar şeklinde kendini göstermektedir. *Bacillus* sp. OZ1 ve rekombinant *E.coli* DHa suşlarının amilolitik aktivitesi Şekil 3.7'de koloniler etrafında oluşan zonların varlığı ile gözlenmiştir.



**Şekil 3.7** *Bacillus* sp. OZ1 (a) ve rekombinant *E.coli* DHα (b) suşlarının amilolitik aktivitesi koloniler etrafında oluşan zonların varlığı ile gözlenmiştir

### 3.1.2.8 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus* sp. OZ1 suşunun ürettiği enzim aktivitesinin DNS yöntemi ile belirlenmesi

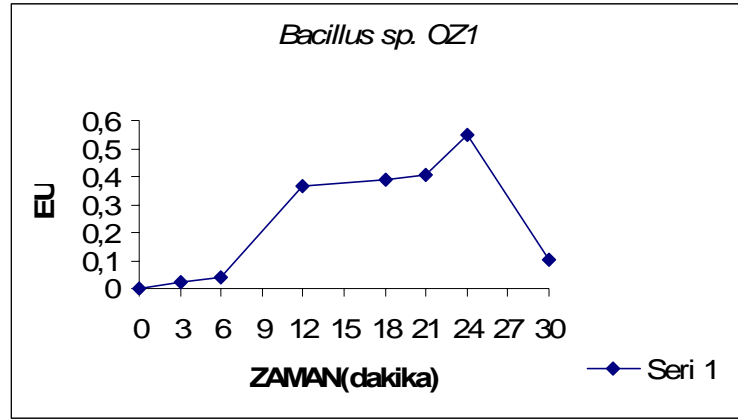
Aktivite tayinini gerçekleştirebilmek için Glukoz standartı kullanılmış ve başarılı  $R^2$  değerine 50-100-150-200-250-300 mg/ml glukoz kullanılarak ulaşılmıştır (Şekil 3.8).



**Şekil 3.8** *Bacillus* sp. OZ1 suşunda serbest glukoz miktarının spektrofotometrik tayini için kullanılan standart glukoz eğrisi (OD<sub>540nm</sub>)

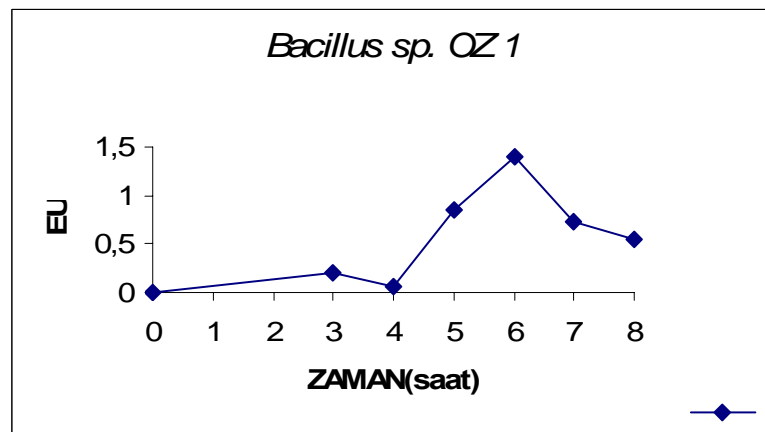
$$\frac{\text{Reaksiyon eğimi (OD/dk)}}{\text{Standart glukoz eğimi (OD/dk)}} \times \frac{\text{Reaksiyon hacmi (ml)}}{\text{Enzim hacmi (ml)}} \times \frac{1 \mu\text{M}}{\text{Glukoz MA}} = \text{EU} \quad (\mu\text{M}/\text{min.ml})$$

formülü enzim aktivite tayini için kullanılmıştır. Bunun sonucunda uygun sayısal değere ulaşabilmek için *Bacillus* sp. OZ1 suşu için farklı zaman aralıklarında eğimler hesaplanmıştır. Başlangıç reaksiyon aktivitesinin tesbiti içinde yine aynı yöntem kullanılarak eğimler tesbit edilmiştir. Enzim ünitesinin formülasyon sonuçları şekil 3.9 ve 3.10 da gösterilmiştir.



EU: Enzim ünitesi ( $\mu\text{M}/\text{min.ml}$ )

**Şekil 3.9** *Bacillus* sp. OZ1 suşunda serbest glukoz miktarının 0-30 dakika arasındaki spektrofotometrik tayini ( $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ )



EU: Enzim ünitesi ( $\mu\text{M}/\text{min.ml}$ )

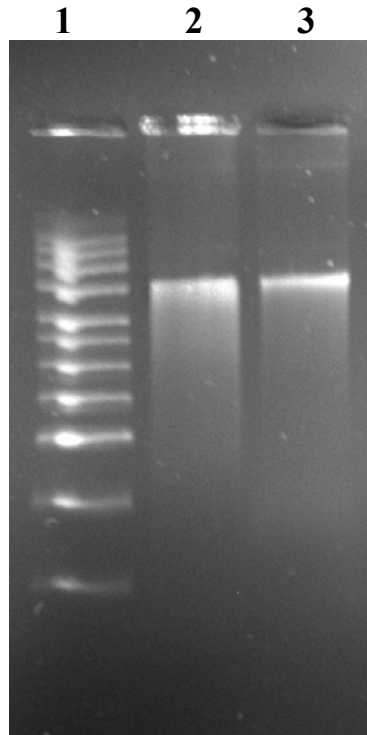
**Şekil 3.10** *Bacillus* sp. OZ1 suşunda serbest glukoz miktarının 0-8 saat arasındaki spektrofotometrik tayini ( $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ )

## 3.2 Termostabil *Bacillus* sp. OZ1 suşunda alfa-amilaz üretiminin genetik yönü

### 3.2.1 Alfa-amilaz üretiminden sorumlu olan gen bölgesi

#### 3.2.1.1 Termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus* sp. OZ1 suşundan kromozomal DNA izolasyonu

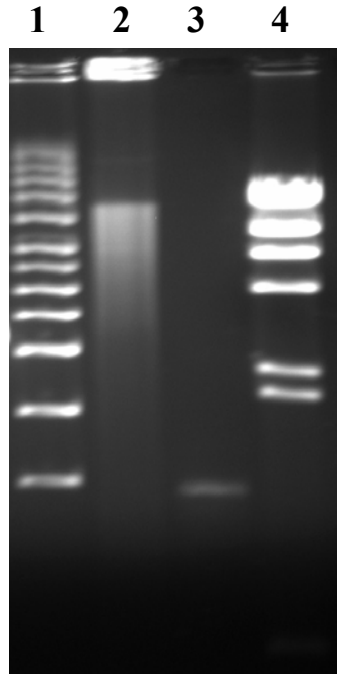
Etanol pelletten tamamen uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen kromozomal DNA, TE tamponu içerisinde, ileri manipülasyonlarda kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır. *Bacillus* sp. OZ1 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşuna ait kromozomal DNA’lar, % 0.8’lik agaroz jelde 3 saat süresince 90V’da yürütülmüş ve görüntülenmiştir. *Bacillus* sp. OZ1 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan izole edilmiş olan kromozomal DNA’ların büyüklüklerinin birbirleri ile aynı olduğu görülmüştür (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11** *Bacillus* sp. OZ1 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan kromozomal DNA izolasyonu (**Lane 1:** supercoiled DNA Markırı; **Lane 2:** *Bacillus* sp. OZ1 DNA; **Lane 3:** *Bacillus subtilis* ATCC 6633 DNA )

### 3.2.1.2 Kromozomal DNA üzerinden alfa-amilaz geninin PCR reaksiyonu ile amplifikasyonu

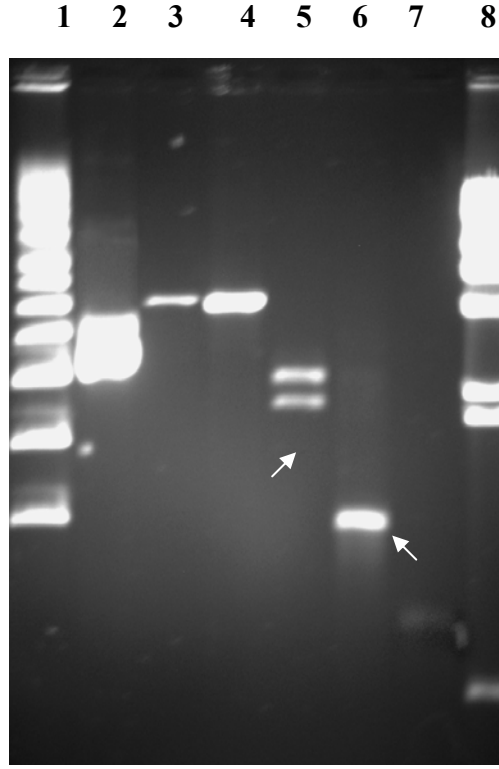
*Bacillus* sp. OZ1'e ait kromozomal DNA üzerinde kodlanmış olan ve alfa amilaz üretiminden sorumlu olan *Amy E* gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmış ve % 0.8'lik agaroz jelde *Bacillus* sp. OZ1'in kromozomal DNA'sı ile birlikte yürütülerek yaklaşık 2.10 kbp büyüklüğünde olan fragmant KODAK jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 3.12).



