



**ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI  
A. NİGER BETA GLUKANAZ ENZİMİNİN  
E. COLİ 'DE ÜRETİLMESİ  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**İSKENDER ŞAHİNGÖZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI  
Prof. Dr. İsa GÖKÇE  
Temmuz - 2019  
Her hakkı saklıdır**

T.C.  
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI  
*A. NİGER* BETA GLUKANAZ ENZİMİNİN  
*E. COLİ* 'DE ÜRETİLMESİ  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

İSKENDER ŞAHİNGÖZ

TOKAT  
Temmuz - 2019

Her hakkı saklıdır



**Bu tez çalışması;**

**TUBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik 2015-1 dönemi Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir.**

**İSKENDER ŞAHİNGÖZ** tarafından hazırlanan “Endüstriyel Kullanım Amaçlı *A. Niger* Beta Glukanaz Enziminin *E. Coli* 'de Üretilmesi, Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu” adlı yüksek lisans tez savunma sınavı **18 TEMMUZ 2019** tarihinde gerçekleştirilmiş olup aşağıda isimleri belirtilen Jüri üyelerince Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **BIYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Hayreddin GEZEĞEN

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

ONAY

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**İskender ŞAHİNGÖZ**

**18 Temmuz 2019**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI *A. NİGER* BETA GLUKANAZ ENZİMİNİN *E. COLİ* 'DE ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

İSKENDER ŞAHİNGÖZ

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSA GÖKÇE)

$\beta$  - glukanaaz enziminin yem endüstrisinde aktif olarak kullanılmasının sağlanması ile hayvanların yemden elde edecekleri verimlilik daha yüksek bir seviyeye ulaşacaktır.  $\beta$  - glukanaaz eldesi ile elde edilen yemden tüketen hayvanlardan elde edilecek olan verimde doğru orantılı olarak artacaktır. Ülkemizde hayvancılık faaliyetinin ekonomik açıdan büyük bir öneme sahip olması bu enzimin üretilme fikrinin ortaya çıkmasında büyük bir paya sahiptir. Bu çalışmayla  $\beta$  - glukanaaz enzimini kodlayan nükleotid dizisi *Escherichia coli* için kodon optimizasyonu gerçekleştirilerek pTOLT ve pET22b vektör sistemine klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant vektörlerle Origami hücreleri transforme edilmiş ve proteinin üretilmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Protein afinite kromatografisiyle saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin aktif olarak çalıştığı yapılan aktivite testi sonucu anlaşılmıştır. Sonuç olarak saf ürün halinde elde edilen  $\beta$  – glukanaaz enzimi ticari olarak kullanılabilir niteliktedir ve yem endüstrisinde kullanılarak verimliliği arttırıcı özelliğinden faydalanılabilir.

2019, 67 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER:  $\beta$ - Glukanaaz, Rekombinant Enzim, *E.Coli*

ABSTRACT

MASTER THESIS

**EKSPRESSION, PRUFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT  
A. NIGER BETA GLUCANASE ENZYME FOR INDUSTRIAL USING  
ISKENDER SAHINGOZ**

**GAZIOSMANPASA UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF BIOENGINEERING**

**(SUPERVISOR:) PROF. DR. İSA GÖKÇE**

The efficient use of  $\beta$  - glucanase in the feed industry will lead to a higher level of animal feed efficiency. It has been reported that after the addition of  $\beta$  - glucanase enzyme to the animal feed, the yield of the products to be obtained from these animals will increase proportionally. Due to the economic importance of the livestock sector in our country,  $\beta$  - glucanase has a great role in the idea of producing recombinant DNA technology. In this study, codon optimization was performed for the nucleotide sequence encoding  $\beta$  - glucanase enzyme (*E.coli*) to be produced in the bacterial expression system and cloning was performed on pTOLT and pET22b vector systems. Recombinant plasmids (pTOLT- $\beta$ -glucanase and pET22b- $\beta$ -glucanase) were transformed into Origami cells and protein was produced. Quantitative analysis of the recombinant enzyme was performed and the activity test of the purified enzyme was found to be active. As a result,  $\beta$  - glucanase enzyme obtained as pure product has been found to be commercially available and it can be benefited from its efficiency increasing feature in the feed industry.

2019, 53 PAGE

**KEYWORDS:** Beta Glucanase, Recombinant Enzyme, *E.Coli*

## ÖNSÖZ

Üniversite öğrenim hayatım boyunca üzerimde emeği bulunan ve bu süreçte benden hiçbir yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışma sürecim boyunca bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Duygu DÜZGÜN, Özlem KAPLAN ve Rizvan İMAMOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını TÜBİTAK 2210-C öncelikli alanlara yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2015-1 dönemi endüstri öncelikli alanları kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek mühendis seviyesine erişebilmem için her an destekçim olan hayat arkadaşım Yasemin KANBOLAT ŞAHİNGÖZ'e teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim annem Sadiye ŞAHİNGÖZ, babam Osman ŞAHİNGÖZ ve kardeşim Muhammed Alperen ŞAHİNGÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

**İskender ŞAHİNGÖZ**

**18 Temmuz 2019**



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<u>ÖZET....</u>	i
<u>ABSTRACT</u>	ii
<u>ÖNSÖZ</u>	iii
<u>İÇİNDEKİLER</u>	iv
<u>SİMGE VE KISALTMALARI</u>	vi
<u>ŞEKİL LİSTESİ</u>	viii
<u>ÇİZELGE LİSTESİ</u>	ix
<u>1. GİRİŞ</u>	1
<u>2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER</u>	2
<u>2.1. Enzimler</u>	2
<u>2.2. Glukanlar</u>	5
<u>2.3. <math>\beta</math> –Glukanaz Enziminin Kullanım Alanları</u>	8
<u>2.4. <math>\beta</math> –Glukanaz ile Yapılan Çalışmalar</u>	11
<u>2.5. Rekombinant DNA Teknolojisi</u>	14
<u>2.5.1. Rekombinant DNA Eldesi</u>	15
<u>3. MATERYAL VE YÖNTEM</u>	17
<u>3.1. Materyal</u>	17
<u>3.1.1. Kullanılan cihazlar</u>	17
<u>3.1.2. Kullanılan kimyasallar</u>	18
<u>3.1.3. Kullanılan çözeltiler</u>	18
<u>3.2. Yöntem</u>	24
<u>3.2.1. <math>\beta</math> –Glukanaz Geninin Vektörlere Klonlanması</u>	27
<u>3.2.2. Restriksiyon Enzimleri Kullanılarak Kesim İşlemi</u>	28
<u>3.2.3. DNA Ligasyonu</u>	30
<u>3.2.4. PİPES’li Kompetent Hücrelerin Hazırlanması</u>	31
<u>3.2.5. Transformasyon</u>	32
<u>3.2.6. Plazmit DNA Saflaştırması</u>	32
<u>3.2.7. Doğrulama restriksiyon kesimi</u>	33
<u>3.2.8. DNA Dizileme</u>	34
<u>3.2.9. <math>\beta</math>- Glukanaz Enziminin Üretilmesi(İndükleme)</u>	34
<u>3.2.9.1. FSB’li Kompetent Hücre Hazırlanması</u>	35
<u>3.2.10. E. coli BL21 pLysE hücrelerinin parçalanması</u>	36

<a href="#">3.2.11. Afinite kromatografi Yöntemi ile <math>\beta</math>- Glukanaz Enziminin Saf Elde Edilmesi</a>	36
<a href="#">3.2.12. <math>\beta</math>-Glukanaz Enziminde İnklüzyon Cisimciği Oluşmasının İndirgenmesi</a>	36
<a href="#">3.2.13. <math>\beta</math>-Glukanaz Enzimi İçin Refolding (Yeniden Katlama) İşlemi</a>	37
<a href="#">3.2.14. <math>\beta</math>-Glukanaz Enziminin Aktivite Tayini</a>	38
<a href="#">4. BULGULAR</a>	40
<a href="#">4.1. <math>\beta</math>- Glukanaz Geninin Vektörlere Klonlanması</a>	40
<a href="#">4.1.2. Restriksiyon enzimi ile kesim</a>	40
<a href="#">4.2. Doğrulama Restriksiyon Kesimi</a>	40
<a href="#">4.3. DNA Dizileme</a>	43
<a href="#">4.4. <math>\beta</math>- Glukanaz Enziminin Üretilmesi (İndükleme)</a>	45
<a href="#">4.5. <math>\beta</math>-Glukanaz Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması</a>	45
<a href="#">4.6. <math>\beta</math>- Glukanaz Enzimi İçin İnklüzyon Cisimciği Oluşumunun Azaltılması</a>	46
<a href="#">4.7. <math>\beta</math>- Glukanaz Enzimi için Refolding ve <math>\beta</math>- Glukanaz Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması</a>	47
<a href="#">4.8. <math>\beta</math>- Glukanaz Enziminin Aktivite Tayini</a>	47
<a href="#">5. TARTIŞMA VE SONUÇ</a>	49
<a href="#">6. KAYNAKLAR</a>	51
<a href="#">ÖZGEÇMİŞ</a>	53

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
Bç	baz çifti
$\mu$ l	mikro litre
$\mu$ M	mikro molar
M	Molar
mM	mili molar
nm	nano metre
P	Fosfat
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
Amp	Ampisilin
APS	Amonyumpersülfat
BSA	Sığır Serum Albümin
BAC	Bakteri yapay kromozomları
ddH <sub>2</sub> O	Çift distile edilmiş saf su (Double distilled water)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
DWV	Deforme kanat virüsü
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSB	Frozen Storage Buffer
IPTG	İzopropil $\beta$ -D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
PİPES	piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
SOB	Super Optimal Broth
TAE	Tris-asetat-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
YAC	Maya yapay kromozomları



## ŞEKİL LİSTESİ

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<a href="#">Şekil 2.1. <math>\beta</math>-glukanaz Enziminin Çalışma Mekanizması</a> .....	7
<a href="#">Şekil 2.2. A.niger <math>\beta</math>-glukanaz Enziminin 3 boyutlu yapısı</a> .....	7
<a href="#">Şekil 2.3. Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimlerin sınıflandırılması</a> .....	10
<a href="#">Şekil 2.4. Rekombinant DNA Eldesi</a> .....	14
<a href="#">Şekil 3.1.pTOLT vektörünün poli-linkerbölgesinin detaylı restriksiyon enzim bölgelerini içeren DNA dizisi</a> .....	24
<a href="#">Şekil 3.2.pET28a vektörü sisteminin dairesel yapısı ve poli-linker bölgesinin detaylı restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi</a> .....	25
<a href="#">Şekil 3.3.pET22b vektörünün dairesel haritası ve poli-linker bölgesinin detaylı restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi</a> .....	26
<a href="#">Şekil 3.4.Kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiş A.niger <math>\beta</math>-glukanaz enziminin DNA dizisi</a> .....	27
<a href="#">Şekil 3.5. <math>\beta</math>-Glukanaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan DNS yönteminin prensibi</a> .....	39
<a href="#">Şekil 4.1.Restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası agaroz jel görüntüsü</a> .....	40
<a href="#">Şekil 4.2.Doğrulama restriksiyon enzim kesimi sonucu agaroz jel görüntüsü (pET22b vektörü)</a> .....	41
<a href="#">Şekil 4.3. Doğrulama restriksiyon enzim kesim sonucu agaroz jel görüntüsü (pTOLT vektörü)</a> .....	42
<a href="#">Şekil 4.4. DNA dizileme sonucu</a> .....	42
<a href="#">Şekil 4.5.pTOLT vektör sisteminde elde edilen SDS-PAGE görüntüsü</a> .....	45
<a href="#">Şekil 4.6. Saflaştırma sonrası pTOLT vektör sisteminde elde edilen SDS-PAGE görüntüsü</a> .....	46
<a href="#">Şekil 4.7. Refolding sonrası yapılan saflaştırma işleminin SDS-PAGE görüntüsü</a> .....	47
<a href="#">Şekil 4.8.Enzim aktivitesi görüntüsü</a> .....	48