**Şekil 3.12** *Bacillus* sp. OZ1 suşuna ait kromozomal DNA ve PCR ürünü (**Lane 1:** supercoiled DNA Markırı; **Lane 2:** *Bacillus* sp. OZ1 DNA; **Lane 3:** PCR ürünü; **Lane 4:**  $\lambda$ DNA/*HindIII* )

### 3.2.1.3 PCR ürününün agaroz jelden eldesi ve *HindIII* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesimi

Elde edilen PCR ürünü *HindIII* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek yine aynı enzimler ile kesilmiş olan pR3222 pilazmid vektörünün yaklaşık 2.3 kbp büyüklüğündeki Ampisillin direnç geni ve replikasyon orijinini (Ori C) içeren fragmentine aktarılarak “**pOZ322**” olarak isimlendirilen rekombinant DNA molekülü oluşturulmuştur (Şekil 3.13).



**Şekil 3.13** pBR322 pilazmid vektörü ve *Bacillus* sp. OZ1 suşuna ait kromozomal DNA'dan elde edilen PCR ürünü üzerindeki manipülasyonların birlikte görüntülenmesi (**Lane 1:** supercoiled DNA Markırı; **Lane 2:** halkasal pBR322; **Lane 3:** PvuII ile kesilmiş pBR322; **Lane 4:** HindIII ile kesilmiş pBR322; **Lane 5:** PvuII ve HindIII ile kesilmiş pBR322; **Lane 6:** PCR gen ürünü; **Lane 7:** PvuII ve HindIII ile kesilmiş PCR ürünü; **Lane 8:**  $\lambda$ DNA/HindIII )

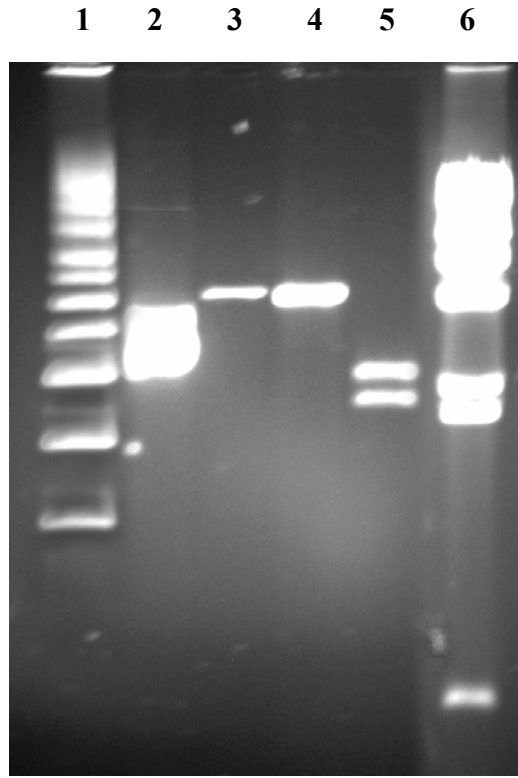
### 3.2.2 Vektör pBR322 üzerinde yapılan genetik manipülasyonlar

Yapmış olduğumuz çalışmada 4.43 kbp büyüklüğündeki pBR322 vektörü, HindIII ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesilerek 2.3 kbp ve 2.05 kbp büyüklüğünde olan iki fragment elde edilmiştir. 2.3 kbp büyüklüğündeki fragment, vektörün replikasyon orijini OriC'yi ve Ampisillin direnç genini taşımaktadır. Ampisillin direnç geni çalışmanın bir sonraki aşamasında, oluşturmuş olduğumuz rekombinant DNA molekülü “pOZ322” yi taşıyan konukçu bakterinin seçilmesi amacıyla kullanılacaktır.



### 3.2.2.1 pBR322 pilazmid vektörünün *HindIII* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesimi

*HindIII* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri tarafından kesilen pBR322 pilazmid vektörü % 0.8'lik agaroz jelde yürütülerek KODAK jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve 2.3kbp büyüklüğünde olan ve ampisillin direnç geni ile replikasyon orijini Ori C'yi içeren fragment % 0.2'lik agaroz jelden “**düşük kaynama sıcaklığı noktası yardımı ile DNA'nın jelden alınması**” yöntemi ile alınarak daha ileri moleküler genetik uygulamalar için hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14** Halkasal ve restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan pBR322 pilazmid vektörü (**Lane 1:** supercoiled DNA Markırı; **Lane 2:** halkasal pBR322; **Lane 3:** *PvuII* ile kesilmiş pBR322; **Lane 4:** *HindIII* ile kesilmiş pBR322; **Lane 5:** *PvuII* ve *HindIII* ile kesilmiş pBR322; **Lane 6:**  $\lambda$ DNA/*HindIII* )

### 3.2.3 Rekombinant DNA molekülünün (pOZ322) oluşturulması (Ligasyon)

OZ-1'e ait alfa amilaz genini içeren *Amy E* gen bölgesi OZ1'e ait kromozomal DNA üzerinden PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu DNA fragmenti *HindIII* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek yine aynı enzimlerle kesilmiş olan pBR322 pilazmid vektörünün replikasyon orijini OriC ve Ampisillin direnç genini taşıyan 2.3 kbp'lık fragmantına ligasyon ile aktarılmıştır (Şekil 3.15)



**Şekil 3.15** pBR322' ye ait fragment ve aynı enzimler ile kesilmiş PCR ürünü (**Lane 1:** supercoiled DNA Markırı; **Lane 2:** *PvuII* ve *HindIII* ile kesilmiş pBR322; **Lane 3:** *PvuII* ve *HindIII* ile kesilmiş PCR ürünü )

### 3.2.4 pOZ322 rekombinant DNA'nın alıcı *E. coli* DH $\alpha$ hücrelerine transformasyonu

Yapmış olduğumuz çalışmada oluşturmuş olduğumuz “pOZ322” rekombinant DNA molekülü CaCl<sub>2</sub> yöntemi kullanılarak konukçu bakteriye aktarılmıştır. Bu çalışmada konukçu hücre olarak ticari olarak satılan ve pilazmid içermeyen *E. coli* DH $\alpha$  suşu kullanılmıştır. Rekombinant DNA molekülünü taşıyan *E. coli* DH $\alpha$  suşu uygun besi yerinde (nişasta ve ampisillin içeren LB) 6 gün süre ile geliştirilmiştir.

### 3.2.5 Rekombinant DNA molekülünü taşıyan *E. coli* DH $\alpha$ suşlarının tespiti

Yapılan çalışmada oluşturmuş olduğumuz “pOZ322” rekombinant DNA molekülü, CaCl<sub>2</sub> yöntemi ile *E. coli* DH $\alpha$  suşuna aktarılmıştır. Bu çalışmada ampisillin içeren ve ampisillin içermeyen LB %1 nişastalı katı besi yeri kullanılmıştır.

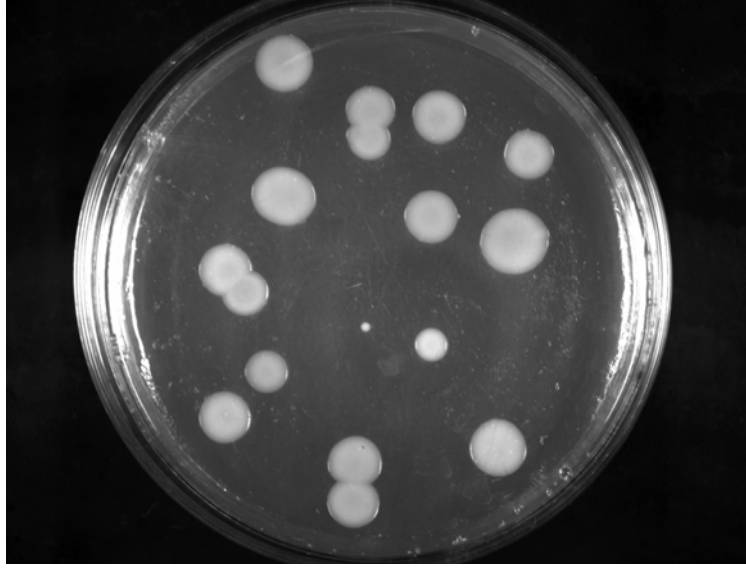
Ampisillin ve %1’lik nişasta içeren katı besi yerinde 6 gün süresince 37°C’de üremeye bırakılan petrilere Ampisilline dirençli koloniler olduğu ve bunlarında normalden daha büyük olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.16). Kontrol için kullanılan ve ampisillin içermeyen %1’lik katı besi yerinde aynı koşullarda üremeye bırakılan *E. coli* DH $\alpha$  kültüründeki kolonilerin ise irili ufaklı ve çok sayıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17).

Bir diğer LB katı besi yeri içeren petride ise Ampisillin ve %1’lik nişasta bulunmasına karşın, rekombinant DNA molekülünü içermeyen ligasyon karışımı ile transformasyon yapılmış *E. coli* DH $\alpha$  suşu bulunmaktadır. Aynı koşullarda, 6 gün süresince 37°C’de üremeye bırakılan kültürlerle bakıldığında petri plaka üzerinde herhangi bir üreme olmadığı gözlenmiştir.

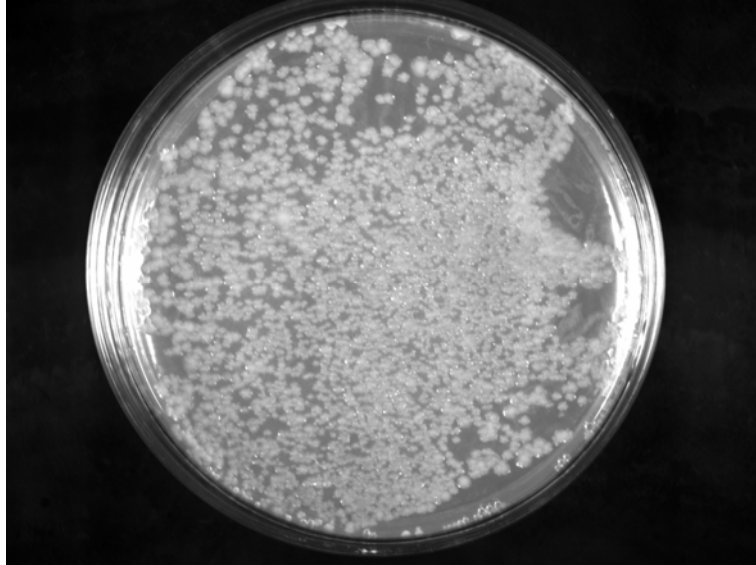
Çalışmamızda, uygun besi yerinde gelişen kolonilerden Ampisilline dirençli olanlar seçilerek bunlar bir sonraki aşamada gerçekleştirilecek olan pilazmid DNA izolasyonu için hazırlanmıştır.

### 3.2.6 Rekombinant DNA molekülünü taşıyan *E. coli* DH $\alpha$ suşundan pilazmid DNA izolasyonu

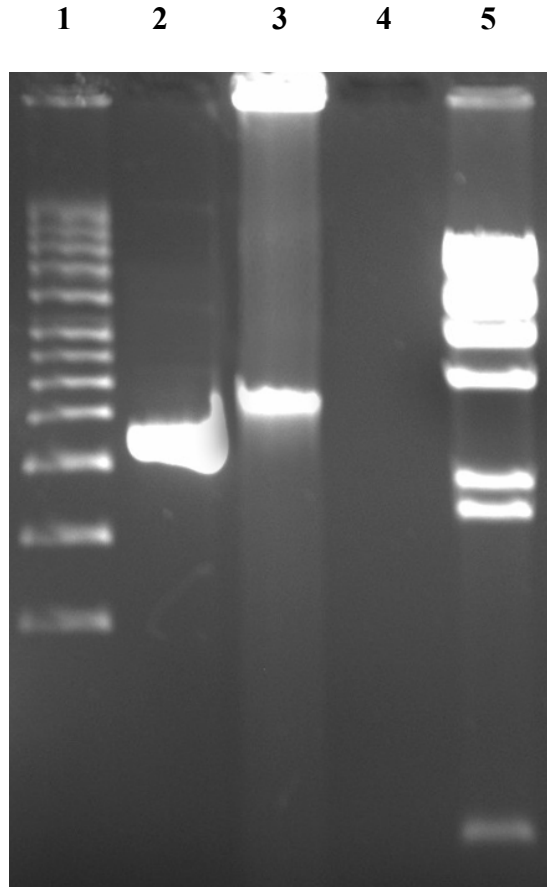
Yapılan çalışmada transformasyon sonrasında Ampisilline dirençli amilolitik özellikteki rekombinant *E. coli* DH $\alpha$  suşunun oluşturduğu saf kolonilerden pilazmid DNA izole edilmiştir. Bu çalışmada konukçu olarak kullanılan *E. coli* DH $\alpha$  suşu ticari olarak satılan pilazmid içermeyen bir suştur. İzole etmiş olduğumuz rekombinant pilazmid DNA % 0.8’lik agaroz jelde 90V’da 4 saat boyunca yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 3.18)



**Sekil 3.16** Rekombinant DNA molekülünü barındıran ve amilolitik özelliğe sahip olan ampisillin dirençli *E. coli* DH $\alpha$  suşunun oluşturduğu koloniler (LB nişastalı agar + Ampisillin)



**Sekil 3.17** Rekombinant kolonilerin seçimi için kullanılan kontrol besiyerinde gelişen koloniler (LB nişastalı agar)



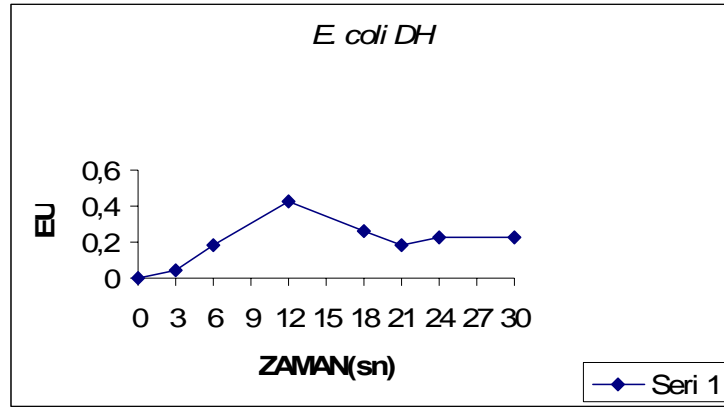
**Şekil 3.18** Rekombinant pilazmidi içeren *E. coli* DH $\alpha$  suşundan rekombinant pilazmid izolasyonu (**Lane 1:** supercoiled DNA Markırı; **Lane 2:** halkasal pBR322; **Lane 3:** *E. coli* DH $\alpha$  suşundan elde edilen rekombinant pilazmid; **Lane 4:** kontrol, pilazmid DNA içermeyen ticari *E. coli* DH $\alpha$  suşu ; **Lane 5:**  $\lambda$ DNA/HindIII )

### 3.2.7 Rekombinant *E. coli* DH $\alpha$ suşunun üretmiş olduğu enzim aktivitesinin DNS yöntemi ile belirlenmesi

Aktivite tayinini gerçekleştirebilmek için Glukoz standartı kullanılmış ve başarılı  $R^2$  değerine 50-100-150-200-250-300 mg/ml glukoz kullanılarak ulaşılmıştır (Şekil 3.9). Bu değer ulaşıldığı eğim noktası ise enzim aktivite tayini için seçilmiştir.

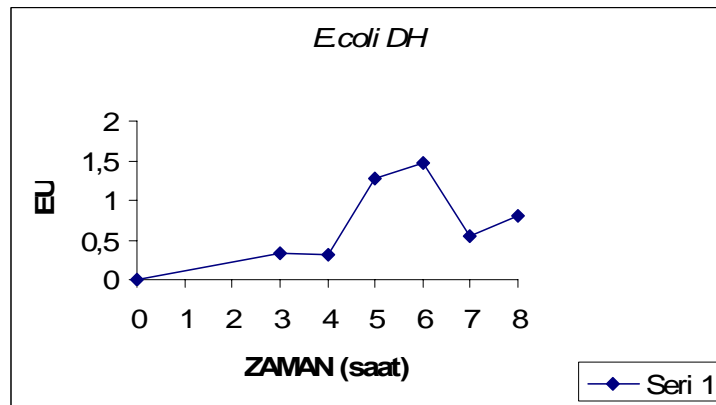
$$\frac{\text{Reaksiyon eğimi (OD/dk)}}{\text{Standart glukoz eğimi (OD/dk)}} \times \frac{\text{Reaksiyon hacmi (ml)}}{\text{Enzim hacmi (ml)}} \times \frac{1 \mu\text{M}}{\text{Glukoz MA}} = \text{EU} \quad (\mu\text{M}/\text{min.ml})$$

formülü enzim aktivite tayini için kullanılmıştır. Bunun sonucunda uygun sayısal değere ulaşabilmek için *E.coli* DHα suşu için eğim hesaplanmış ve grafiksel olarak sonuçlar gösterilmiştir (Şekil 3.20). Başlangıç reaksiyon aktivitesinin tesbiti içinde yine aynı yöntem kullanılarak eğim değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.19).