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<a href="#">Çizelge 2.1. Endüstriyel Alanda Kullanılan Bazı Enzimler.....</a>	4
<a href="#">Çizelge 2.2. Yemlerde Kullanılan Enzimler ve Etki Şekilleri .....</a>	10
<a href="#">Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar.....</a>	17
<a href="#">Çizelge 3.2. Tez çalışması Kapsamında kullanılan kimyasallar .....</a>	18
<a href="#">Çizelge 3.3.pTOLT vektör sisteminde kesim işlemi için gereken madde miktarları .....</a>	28
<a href="#">Çizelge 3.4. pET22b vektör sisteminde kesim işlemi için gereken madde miktarları....</a>	28
<a href="#">Çizelge 3.5.pTOLT vektör sisteminde gerçekleştirilecek olan ligasyon işlemi için gerekli madde miktarları .....</a>	28
<a href="#">Çizelge 3.6. pET22b vektör sisteminde gerçekleştirilecek olan ligasyon işlemi için gerekli madde miktarları .....</a>	30
<a href="#">Çizelge 3.7. pTOLT vektör sistemi için doğrulama kesimi işleminde gerekli olan madde miktarları .....</a>	30
<a href="#">Çizelge 3.8. pET28b vektör sistemi doğrulama kesimi için gereken madde miktarları..</a>	34
<a href="#">Çizelge 3.9. <math>\beta</math>-Glukanaz enzimi için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması .....</a>	37

## 1. GİRİŞ

Enzimler, protein yapıda olan ve hücrelerde farklı biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren moleküllerdir. Çok farklı amaçlar için kullanılabilen enzimlerin çok önemli metabolik görevleri bulunmaktadır, ve bu sebeple ekonomik hayatın içerisinde de yer almışlardır. Enzimler, geçmişten günümüze kadar sanayi ve endüstride birçok farklı işlemde kullanılmışlardır (Wiseman, 1987).

Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin neredeyse tamamı ile moleküler biyoloji ve tıp gibi bilimlerde kullanılan enzimler çoğunlukla mikroorganizma kaynaklı elde edilmeye çalışılmaktadır. Bu durumun en önemli sebebi ise mikroorganizma kökenli olan enzimlerin hayvansal veya bitkisel kökenli olan enzimlere nazaran aktivite seviyelerinin daha yüksek olmamasıdır. Ayrıca maliyet olarak ucuz olmaları, istenmeyen yan ürün oluşumunun olmaması, daha çok miktarda ürün elde edilebilmeleri ve daha fazla stabil olma özellikleriyle mikroorganizmalar enzim üretiminde proseslerinde daha fazla tercih edilmektedir. (Wiseman, 1987). Bu özelliklerinden dolayı mikroorganizma kaynaklı enzimlerin endüstriyel enzim olarak kullanımı giderek artmaktadır (Demain ve Solomon, 1981).

Enzimler moleküler biyoloji ve endüstri alanında genellikle; kağıt, ilaç, yem, tekstil, deri, gıda gibi birçok sanayi alanında kullanılmaktadır (Schomburg ve ark., 2013).

Mikroorganizma kaynaklı olarak üretimi gerçekleştirilen enzimlerin dünya çapında yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %21 diğer proteazlar, %10 renin, %25 alkalın proteaz, %3 lipaz, %18 amilaz, %3 tripsin, %10'luk kısmı ise analitik ve eczacılık tabanlı enzimlerden oluştuğu saptanmıştır (Rao ve ark. 1998).

Enzimlerin uygulama alanlarına göre dağılımları kontrol edildiğinde ise %15 inin hayvan yemi sektöründe, %29 unun gıda alanında, %56 sının ise genel teknik gibi çok farklı alanlarda önemli rollere sahip olduğu anlaşılmaktadır (Kirk ve ark., 2002; Schallmey ve ark., 2004) .

Bu tez çalışması  $\beta$  - glukanaaz enziminin rekombinant olarak üretilmesini, saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu kapsamaktadır. Bu çerçevede  $\beta$  - glukanaaz enziminin kodlanmasını sağlayan nükleotid dizisi *E. coli* için kodon optimizasyonu yapılarak pTOLT ve pET22b vektör sistemine klonlanmış, elde edilen rekombinant vektörler *Origami* hücrelerine transfer edilmiş ve proteinin ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Üretilen protein afinite kromatografisiyle saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin aktif olduğu aktivite testiyle

gösterilmiştir. Yapılan aktivite testi sonrasında aktif olarak çalıştığı anlaşılan  $\beta$  – glukanaaz enziminin yem endüstrisinde kullanılabilir olduğu bu sayede anlaşılmıştır.

## **2. KURAMSAL TEMELLER/KAYNAK ÖZETLERİ/ GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Enzimler**

Enzimler, biyolojik sistemler içerisindeki spesifik olarak gerçekleşen kimyasal reaksiyonları katalizleme yeteneğine sahip, proteinler olarak tanımlanmaktadır. Enzimlerin çok önemli ve birden fazla metabolik görevi bulunmaktadır (Wiseman, 1987). Enzimler, geçmişte ve günümüze kadar sanayide ve endüstride çeşitli işlemlerde kullanılmışlardır (Smith, 1996).

Enzimlerin kullanımı ile günümüzde üretim işlemlerindeki enerji maliyeti azaltılabilmekte, gıda ürünlerinin beslenme açısından kalitelerini yükseltebilmekte ve farklı uygulamalar ile yeni nesil ürünlerin üretilmesi sağlanabilmektedir (Minussi ve ark. 2002). Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin pazarı oranı gün geçtikçe artmaktadır. Bu pazarın büyümesindeki en önemli etkenler ise biyoteknolojik olarak kaydedilen ilerlemeler, üretim proseslerindeki gelişmeler sayesinde maddi olarak daha ucuz enzimlerin üretilmesi ve daha farklı yeni uygulama oluşmasıdır. Dünya nüfusunun giderek yükselmesi, buna karşılık olarak ise doğal kaynakların zamanla azalması nedeniyle enzim teknolojisinin endüstrinin farklı alanlarında ihtiyaç duyulan isteği karşılamakta ve bu istek günden güne artmaktadır. Bu durumun haricinde çevre etkenleri ve enerji fiyatlarında yüksek oluşu enzim kullanılmasını arttırmaktadır (Leisola ve ark. 2001). Ayrıca enzim kullanılarak gerçekleştirilen faaliyetlerin, rutin işlemlere kıyasla daha az miktarda dış atık meydana getirerek daha az kirliliğe neden olması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilmesi de enzimlerin kullanılmasını arttırmaktadır (Gümüsel, 2002).

Endüstriyel alanda üretimi ve kullanımı giderek önemli bir hale gelen enzimler, mikroorganizma kökenli olmalarının yanı sıra hayvansal veya bitkisel kökenli de olabilmektedir (John, 1987). Hayvansal ve bitkisel kökenli olarak elde edilen enzimler endüstriyel alandaki ihtiyacı karşılamak için yetersiz kalmaktadır. Bu ihtiyacın karşılanması için enzim üretimi özellikle mikrobiyal kaynaklardan üretilmeye yönelmiştir.(Rao ve ark. 1998). Bununla beraber, daha hızlı bir şekilde çoğalmaları, gelişme ortamlarının kontrolünün daha kolay olması gibi nedenlerle enzimlerin üretim işlemlerinde mikroorganizmalar daha çok tercih edilmektedir. (Rao ve ark. 1998).



Mikrobiyal enzimlerin bazıları hücre tarafından üretildikten sonra hücre dışına salgılanırlarken bazıları ise hücrenin içerisinde kalırlar. Endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu, hücre dışına salgılanan enzimlerdir. Hücre içerisine salgılanan enzimlerden faydalanabilmek için hücre parçalanmalı ve enzim molekülleri hücreden ayrılmalıdır. Ekstraselüler enzimlerin stabilitesi ve mikroorganizma kökenli elde edilen enzimlerin global çapta bir senelik tüketilme oranına bakıldığında %21 diğer proteazlar, %25 alkalın proteaz, %10 renin, %18 amilaz, %3 lipaz, %3 tripsin, %10 karbonhidrat parçalayan enzimler, geriye kalan kısım ise analitik ve eczacılık tabanlı enzimler olduğu anlaşılmıştır. (Rao ve ark. 1998) Endüstride sıklıkla kullanılan enzimler ve kullanım alanları Çizelge 2.1.'de verilmiştir (Li ve ark., 2012)



**Çizelge 2.1.** Endüstriyel Alanlarda Kullanılan Bazı Enzimler (Li ve ark., 2012)

Uygulama Alanı	Enzim	Teknik Faydaları
Kağıt Üretimi	Amilaz	Nişastayı parçalayarak vizkoziteyi azaltmaktadır
	Lipaz	Kâğıdın beyazlatılması işleminde kullanılır.
	Selüloz	Kâğıt yumuşaklığının sağlanması
	Mannaz	Kâğıt parlaklığını artırmak için kullanılır
	Lakkaz	Kağıdın beyazlatılması işleminde
	Beta Ksilinaz	Proses verimini artırmak için kullanılır
Tekstil Sanayisi	Amilaz	Kumaş üzerinde zararlı etki bırakmadan değişiklik yapma
	Selüloz	Kumaşa pürüzsüz ve parlak görünüm vermek için tüyleri ve mikrofiberleri çıkarma Kot üzerindeki indigo boyanın gevşetilmesi
	Pektinaz	Kumaşa pürüzsüz ve parlak görünüm vermek için tüyleri ve mikrofiberleri çıkarma
	Lakkaz, Gkukozoksidaz	Renksiz ağartma ajanı olarak
Deterjan Sanayisi	Proteaz	Kumaşlarda protein bazlı lekeleri hidrolize etmek için
	Lipaz	Yağ, soslar ve sert lekeler gibi yağlı lekelerin çıkarılmasında
	Amilaz	Nişasta kalıntılarının çıkarılmasında
	Selüloz	Renk parlaklığının artırılmasında
Süt Endüstrisi	Kimozin, Lipaz, Lizozim	Peynir Üretimi
	Beta-galaksidaz, Laktaz	Laktöz intoleransı bulunan hastalar için laktözsüz süt yapmak
Ekmeç Endüstrisi	Alfa Amilaz	Fermentasyonun hızlandırılması ve bayatlamının önlenmesi

	Proteazlar	Şekil almanın kolaylaştırılması ve reolojik özelliklerin iyileştirilmesi
Bira Üretimi	Amilazlar	Malt nişastasının maltoz ve dekstrinlerine dönüştürülmesi
	Proteazlar	Proteinlerin mayaların ihtiyaç duydukları amino asitlere kadar parçalanması
	Aminoglukozidaz	Amilopektindeki 1,6 bağlarını parçalayarak nişastanın tamamen fermente olması
	Naringinaz	Turunçgil sularındaki acılık maddesi olan naringinin uzaklaştırılması
Meyve Suyu Üretimi	Limonin dehidrogenaz	Turunçgil sularındaki acılık maddesi olan limonin uzaklaştırılması
	Lakkaz	Durultma (Fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması)
	Pektolitik Enzimler	Durultma, mayşe fermentasyonu, mayşe sıvılaştırma
	Selülazlar	Mayşe sıvılaştırılması, mayşe şekerleştirme
	$\alpha$ -amilaz	Durultma (Nişastanın Parçalanması)
	Arabanaz	Durultma (araban nedeniyle oluşan bulanıklığın giderilmesi)
	Oligomeraz, Hemiselülaz	Mayşe şekerlenmesi
		Likenan ve Likenazlar Ksilan ve Ksilanazlar Selülazlar

## 2.2. Glukanlar

Bakterilerin tarafından sentezlenen selülotik enzimler ekzo-  $\beta$ - 1,4 ve endo-  $\beta$ -1,4 glukanazlar olarak tanımlanmıştır (Bhat, 2000).