EU: Enzim ünitesi ( $\mu\text{M}/\text{min.ml}$ )

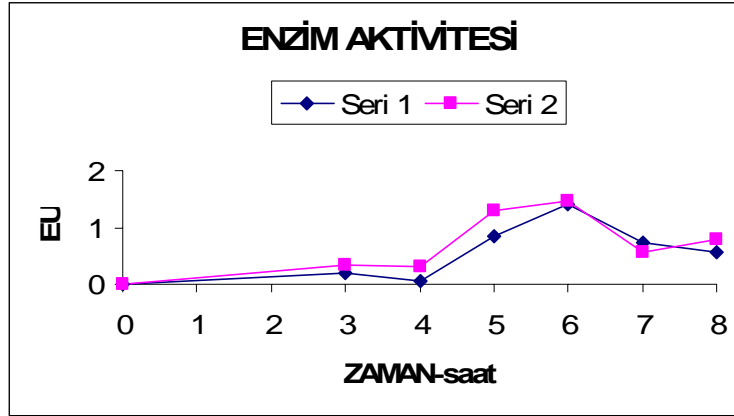
**Şekil 3.19** *E. coli* DHα suşunda serbest glukoz miktarının 0-30 dakika arasındaki spektrofotometrik tayini ( $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ )



EU: Enzim ünitesi ( $\mu\text{M}/\text{min.ml}$ )

**Şekil 3.20** *E. coli* DHα suşunda serbest glukoz miktarının 0-8 saat arasındaki spektrofotometrik tayini ( $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ )

0-8 saat aralığında gerçekleştirilen enzim aktivite tayininde, rekombinant *E.coli* DH $\alpha$  suşunun enzim aktivitesinin *Bacillus* sp. OZ1 suşunun enzim aktivitesinden daha fazla olduğu tesbit edilmiştir (şekil 3.21, özellikle 5. saat aralığında)



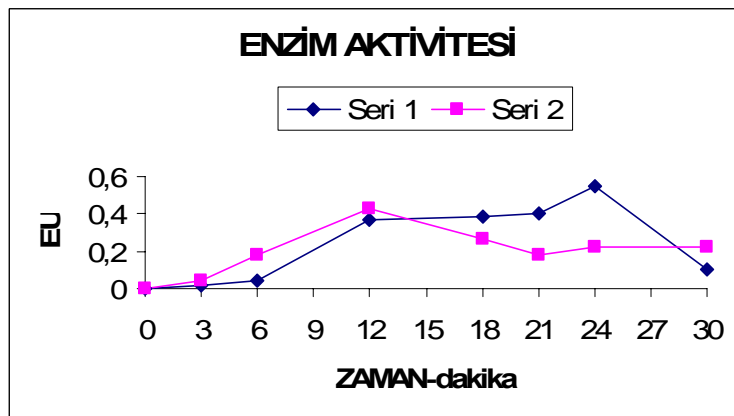
Seri 1: *Bacillus* sp. OZ1

Seri 2: *E. coli* DH $\alpha$

EU: Enzim ünitesi ( $\mu$ M/min.ml)

Şekil 3.21 *Bacillus* sp. OZ1 ve *E. coli* DH $\alpha$  suşlarında  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi (0-8 saat)

0-30 dakika zaman aralığında gerçekleştirilen enzim aktivite tayininin kullanılma sebebi; başlangıç reaksiyon oranını tesbit etmektir. Amaç; enzimin başlangıç aktivitesinin varlığını gözlemlemektir. Bunun sonucunda; Şekil 3.22’de *Bacillus* sp. OZ1 ve *E.coli* DH $\alpha$  suşunun başlangıç enzim aktivite varlığı gösterdiği tesbit edilmiştir. Her ikisinde de bir artış gözlenirken; başlangıç reaksiyonunun *Bacillus* sp. OZ1 suşunda daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Seri 1: *Bacillus* sp. OZ1

Seri 2: *E. coli* DH $\alpha$

EU: Enzim ünitesi ( $\mu$ M/min.ml)

Şekil 3.22 *Bacillus* sp. OZ1 ve *E. coli* DH $\alpha$  suşlarında  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi (0-30 dak)

## BÖLÜM IV

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Balıkesir ili ve çevresindeki Bigadiç-Hisarköy, Susurluk-Kepekler, Sındırgı-Hisaralan, Balya-Ilıca ve Edremit-Güre kaplıcaları termal alan ve ılıcalarından toplanan yirmi beş adet sıcak su örneklerinden izole edilen izolatlarının biyokimyasal ve fiziksel analizleri sonucunda bunların amilolitik özellikte *Bacillus* sp. türleri olduğu anlaşılmış ve izolatlar *Bacillus* sp. OZ1, OZ2, OZ3, OZ4, OZ5, OZ6, OZ7, OZ8, OZ9, OZ10, OZ11, OZ12, OZ13, OZ14 olarak isimlendirilmişlerdir. Bu izolatların karbon kaynağı olarak glukoz gibi basit şekerler yerine kompleks karbon kaynağı olan çözünebilir nişastayı kullandıkları, hidrojen peroksidi kullanarak su ve oksijen oluşturduğu tespit edilmiştir. Işık mikroskopunda yapılan analizler sonucu, bu bakterilerin çubuk, basil şeklinde olduğu ve Gram boyama ile Gram (+) özellikte olup mikroskopta pembe renkte basiller şeklinde olduğu görülmüştür. Spor boyama sonucunda böbrek şeklinde *Bacillus subtilis* türlerinde görülen spor modelini gösterdikleri gözlenmiştir. Bununla birlikte OZ1, OZ2, OZ3, OZ4, OZ5, OZ6, OZ7, OZ8, OZ9, OZ10, OZ11, OZ12, OZ13 ve OZ-14 suşları *Bacillus subtilis* türlerine ait DLA modelinde aynı koloni morfolojilerini sergiledikleri görülmüştür.

Yapılan çalışmada DNS yöntemi kullanılarak izolatlardan elde edilen kaba enzim çözeltileri ile enzim aktivite değerleri oransal olarak hesaplanmıştır. Enzim aktiviteleri kıyaslandığında bütün izolatlarda enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu saatin üremenin 3 ile 6. saatleri aralığında olduğu tespit edilmiştir. İzolatlar arasından seçilen *Bacillus* sp. OZ1 izolatu için maksimum aktivite değerine bakıldığında enzimin yüksek aktivitesinin pH:7 ve pH:7.5 aralığında koruduğu görülmüştür.

Bu çalışmada izolatlar arasından seçilmiş olan *Bacillus* sp. OZ-1'e ait kromozomal DNA üzerinde kodlanmış olan alfa amilaz üretiminden sorumlu olan *Amy E* gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmış, çoğaltılan bu DNA fragmenti HindIII ve PvuII restriksiyon enzimleri ile kesilerek aynı enzimlerle kesilmiş olan pBR322 pilazmid vektörüne ligasyon ile aktarılmıştır. Oluşturulan ve "pOZ322" olarak isimlendirilen rekombinant pilazmid CaCl<sub>2</sub> yöntemi kullanılarak konukçu bakteri *E.coli*



DH $\alpha$  suşuna aktarılmıştır. Uygun besi yerinde geliştirilen kolonilerden rekombinant pilazmidi taşıyan Ampisilline dirençli olan koloniler seçilmiş ve bunlar bir sonraki aşamada rekombinant pilazmid izole edilmek üzere hazırlanmıştır.

Yapılan çalışmada Ampisilline dirençli amilolitik özellikteki rekombinant *E.coli* DH $\alpha$  suşunun oluşturduğu saf kolonilerden pilazmid DNA izole edilmiştir. Rekombinant pilazmidi taşıyan *E.coli* DH $\alpha$  suşunun oluşturduğu kolonilerden izole edilen kaba enzimin oransal aktivitesi DNS yöntemi ile belirlenmiştir. *Bacillus* sp. OZ-1 suşundan elde edilen enzimin aktivitesi ile *E.coli* DH $\alpha$  suşunun oluşturduğu rekombinant pilazmidi taşıyan kolonilerden izole edilen enzimin aktivitesi aralarında 5. saatten sonra belirgin bir fark görülmemiştir.