Glukanazlar ekzo veya endo glukanazlar olarak yada  $\beta$  -1,4 veya  $\beta$  -1,3 arası bağlara etki ederek glukani parçalarken, likenaz  $\beta$  -1,3 ve  $\beta$  -1,4 arasında oluşan bağları tek başına parçalayarak etki etmektedir. Endo glukanaz selülozda bulunan zincirin iç kısımlarında gelişi

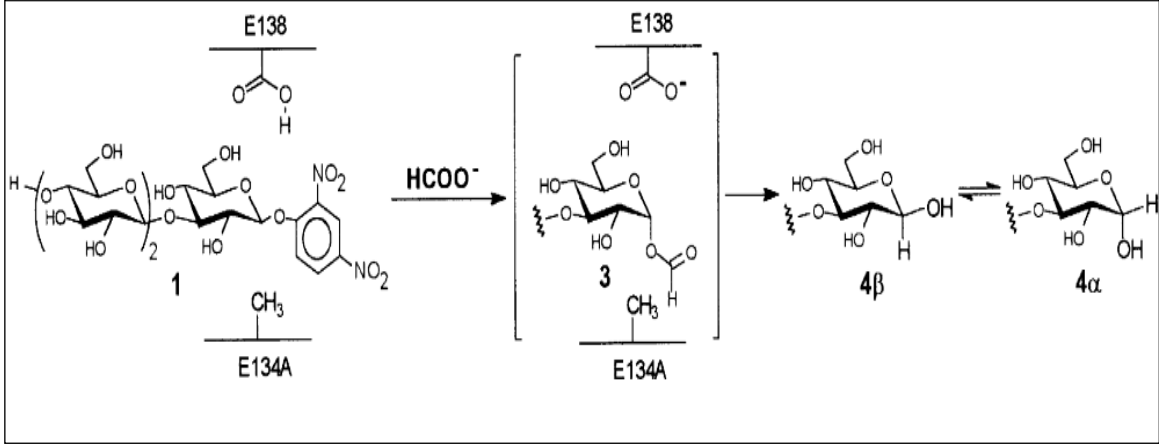
güzel hidroliz işlemini gerçekleştirir. Bu sayede farklı büyüklüklerde oligosakkaritlerin oluşumunu sağlarlar. Ekzoglukanazlar ise selülozda bulunan zincirin indirgenen ve indirgenmeyen kısımlarından başlayarak hidroliz işlemini gerçekleştirir. Bu sayede glukoz yada sellobiozu nihai ürün olarak ortaya çıkarır. Ekzoglukanazların mikrokristal selülozlar üzerinde etki gösterdiği bilinmektedir (Bhat, 2000).

Selülaz sistemleri çoğunlukla birden çok enzimden meydana gelmektedir ve üç temel enzim aktivitesi tipi vardır. Bunlar Sellobiyazlar(EC 3.2.1.21), Ekzoglukanazlar (EC3.2.1.74), Sellobiyohidrolazlar (EC 3.2.1.91) ve Endoglukanazlardır (EC 3.2.1.4).

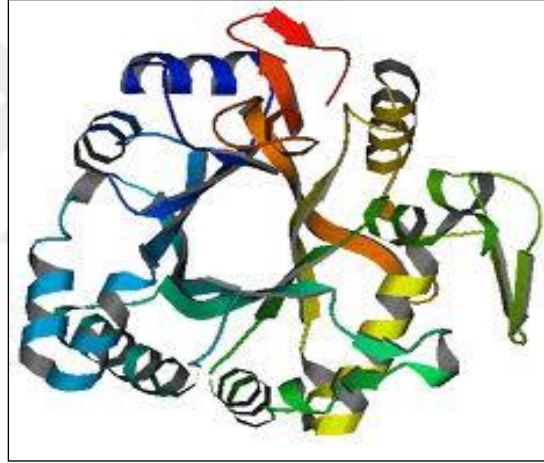
Endo-(1,3-1,4)-  $\beta$ - glukanaaz, arpa ve yulaf benzeri tahılların endosperm hücre duvarlarının oluşmasında büyük etki gösteren (1,3-1,4)- $\beta$ -glukanları hidrolize edebilmektedir.  $\beta$ - glukanaaz enziminin üretilmesi  $\beta$ . *amyloliquefaciens*,  $\beta$ . *subtilis*,  $\beta$ . *macerans* ve  $\beta$ . *licheniformis* gibi organizmalarda oldukça fazladır. Bu organizmalarında enzimin sentezlenmesinden sorumlu olan gen yapıları farklı organizmalara klonlanmışır (Liming ve Xueliang, 2004).

Endo-(1,3-1,4)-  $\beta$ - glukanaaz enzimi bira üretiminde malt enziminin yüksek verimde çalışması için etkin bir şekilde tercih edilmektedir. Termostabl  $\beta$ - glukanaazlar ise bira üretiminde kullanılan maltın kurutulma işlemi boyunca aktivitesini kaybetmediği için çoğunlukla tercih edilirler. Malt ile etkileşmiş arpanın ihtiva ettiği bakteri kökenli  $\beta$ -1,3-1,4-glukanazda etkili bir endüstriyel enzim olup genellikle ezilme işlemi sırasında akışkanlığı daha da indirmek amacıyla kullanılır. Hayvan yemiendüstrisinde, özellikle küçük domuz ve ızgaralık piliçlerde, bakteri kökenli  $\beta$ -1,3-1,4-glukanazlar ihtiva eden enzim preparatlarının ilavesiyle arpa kökenli beslenmenin sindirilme işlemi ilerletilebilir ve sağlık açısından sorunlar indirgenebilir (Zhang ve ark., 2006).

Gelecekte termofil özellikli ekstremofil mikroorganizmaların mikrobiyal fabrikalar şeklinde enzim üretim proseslerinde faaliyet gösterecekleri ve isimlerinin de bu şekilde anılacağı öngörülmektedir. (Niehaus ve ark., 1999).



Şekil 2.1. β -glukanaz Enziminin Çalışma Mekanizması (Viladot. J.L., ve ark 2001)



Şekil 2.2. *A. niger* β-glukanaz Enziminin 3 Boyutlu Yapısı (Anonim, 2014a)

### 2.3. $\beta$ -Glukanaz Enziminin Kullanım Alanları

$\beta$ -glukanaz enzimi yem sanayi, gıda endüstrisi, tekstil endüstrisi gibi çeşitli alanlarda farklı amaçlarla kullanılmaktadır.

#### Yem Sanayisinde

Besicilik işlemlerinde kullanılan yemlere enzim ilavesi ile ilgili ilk faaliyet Finlandiya'da 1980 yılında gerçekleştirilmiştir.  $\beta$ -glukanaz enziminin tavukların tükettiği yeme eklenmesiyle birlikte, tavukçuluk sektörü içerisinde enzimlerin katkı maddesi olarak kullanılması işlemi çok ciddi boyutlara taşınmıştır. Domuz yemlerine yem katkı maddesi olarak enzim eklenmesi bu faaliyeti takip etmiştir. Ruminantlar ise enzimlerin yemlere katılması işleminin diğer sektörler nazaran daha az miktarda gerçekleştirildiği sektördür. Hayvan yemi pazarının çok büyük olduğu göz önüne alındığında bahse konu enzimlerin çok ciddi büyüklükte bir pazar içerisinde olduğu ortaya çıkmaktadır. Tek mideye sahip hayvanlar kullandığı yemlerde enzim katılması işleminde şuan için yaklaşık olarak %10'luk bir uygulama vardır (Wolfgang, 2004).

Hayvan yemi endüstrisinde özellikle tavuk üretimi faaliyetlerinin giderek gelişmesine paralel olarak gereken yem ihtiyacı da ciddi seviyelere çıkmıştır. Piliç yemlerinin üretilmesinde anamaddede çoğunlukla mısırdır bunun yanı sıra arpa, buğday ve çavdar da tercih edilmektedir. Son zamanlarda biyoetanol üretimi de biyoteknolojik çalışmalarda çok hızlı ivme kazanmıştır. Bu üretim prosesinde ana madde olarak mısır çoğunlukla tercih edilmektedir. Bu durum mısır fiyatlarını arttırmış olup, bunun yanı sıra yem fiyatlarının da aynı oranda yükselmesine sebebiyet vermiştir. (Wolfgang, 2004).

Mısıra alternatif olarak yem ham maddesi olarak kullanılabilir olan arpada son zamanlarda ön plana çıkmaktadır. Piliçlerde arpanın ihtiva ettiği  $\beta$ -glukanı parçalayabilecek olan enzimatik sistem tam anlamıyla gelişmediğinden dolayı yem üretiminde enzim kullanımı kaçınılmaz olmuştur. Bu konuda özellikle glukanaz ve ksilanaz ön plana çıkmaktadır (Wolfgang, 2004).

$\beta$ -glukan molekülü lineer bir şekilde birbirine bağlanmış olan  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikoz birimlerinden meydana gelmektedir. Likenaz ise bu bağların her ikisini de kopartacak şekilde çalışmaktadır. Bakteriler arasında ekstraselüler selüloolitik aktivitesi olan organizmalar *Bacillus* sp. *Cellulomonas* sp., ve *Thermoactinomyces* sp. organizmalarıdır. Mantarlarda selüloz üreticisi olarak en başta *Trichoderma reesei* organizması gelmektedir. Arpanın yaklaşık %3-4'lük kısmı  $\beta$ -glukandan içermektedir. Tavuk ve domuzlar tarafından

sindirilemeyen  $\beta$ -glukan sindirim sistemi içerisinde viskoz bir yapı oluşur. Dolayısıyla oluşan dışkı daha yoğun bir kıvam alır(Wolfgang, 2004).

- **Gıda endüstrisinde;**

- Kuru sebze ve çorbaların karışımının tekrar sıvılaştırılmasının artırılması,
- Tohumlar kullanılarak yağ ve meyve suyu ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi,
- Meyvelerden elde edilen sularının berraklaştırılması,
- Tahıllar tarafından suyun homojen bir şekilde çekilmesinin sağlanması ve uygun derecede ıslanmasının sağlanmasında,
- Kokonat ve soya fasulyesinden protein izolasyonun gerçekleştirilmesi,
- Mısır ve tatlı patatesten nişasta üretilmesi,
- Selüloz temelli atık maddelerden çözümlü halde şeker, selooliosakkarit ve glikoz üretilmesi,
- Biyoetanol üretilmesi için gerekli substratın elde edilmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır.

Ayrıca polisakkarit, enzim, protein ve tatlandırıcı maddelerin oluşmasını kolaylaştırmak için bitkilerin hücrelerinin duvarlarının parçalanmasında kullanım alanı bulmuştur (Bhat ve Bhat, 1997).

- **Tekstil endüstrisinde;**

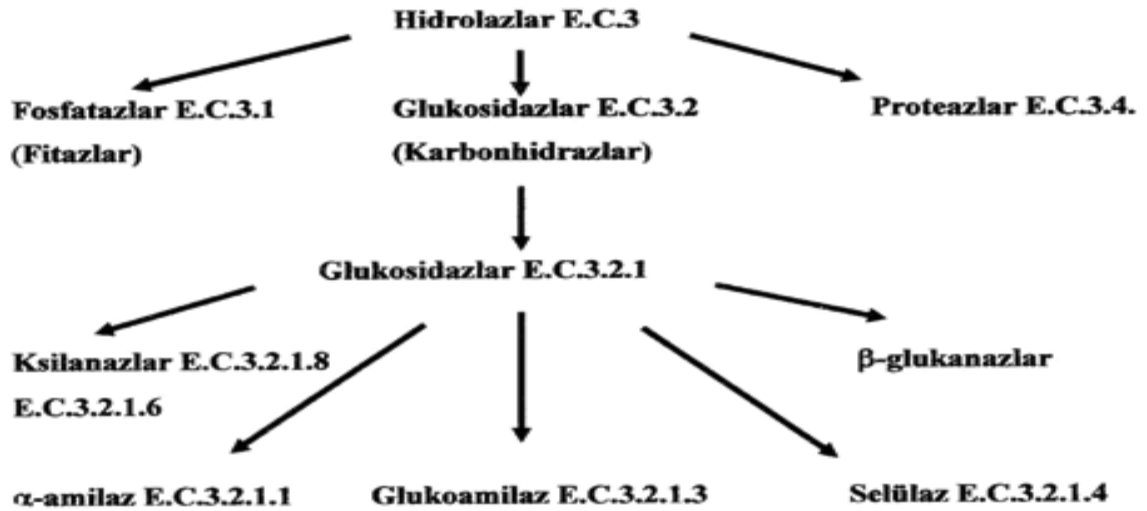
- Pamuk ya da pamuklu kumaşların yıkanmasında,
- Kumaşların renklerindeki parlaklığın artırılması ve yumuşak olmalarının sağlanmasında,
- Kumaşlarda bulunan ekstra boyar maddelerin uzaklaştırılmasında,
- Fazla yıkama sonucunda pamuk olan kumaşlardan çıkan mikrofibrillerin giderilmesinde kullanılır (Bhat ve Bhat, 1997).