Balıkesir ili ve çevresindeki sıcak su kaynaklarından toplanan su örneklerinden yapılan izolasyon sonucunda, nişastalı besiyerinde gelişim yeteneğine sahip olan bakteriler çalışmanın ana kaynağı olmak üzere seçilmiş ve amilaz enzim aktivitesinin varlığı tayin edilmiştir. İzole edilen bu bakteriler fiziksel ve biyokimyasal analizler neticesinde kontrol kabul edilen *Bacillus subtilis* suşu ile karşılaştırılmış ve bunun sonucunda izole edilen 14 adet bakterinin *Bacillus* sp. olduğu sonucuna varılmıştır. İzole edilen *Bacillus* sp. suşları içerisinde; çalışmanın genetik kısmını oluşturabilmesi için en iyi enzim aktivitesi gösteren bakteri seçimi gerçekleştirilmiş ve çalışmalara bu bakteri üzerinden devam edilmiştir. Amilaz enziminin varlığı gerek DNS yöntemi kullanımı sonucu spektrofotometrik olarak, gerekse amilazın indikatörü sayılan iyot ayırıcının reaksiyonu sonucu oluşan zonların varlığı ile gözlemlenmiştir. Yapılan enzim aktivite tayin değerleri için standart glukoz çözeltisi kullanılmış ve aktivitenin giderek artan bir grafik izlediği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR:

1. Andrade, C.M.M.C., Pereira Jr., N. and Antranikian, G. 1999. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologi.*, 30: 287-298.
2. Asghari, S.M., Khajeh, K., Ranjbar, B., Sajedi, R.H. and Manesh, H.N. 2004. Comparative studies trifluoroethanol (TFE) state of a thermophilic alpha amylase and its mesophilic counterpart: limited proteolysis conformational analysis, aggregation and reactivation of the enzymes. *International J. Biological Macromolecules*, 34: 173-179.
3. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Sidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons, Inc.,NY). Vol. 1,Ch. 2.2.
4. Babu, K.A., Satyanarayana, T. 1993. Extracellular calcium inhibited alpha amylase of *Bacillus coagulans* B49". *Enzyme Microbial Technology*, 15: 1066-1069.
5. Balbas, P., Soberon, X., Merino, E. Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N.and Bolivar, F. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives. *Gene.*;50(1-3): 3-40.
6. Bernfeld, P. 1955. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . Methods in Enzymology. Vol 1, (Colowick, S.P. and N.O. Kaplan, eds) pp 149-158, *Academic Press*, London and Newyork.
7. Bertoldo, C. and Antranikian, G. 2002. Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 151-160.

8. Bibel, M., Brettle, C., Gosslar, U., Kriegshauser, G. and Lieble, W. 1998. Isolation and analysis of genes for amylolytic enzymes of the hyperthermophilic bacterium *thermotoga maritima*. *FEMS Microbiology Letters*, 158: 9-15.
9. Cowan, D.A. 1997 Thermophilic Proteins: Stability and function in aqueous and organic Solvents. *Comp. Biochem., Physiol.* Vol. 118A, No:3 ,429-438.
10. Cokmuş. C., Dönmez, G., Saçılık, S.C. and Berber, İ. 1995. Temel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Klavuzu. Ankara.
11. Demirjian, C. D., Moris-Varas, F. And Cassidy, S.C. 2001. Enzymes from Extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5: 144-151.
12. Demirkan, E.S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T. and Utsumi, S. 2005. Alpha amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E.coli* Process *Biochemistry Article in press*.
13. Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A. and Zeikus, J.G. 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9): 3569-3576.
14. Eichler, J. 2001 Biotechnological uses of archaeal extramozyme. *Biotechnology Advances*, 19: 261-278.
15. Elder, J.K. and Southern, E.M. 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis II: Comparison of methods for relating mobility to fragment length. *Anal. Biochem.*, 128: 227-231.
16. Frank, M.B. 1997. Calcium chloride transformation of bacteria with plasmids. *In: Frank, M.B., ed. Molecular Biology Protocols*.

17. French, C., Moore, E.K. and Warel, J.M. 1996. Development of a simple method from the recovery of recombinant proteins from the *E.coli* periplasm. *Enzyme and Microbial Tech.*, 19: 332-338.
18. Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6): 518-525.
19. Haki, G.D. and Raksit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technolog*, 89: 17-34.
20. <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>
21. <http://www.freepatentsonline.com>
22. <http://www.delphion.com>
23. <http://www.inventions-patents.net>
24. Huber, H. and Stetter, K.O. 1998. Hyperthermophiles and their possible potential in Biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 64: 39-52.
25. Ikram-ul-Haq, Ashaf, H., Qadeer, M.A. and Iqbal, J. 2005. Pearl Millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 96: 1201-1204.
26. Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96: 23-28.
27. Kuruki, T. and Imanaka, T. 1999. The Concept of the alpha amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *J. of Bioscience and Bioengineering*, 87(5): 557-565.

28. Lacasta, A.M., Cantalapiedra, I.R., Auguet, C.E., Penaranda, A. and Ramirez, P.L. 1999. Modeling of spatiotemporal patterns in bacterial colonies. *Physical Review E*, volume:59, no:6.
29. Laderman, K.A., Davis, B.R., Krutzsch C.H., Lewis, M.S., Griko, Y.V., Privalov, P.L. and Anfinsen, B.C. 1993 The purification and characterization of an extremely thermostable alpha amylase from the hyperthermophilic Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 32:15, 24394-24401.
30. Leemhuis, H., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. 2002. Mutations converting cyclodextrin glycosyltransferase from a transglycosylase into a starch hydrolase. *FEBS Letters*, 514:189-192.
31. Leveque, E., Janecek, S., Haye, B. and Belarbi, A. 2000 Thermophilic archaeal amylolytic enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 3-14.
32. Li, W.F.X.X. and Zhou, L.P. 2005 Structural future of thermozymes. *Biotechnology Advances*. Accepted 6 January (2005) /Received 2 December (2004). In press.
33. Liebel, W., Stemplinger, I. and Ruile, P. 1997. Cloning and characterization of a thermostable intracellular alpha amylase gene from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MBS8. *J. Bacteriol.*, 179(3): 942-948.
34. Linden, A., Niehaus, F. and Antranikian, G. 2000. Single step purification of recombinant thermostable alpha amylase after solubilization of the enzyme from insoluble aggregates. *Journal of Chromatography*, 737: 253-259.
35. Lo, H.F, Lin, L.L., Chen, H.L., Hsu, W.H. and Chang, C.T. 2001. Enzymatic properties of SDS resistant *Bacillus sp.* TS-23 alpha amylase produced by recombinant *E.coli*. *Process Biochem.*, 36: 743-750.

36. Malhotra, R., Noorwez, S.M. and Satyanarayana, T. 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology.*, 31: 378-384.
37. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory.
38. Nielsen, J.E. and Borchert, T.V. 2000. Protein engineering of bacterial alpha amylase. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1543: 253-274.
39. Nielsen, A.D., Pusey, M.L., Fuglsang, C.C. and Westh, P. 2003. A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus* alpha amylase- the effect of calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1652: 52-63.
40. O'Sullivan, D., Klaenhammer, T.R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus spp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 2730-2733.
41. Raghava, G.P.S. 2001. A Web Server for Computing the Size of DNA/Protein Fragments using a Graphical Method. *Biotech Software & Internet Report.*, 2: 5.
42. Schaffer, B.S. and Sederoff, J. 1981. Gel applies a least squares fit to the reciprocal relationship between mobility and fragment length originally detailed. *Anal. Biochem.*, 115:113-122. Sidhu, G.S., Sharma, T., Chakrabarti, T. and Gupta, J.K. 1997. Strain improvement for production of a thermostable alpha amylase. *Enzyme and Microbial Technology.*, 21: 525-530.
43. Stetter, K.O. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*, 452: 22-25.

44. Sumitani, J.I., Nagae, H., Kawaguchi, T. and Arai, M. 1998. *Bacillus animaltype* alpha amylase : Cloning and sequencing of the Gene and Comparison of the Deduced Amino acid sequence with that of other amylases. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(4): 428-432.
45. Tachibana, Y., Leclerc, M.M., Fujiwara, S., Takagi, M. And Imanaka, T. 1996. Cloning and Expression of the alpha amylase gene from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus* sp. KOD 1 and Characterization of the Enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(3): 224-232.
46. Tanyıldızı, M.S., Özer, D. ve Elibol, M. 2005. Optimization of alpha amylase production by *Bacillus* sp. Using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 40: 2291-2296.
47. William, A.S., Rouse, H., Champe, P. And Harvey, A.R. 2001. Lippincott's Illustrated Reviews Microbiology. *Lippincott Williams&Wilkins*.
48. Wind, R.D., Liebl, W., Buitelaar, M.R., Penninga, D., Spreinat, A., Dijkhuizen, L. and Bahl, H. Cyclodextrin Formation by the Thermostable alpha amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and Reclassification of the Enzyme as a Cyclodextrin Glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 16: 1257-1265.
49. Wiseman, A. 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. *The Application of Enzymes in Industry*, 3: 274-373.
50. Worthington, P., Hoang, V., Perez-Pomares, F. and Blum, P. 2003. Targeted Disruption of the alpha-amylase Gene in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 185(2): 482-488.

## EK 1

# BAKTERİ İZOLASYONUNDA KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI

### M9 NİŞASTA AGAR:

Amilolitik özellikteki bakterilerin seçilmesi amacı ile kullanılmıştır.

Bileşimi:	(gr/lt)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0.5
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub>	0.24
CaCl <sub>2</sub>	0.24
Pepton	3
Nişasta	10

### NUTRIENT BROTH NİŞASTALI BESİ YERİ (NBS):

Amilolitik *Bacillus* sp. suşlarının saflaştırılması amacı ile kullanılmıştır.

Bileşimi	(gr/lt)
Pepton	5
Beef Extract	3
NaCl	8
Nişasta	10



### **NUTRIENT AGAR NİŞASTALI BESİ YERİ (NAS):**

Bileşimi	(gr/lt)
Pepton	5
Beef Extract	3
NaCl	8
Nişasta	10
Agar	15

### **LURIA BERTANİ BESİ YERİ (LB) :**

Rekombiant *E.coli* suşlarının geliştirilmesi amacı ile ampisillin ilave edilerek kullanılmıştır. Amilolitik aktiviteyi arttırmak amacı ile IPTG kullanılmıştır.

Bileşimi	(gr/ml)
Tripton	10
Yeast extract	5
NaCl	10
Nişasta	10
Ampisillin	100mg

## EK 2

### TAMPON ve SOLÜSYONLAR

#### EK-2A: BIYOKİMYASAL TESTLER VE BOYAMA TEKNİKLERİ

##### GLUKOZ TESTİ:

İzole edilen *Bacillus* sp. türlerinin glukoz kullanma yeteneklerinin gösterilmesinde kullanılmıştır. Bu testin temel prensibi sıvı besi yerindeki renk değişimi sonucu bakterilerin karbon kaynağı olarak glukozu kullanıp kullanmadığının anlaşılmasıdır.

Kullanılan kimyasallar	(g/ml)
NB Broth	5ml
Glukoz	1 gr
Bromtimol mavisi	0.004 gr

##### KATALAZ TESTİ:

İzole edilen bakterilerin katalaz reaksiyonlarını saptamak amacı ile bakteri kültürleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak yapılmıştır.

##### GRAM BOYAMA:

Bakterilerin hücre duvar yapılarına göre Gram (+) veya Gram (-) olduklarını göstermek amacı ile kullanılmıştır.

##### **Kristal Violet stok solüsyonu :**

Kristal Violet	1gr
Etanol	%95
dH <sub>2</sub> O	100 ml ye tamamlanır

**Bazik Fuksin stok solüsyonu :**

Bazik Fuksin	3 gr
Etanol	%95
dH <sub>2</sub> O	100 ml ye tamamlanır

**Gram'ın iyot solüsyonu :**

İyot	1 gr
Potasyum İyodür	2 gr
Sodyum karbonat %5	60 ml
dH <sub>2</sub> O	140 ml

**METİLEN MAVİSİ İLE BOYAMA :**

Bakterilerin ışık mikroskobu altında gözlemlenebilir hale gelebilmesi için üzerine bir damla su konulmuş lamele bakteri kültürü ilave edilerek mikroskop altında incelenir

**SPOR BOYAMA :**

**Sulu Bazik Fuksin çözeltisi :**

Bazik Fuksin	3 gr
Etanol %95	100 ml
Malasit Yeşili çözeltisi	%2
Malasit Yeşili	2gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**İYODİN TESTİ İLE AMİLOLİTİK AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ:**

İyot	1gr
Potasyum İyodür	2gr

Bu maddeler 5ml damıtık su içerisinde tamamen çözülür ve bunun üzerine 140ml damıtık su ve %5'lik sulu sodyum karbonattan 60ml ilave edilir. İyice karıştırıldıktan sonra kullanılır

## **EK-2B: DNS YÖNTEMİ İLE AMİLOLİTİK AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ**

DNS yöntemi, elde edilen termofil özellikteki *Bacillus* sp. türleri arasından enzim aktivitesi en yüksek olanının seçimi amacı ile kullanılmıştır.

### **Kaba substrat çözeltisi hazırlanışı :**

0.1 M NaK (pH:7) tampon çözeltisi	100 ml
Nişasta	1 gr

### **DNS çözeltisi hazırlanışı :**

DNS	1 gr
0.1 M NaK (pH:7) tampon çözeltisi	100ml
2N NaOH	8 gr

## **EK-2C: KROMOZOMAL DNA İZOLASYONU**

### **TES tamponu**

10 mM Tris pH:8

5 mM EDTA

%1.5 NaCl

### **%20 SDS Çözeltisi**

SDS	20 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

### **%90 Etanol**

Etanol	90 ml
dH <sub>2</sub> O	100 ml

### **Kloroform-İzoamilalkol Çözeltisi**

Kloroform ve İzoamilalkol 24:1 oranında karıştırılarak hazırlanır.

### **Fenol Çözeltisi**

Fenol	50 gr
NaCl	1.5 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

### **Fenol-Kloroform Çözeltisi**

Fenol ile Kloroform-izoamilalkol çözeltileri 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanır.

### **5M NaCl Çözeltisi**

NaCl	29.2 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

### **TE Tamponu**

0.01 M Tris pH:7.3	
0.001 M Na <sub>2</sub> EDTA	

### **Lizozim enziminin hazırlanışı**

Lizozim	5mg
dH <sub>2</sub> O	1ml

### **RNase enziminin hazırlanışı**

RNase	1 mg
0.01 M NaCl	1ml

### **Proteinaz K enziminin hazırlanışı**

10 mM Tris pH:7.5	0.5 ml
10 mM NaCl	0.5 ml
Proteinaz K	20 mg

**EK-2D**      **ALFA AMİLAZ GENİNİN PCR İLE KROMOZOMAL DNA ÜZERİNDEN ÇOĞALTILMASI**

**PCR reaksiyonu :**

dH <sub>2</sub> O Tip I	29 µl
10X PCR tamponu	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
1.25 mM dNTP set	8 µl
10 pmol/µl F primer	2 µl
10 pmol/µl R primer	2 µl
Taq DNA Polimeraz	5 µl
DNA	1 µl

**PCR reaksiyon koşulları:**

95 C ° 3 dakika	1 siklus
95 C ° 30 sn	
55 C ° 1 dakika	30 siklus
68 C ° 3 dakika	
68 C ° 10 dakika	1 siklus

Tüpler + 4°C'de tutulur

## **EK-2E**      **AGARUZ JELİN HAZIRLANMASI:**

*Bacillus sp.* OZ1 suşundan kromozomal DNA izole edilerek DNA'nın ve DNA üzerinde yapılan manüplasyonların görüntülenmesi amacı ile kullanılmıştır.

<b><u>Agaroz Jel</u></b>	<b>gr/ml</b>
Agaroz	0.8 gr
10X TBE tamponu	100 ml
Etidyum Bromid	%1

<b><u>10X TBE Tamponu</u></b>	<b>gr/lt</b>
Tris Base	10,8 gr
Borik asit	5.5 gr
EDTA	0.95
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

<b><u>Yükleme Boyası:</u></b>	<b>gr/ml</b>
Bromfenol mavisi	0.25 gr
Sakkaroz	40 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml



**EK-2F**      **PCR ÜRÜNÜNÜN AGARUZ JELDEN PÜRİFİKASYONU :**

**Kullanılan kimyasallar :**

20 mM Tris (pH: 8)	2.5 hacim
1 m M EDTA	2.5 hacim
Fenol (pH:7- 8 )	1 hacim
Fenol/ Kloroform	1 hacim
Kloroform	1 hacim
3M Sodyum Asetat	1/10 hacim
% 70 Etanol	1 hacim

**EK-2G PCR ÜRÜNÜNÜN HindIII ve PvuII RESTRIKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİMİ:**

dH <sub>2</sub> O	16 µl
10X restriksiyon tamponu	2 µl
100X BSA	0.5 µl
PCR ürünü	4 µl
HindIII	0.5µl
PvuII	0.5µl

**Reaksiyonun durdurulması için kullanılan kimyasallar :**

20 µl 0.5 M NaCl

Hacmin iki katı Etanol

**EK-2H pBR322 PİLAZMİD VEKTÖRÜNÜN HindIII ve PvuII**  
**RESTRIKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİMİ:**

**Reaksiyon karışımı aşağıda sıraya göre hazırlanmıştır :**

dH <sub>2</sub> O	16 µl
10X restriksiyon tamponu	2 µl
100X BSA	0.5 µl
pBR322	2µl
HindIII	0.5µl
PvuII	0.5µl

**Reaksiyonun durdurulması için kullanılan kimyasallar :**

20 µl 0.5 M NaCl

Hacmin iki katı Etanol

**EK-2I**      **ALFA AMİLAZ GENİNİ İÇEREN PCR ÜRÜNÜNÜN AYNI**  
**ENZİMLER İLE KESİLEN pBR322'ye AKTARILMASI ve**  
**REKOMBİNANT PİLAZMİDİN OLUŞTURULMASI**

**Ligasyon :**

Enzimlerle kesilmiş PCR ürünü	5 µl
Enzimlerle kesilmiş pBR322	7 µl
10 X Ligasyon tamponu	10 µl
dH <sub>2</sub> O	10 µl
T4 DNA ligaz	2 µl

Karışım steril tüp içerisinde 24 saat 16°C'de bekletilmiştir.