Hayvan yetiştirmede verimi iki önemli faktör etkiler. İlki hayvanın genetik yapısı ikincisi ise hayvanın yaşamış olduğu çevresel faktörlerdir. Çevresel faktörler düşünüldüğünde en önemli faktör hayvanın beslenmesidir. Beslenme düzeni ve yeterliliği hayvandan alınacak olan verimi maksimum seviyeye çıkarır. Yemlerin kimyasal yapısı incelendiği zaman bu yapı içerisinde hayvanların yaşamlarını devam ettirebilmesi, üreme faaliyetlerini gerçekleştirmeleri ve bir ürün üretebilmeleri için ihtiyaç duydukları besin maddelerinin yapılarının, hayvan metabolizması içerisindeki faaliyetlerinin ve biyolojik anlamda fonksiyonlarının bilinmesinin yanı sıra bu besin maddelerinin her birinden, beslenmesi gerçekleştirilen hayvanın yaş,

cinsiyet, ırk, canlı ağırlık ve verim gibi fizyolojik durumuna bağlı olarak ne kadar verileceğininde yem üreticileri tarafından belirlenmesi ve belirtilmesi de zorunludur.

**Çizelge 2.2.** Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler ve bu enzimlerin metabolizma içerisindeki etki etme şekilleri (Çiftçi, 2001)

Enzim	Substrat	Fonksiyonu	Yararları ve kullanımı
Ksilanaz	Buğday, çavdar, tritikale ve pirinç kepeğinde bulunan arabinoksilan veya pentozanlar	Viskozitenin düşmesi ve diğer etkiler	-İnce bağırsak viskozitesinde düşme -Sindirim ve besin maddelerinden yararlanmanın artması
$\beta$ -Glukanaz	Arpa ve yulafıta bulunan $\beta$ -glukanlar	Viskozitenin düşmesi	-İnce bağırsak viskozitesinde düşme -Sindirim ve besin maddelerinden yararlanmanın artması -Altık karakteristiklerinde iyileşme -Kırlı yumurta problemlerinde azalma
Pektinazlar	Protein kaynaklarında bulunan pektinler	Viskozitenin düşmesi	-İnce bağırsak viskozitesinde düşme
Selülozlar	Selüloz	Selülozun parçalanması	-Selülozun parçalanması sonucu daha fazla besin maddesinin serbest hale geçmesi
Proteazlar	Proteinler	Proteinlerin hidrolizi	-Endojen enzimlere takviye ve daha etkin parçalanma sonucunda proteinlerin sindiriminde artış
Amilazlar	Nişasta	Niştastanın hidrolizi	-Özellikle genç hayvanlarda endojen enzimlere takviye ve daha etkin parçalanma sonucunda niştastanın sindiriminde artış
Lipaz	Doymuş yağlar	Yağların hidrolizi	-Özellikle genç hayvanlarda doymuş yağ asitlerinden ve serbest yağ asitlerinden yararlanma
Fitaz	Bitkisel yem hammaddelerinde bulunan fitik asit	Fitat fosforundan fosforun serbest hale geçmesi	-Bitki fosforundan yararlanmada artış ve dışkı inorganik fosforunda düşme -Fitik asidin anti besinsel etkisinin ortadan kalkması



**Şekil 2.3.** Yem Endüstrisinde Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Enzimlerin Sınıflandırılması (Nir ve Şenköylü, 2000).



## 2.4. $\beta$ -Glukanaz ile Yapılan Çalışmalar

1994 senesinde Taberner ve arkadaşları, alkalifilik *Bacillus sp.* N137'den alkalik endo-  $\beta$  -(1,3-1,4)-glukanaz enziminin kodlanmasını sağlayan *bgaA* geninin izolsayonunu gerçekleştirmiş ve yine kendi promotörünü kullanarak *E. coli*'ye klonlama işlemini yapmışlardır. Bu sayede 1.416 baz çiftinden meydana gelen DNA'nın nükleotid dizilişini ortaya çıkarmışlardır. Bu gen tarafından kodlanan likenaz enzimi optimum aktiviteyi pH 6.0-12.0 arasında gösterdiği, optimum sıcaklığının ise 60 - 70 °C arasında olduğunu yapılan çalışmalar sonucunda ortaya koymuşlardır.

1997 senesinde İkinci ve arkadaşları *S. bovis* JB1'in organizması tarafından  $\beta$  -(1,3-1,4)-glukan enziminin hidrolizini gerçekleştiren 25 kDa'lık bir enzim ürettiğini saptamışlardır. Bu enzimi kodlayan genin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Sonrasında izolasyonunu gerçekleştirdikleri bu geni plazmid vektör olarak kullandıkları pTRW10 ve pIL253 kullanarak tekrardan *S. bovis* JB1 organizmasına aktarma işlemini gerçekleştirmişlerdir. Bu işlemin ardından rekombinant olarak elde ettikleri *S. bovis*'in süpernatant kısmındaki  $\beta$  glukan enziminin aktifliğinin dört ila on kata kadar arttığını belirlemişlerdir.