**EK-2J**      **ALFA AMİLAZ GENİ TAŞIYAN REKOMBİNANT DNA**  
**MOLEKÜLÜNÜN *E.coli* DH $\alpha$  SUŞUNA CaCl<sub>2</sub> YÖNTEMİ**  
**KULLANILARAK AKTARILMASI**

**LB Sıvı besi yeri**

Tripton	10 gr
Yeast	5 gr
NaCl	10 gr
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**LB Katı besi yeri**

Tripton	10 gr
Yeast	5 gr
NaCl	10 gr
Agar	7 gr
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Antibiyotik ilave edilerek hazırlanan LB agar besi yeri**

LB sıvı besi yeri	500 ml
Agar	7 gr

Otoklavlandıktan sonra ısı 55°C'ye soğutularak içerisine 50 mg/ml olarak hazırlanmış antibiyotik olan Ampisillin ilave edilmiştir.

**1M CaCl<sub>2</sub>**

CaCl <sub>2</sub>	111 gr
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

0.22 $\mu$ m Filtre ile sterile edilir.

### **0.1M CaCl<sub>2</sub>**

1 M CaCl <sub>2</sub>	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

### **%15'lik Gliserol ve 0.1 M CaCl<sub>2</sub> karışımı hazırlanışı**

1 M CaCl <sub>2</sub>	100 ml
%50 Gliserol	300 ml
dH <sub>2</sub> O	600 ml

### **%50 Gliserol çözeltisi hazırlanışı**

Gliserol	50 ml
dH <sub>2</sub> O	100 ml

Karışım otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

### **%15'lik Gliserol çözeltisi hazırlanışı**

Gliserol	15 ml
dH <sub>2</sub> O	100 ml

Karışım otoklavlanarak sterilize edilmiştir

**EK-2K**

**PİLAZMİD DNA İZOLASYONU**

**Sakaroz tamponu (pH: 8.0)**

Tris	0.65 gr
EDTA	0.0372 gr
Sukroz	6.7 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**Tris EDTA solüsyon 1 (pH: 8.0)**

Tris	0.6 gr
EDTA	9.31 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**Tris EDTA solüsyon 2 (pH: 7.5)**

Tris	0.121 gr
EDTA	0.037 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**3N NaOH çözeltisi**

NaOH	1.2 gr
dH <sub>2</sub> O	10 ml

**Lizozim çözeltisi (pH: 8.0)**

Tris	0.3 gr
Lizozim	0.1 gr
dH <sub>2</sub> O	10 ml

**RNase çözeltisi**

RNase	5 mg
dH <sub>2</sub> O	5 ml

**Tris-HCl çözeltisi (pH: 7.0)**

Tris-HCl	31.5 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**SDS çözeltisi (pH: 8.0)**

Tris	0.6 gr
EDTA	0.74 gr
SDS	20 gr
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**%3'lük NaCl ile doyurulmuş Fenol çözeltisi**

Fenol	100 gr
NaCl	3 gr
dH <sub>2</sub> O	20 ml



## EK-3

### DNA ANALİZLERİ İÇİN KULLANILAN MARKIRLAR

❖ DNA supercoiled markır 16,210 bp-2067bp

(GIBCO)

#### DNA Ladder, Supercoiled

11 Supercoiled fragments, 2–16 kb

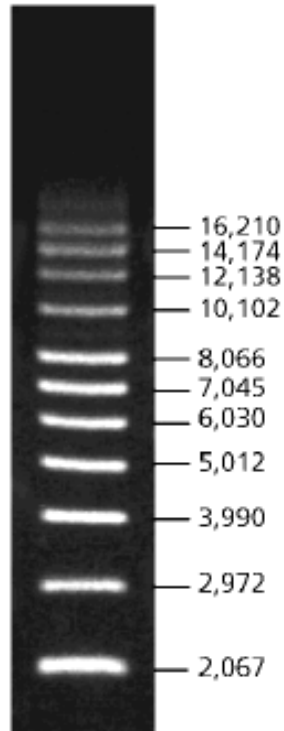
Product Number D5292

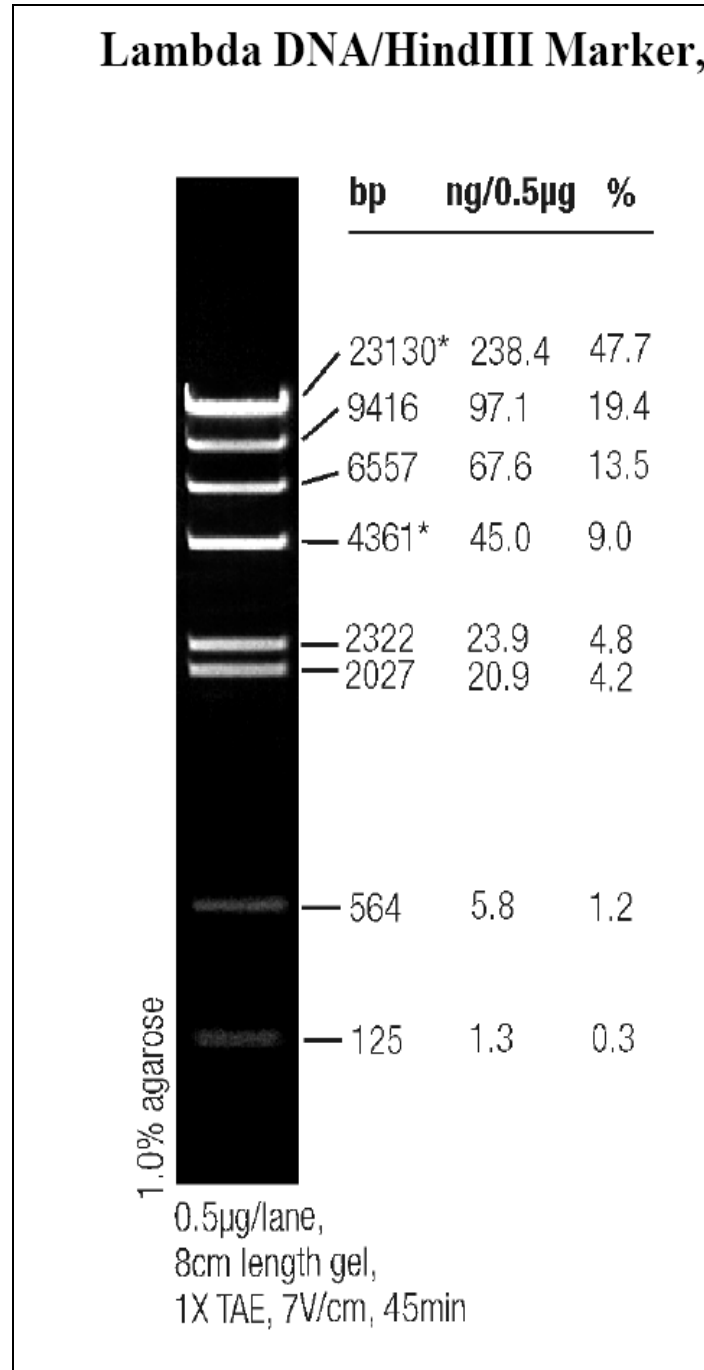
Storage Temperature -20 °C

#### Product Description

The Supercoiled DNA Ladder contains 11 supercoiled fragments (2,067–16,210 bp) and is suitable for use as an electrophoresis marker for supercoiled DNA.

#### Plasmid Sizes base pairs (bp)





## EK-4

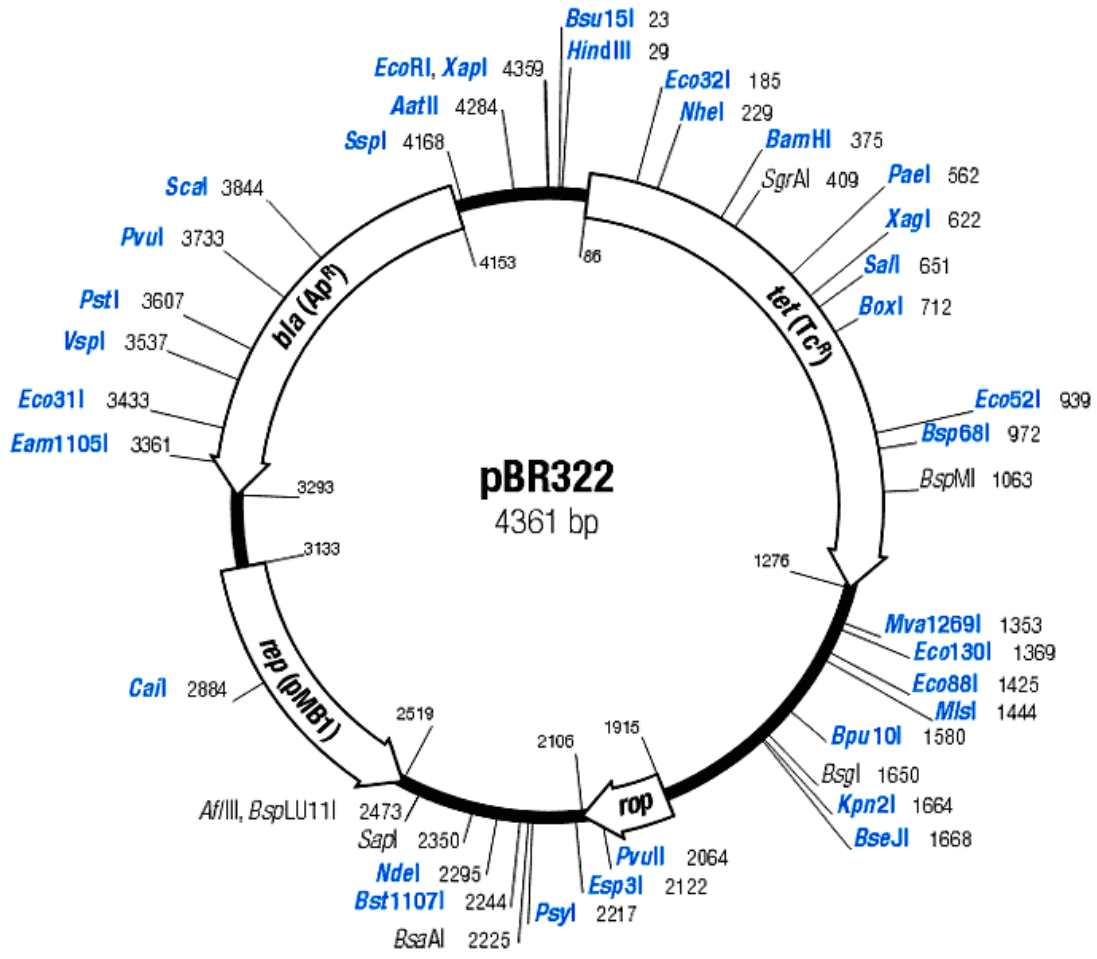
### KİMYASAL MADDELER

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MERCK
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MERCK
NaCl	PANREAC
NH <sub>4</sub> Cl	MERCK
MgSO <sub>4</sub>	MERCK
CaCl <sub>2</sub>	MERCK
Pepton	MERCK
Nişasta	MERCK
Beef Extract	DIFCO
Tripton	OXOID
Yeast extract	DIFCO
100 mg/ml Amphotericin	CALBIOCHEM
Glukoz	SIGMA
Bromtimol mavisi	MERCK
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MERCK
Kristal Violet	MERCK
Etanol	RIEDEL-deHAEN
Bazik Fuksin	MERCK
Metilen mavisi	MERCK
NaOH	MERCK
DNS	SIGMA
Tris	SIGMA
EDTA	MERCK
SDS	SIGMA
Kloroform	CARLOEBRA
İzomilalkol	MERCK
Fenol	MERCK

Izopropanol	MERCK
Butanol	MERCK
Asetik asit	MERCK
Gliserol	MERCK
Proteinaz K	MERCK
DNA supersarmal marker 16,210 bp-2067bp	SIGMA
Lamda DNA/ HindIII Marker 30 kb-100 bp	FERMENTAS
Agaroz	SIGMA
Etidyum Bromid	MERCK
Borik asit	MERCK
Sakkaroz	SIGMA
Lizozim	SIGMA
RNase	SIGMA
Tris-HCl	SIGMA
25 mM MgCl <sub>2</sub>	FERMENTAS
1.25 mM dNTP set	FERMENTAS
10 pmol/μl F primer	METIS BIYOTEK
10 pmol/μl R primer	METIS BIYOTEK
Taq DNA Polimeraz	FERMENTAS
100X BSA	SIGMA
HindIII ve 10X restriksiyon tamponu	SIGMA
PvuII ve 10X restriksiyon tamponu	FERMENTAS
pBR322	FERMENTAS
5 mM ATP	SIGMA
T4 DNA ligaz ve 10 X Ligasyon tamponu	FERMENTAS
0.22μm Membran Filtre	MILLIPORE

## EK-5

### pBR322 VEKTÖRÜNÜN FİZİKSEL HARİTASI



## EK-6

### *B. subtilis* 168|BG10473|amyE: 1980 bp - alpha-amylase

atgtttgcaaaacgattcaaaacctttactgccgttattcgctggattttattgctg  
ttcatttggtctggcaggaccggcggctgagtgctgaaacggcgaacaaatcgaat  
gagcttacagcaccgtcgatcaaaagcgaaccattctcatgcatggaattggtcgttc  
aatacgttaaacaacaatatgaaggatattcatgatgcaggatatacagcattcagaca  
tctccgattaaccaagtaaaggaagggatcaaggagataaaagcatgtcgaactggtac  
tggctgtatcagccgacatcgatcaaaattggcaaccgttacttaggtactgaacaagaa  
ttaaagaaatgtgtgcagccgctgaagaatatggcataaaggcattgttgacgcggtc  
atcaatcataccaccagtgattatgccgcatccaatgaggtaagagtattccaaac  
tggacacatggaacacacaaataaaaactggtctgatcgatgggatgtcacgcagaat  
tcattgctcgggctgtatgactggaatacacaatacacaagtacagtcctatctgaaa  
cggttcttagacagggcattgaatgacggggcagacggtttcgattgatgccgcaaaa  
catatagagctccagatgatggcagttacggcagtcattttggccgaatatcaaaat  
acatctgcagagttccaatacgggaaatcctgcaggatagtgctccagagatgctgca  
tatgcaattatatggatgtgacagcgttaactatgggcattccataaggtccgcttta  
aagaatcgtaatctgggctgtcgaatatctcccactatgcatctgatgtgtctgaggac  
aagctagtgcacatgggtagagtcgcatgatacgtatgccaatgatgatgaagagtcgaca  
tggatgagcagatgatatacctttaggctgggaggatagcttctcgttcaggcagt  
acgcctctttctttccagacctgagggaggcggaaatgggtgtgaggttcccggggaaa  
agccaaataggcagtcgcgggagtgctttattgaagatcaggctatcactgcggtcaat  
agatttcacaatgtgatggctggacagcctgaggaactctgaacccgaatggaacaac  
cagatattatgaatcagcgcggtcacatggcgttgctggcaaatgcaggtcatcc  
tctgtctctatcaatacggcaacaaaattgctgatggcaggtatgacaataaagctgga  
gcggttcattcaagtaacgatggtaaactgacaggcacgatcaatgccaggtctgta  
gctgtgctttatctgatgatattgcaaaagcgcctcatgtttcctgagaattacaaa  
acaggtgtaacacattcttcaatgatcaactgacgattaccttgcgtgcagatgccaat  
acaacaaaagccggttatcaaatcaataatggaccagacgacagggcgttaaggatggag  
atcaattcacaatcggaaggagatccaattggcaaacatacaccatcatgttaaaa  
ggaacgaacagtgatgggtaacgaggaccgagaaatacagttttgtaaaagagatcca  
gctcggcaaaaaccatcggtatcaaaatccgaatcattggagccaggtaaatgcttat  
atctataaacatgatgggagccgagtaattgaattgaccggatcttgctggaaaacca  
atgactaaaaatgcagacggaatttacacgctgacgctgcctgaggacacggatacaacc  
aacgcaaaagtgttttaataatggcagcggcaagtgcccggtcagaatcagcctggc  
ttgattacgtgctaaatggtttatataatgactcgggcttaagcgggtctcttcccat

## ÖZGEÇMİŞ

10.11.1978 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk öğrenimini Bahçelievler İlkokulu'nda, orta ve lise eğitimini Cumhuriyet lisesinde tamamladı. Lisans diplomasını 2002 yılında Ankara Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden aldı. Üniversite eğitiminden sonra bir yıl süre ile ASCELIK A.S.'de Dış ticaret ve proje şefi olarak çalıştı aynı şirketin sahibi olduğu Anatolya maden sularının Bolu Yeniçağa 'deki fabrikasının kalite kontrol laboratuvarını kurdu. 2003 yılında Öğrenimine Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans programına girerek devam etti. Lisans ve yüksek lisans öğrenimi suresince Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji A.B.D. İmmünoloji Laboratuvarı, 2002, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik A.B.D Sitogenetik Laboratuvarı, 2002, GATA Genetik A.B.D.Sitogenetik Laboratuvarı, 2004, The University of Texas Southwestern Medical Center Department of Pediatrics Division of Cardiology Department of Molecular Biology Dallas /TX, 2004, The University of Texas Southwestern Medical Center Department of Molecular Psychiatry Dallas /TX, 2004, AmeriPath Nort Texas Breast Cancer Prognostic Panel, Dallas /TX, 2004 gibi çeşitli yerlerde zorunlu olmayan stajlar yaptı.