2002 senesinde Aşan tarafından yapılan çalışmada, *S. bovis* JB1'e ait karışık bağlı  $\beta$  -glukanaz geninin *E.coli-Streptococcus sp.* mekik vektörü pTRW10'da klonlanması sonucu elde edilen TL1R vektör sistemini, *S. thermophilus* FI8976 ve *L. lactis* IL1403 suşlarına elektro transformasyon işlemi ile aktararak enzimin belirtilen bakterilerce üretilmesini sağlamıştır. Likenaz enziminin SDS-PAGE sonucu jellerinin incelenmesi sonrasında 26 kDa'lık çalışılan bu enzim proteininin kullanılan hiçbir proteaz tarafından parçalanmadığını rapor etmiştir.

Kim (2003), yapmış olduğu çalışmada *B. Circulans* organizmasının rekombinant pLL200K plazmidinde bulunan, endo-  $\beta$  -(1,3-1,4)-glukanaz'ın sentezlenmesini sağlayan geni mekik vektör sistemi olan pLLS920'ye transferini gerçekleştirmiştir. Bu işlemi bahse konu enzimin *B. subtilis* RM125 ve *B. megaterium* ATCC14945'te üretilmesini sağlamak için yapmıştır. Bu çalışmada çoğalma sürecinde enzimin maksimum düzeyde aktif olduğu saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda *B. circulans*'a nazaran *B. subtilis* tarafından üretilen enzimin 83 kat, *B. megaterium* tarafından üretilen enzimini ise 7 misli daha fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kim yaptığı çalışmada *E. Coli*'nin sentezlediği enzimin % 10'unu besi yerine salgıladığını, *B. Subtilis*'in tamamını ve *B. Megaterium*'un ise yaklaşık % 98'ini besi yerine salgıladığını saptamıştır.

2005 yılında Akita ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *B. halodurans* C-125 organizmasının genomunda endo-  $\beta$  -(1,3-1,4)-D-glukanaz enziminin kodlanmasını sağlayan genin bulunduğunu saptamışlardır. Genin 231 amino asiti kodladığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca enzimin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 26743 Da olduğunu düşünmektedirler. Enzimin aminoasit dizilişinin belirlenmesinin ardından *B. subtilis*'in endo- $\beta$ -1,3-1,4-glukanaz enzimi ile yalnızca % 28 oranında benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar,  $\beta$ -glukanı substrat olarak kullandıkları zaman enzimin optimum sıcaklığının ise 60 °C ve pH'sının 6.0-8.0 değerleri arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Kitamura ve Kamei (2006), yapmış oldukları çalışmada bir deniz bakterisi olan *Pseudomonas* sp. PE2'den  $\beta$ -1,3(4)-glukanaz A (*GluA*) genini klonlamışlardır. Ayrıca bu gene ait baz sırasını da saptamışlardır. *Pseudomonas* sp. PE2'den rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilen enzimi, *Phytium porphyrae*'nin hücre duvarının parçalanması işleminde etki gösteren iki diğer rekombinant enzimle (kitinaz A ve  $\beta$ -1,3-glukanaz) karşılaştırmasını yapmışlardır. *GluA* 'nın, hücre duvarını en iyi parçalayan enzim olduğunu ve *P. porphyrae*'nin hücre duvarının parçalanmasında önemli bir rolü olduğunu saptamışlardır.

Teng ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) adlı organizmadan  $\beta$ -(1,3-1,4)-glukanaz enzimini içeren genini pET28a isimli vektör aracılığıyla *E.coli* BL21(DE3) suşuna klonlamışlardır. Rekombinat olarak üretilen bu enzimin tahmini moleküler ağırlığının 28 kDa olduğunu bulmuşlardır. Enzimin çalıştığı optimum sıcaklığın 40 °C ve aynı şekilde optimum çalıştığı pH'nın ise 5.6 olduğunu saptamışlardır. Yapılan bu çalışmada üretimi gerçekleştirilen rekombinant enzimin 70 °C'de 10 dakika boyunca çalışması sonucunda aktivitesinin hala % 50'sini korumasından dolayı endüstriyel alanda kullanılması için yüksek oranda termostabiliteye sahip olduğu saptanmıştır.

Aşan ve Özcan (2007), yapmış oldukları çalışmada kanatlı hayvanlar tarafından kullanılması amacıyla rekombinant bir probiyotik üretmek ve aynı zamanda likenaz enziminin termostabilite seviyesini yükseltmek amacıyla  $\beta$ -(1,3-1,4)-glukanaz enzimini kodlayan geni taşıyan TL1R plazmidini *S. salivarius* subsp. *thermophilus* adlı bakterisine elektroporasyon işlemi ile aktarımını yapmış ve sonuç olarak likenaz geninin bu bakteri tarafından eksprese edilmesini sağlamışlardır. Bakteri tarafından ekspresyonu sağlanan  $\beta$ -(1,3-1,4)-glukanaz enziminin yüksek sıcaklıklara karşı olan dayanım gücünün yükseldiği ve 70 °C sıcaklıkta 15 dakika boyunca aktif olarak yaşayabildiğini ortaya koymuşlardır. Bu durumun tersine *E. coli* ve *L. lactis* hücreleri tarafından üretilen likenaz enziminin aktivitesi aynı sıcaklık derecesinde kolaylıkla kaybolmuştur. Farklı organizmalar tarafından üretilen her 3

enzimde denatüre olmaya karşı dirençli bir formda olup 37-100 °C'de aralığında 15 dakika sonrasında çözünür halde kalabilmiştir. Bu sayede likenaz enziminin üretilmesini sağlayan *S. salivarius* subsp. *thermophilus* bakterisi kanatlı hayvanların bağırsaklarında faal olamasa bile arpa kaynaklı olan yemlere katıldığında canlılıklarını koruyabileceklerdir.

Qiao ve ark.(2009), yapmış oldukları çalışmada *Bacillus subtilis* MA 139'dan PCR tekniğini ile  $\beta$ -(1,3-1,4)-glukanaz geninin klonlanmasını sağlamışlardır. Bu geni *E.coli* BL21'e pET28a vektörünü kullanarak aktarmışlardır. Sentezlenen bu enzimin optimum çalışabildiği sıcaklık değeri 40°C ve optimum çalışabildiği pH değeri ise 6.4 olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesinin sağlanabilmesi için EDTA iyonunun yanı sıra bir dizi metal iyonu eklemesi yapıldığını bildirmişlerdir.

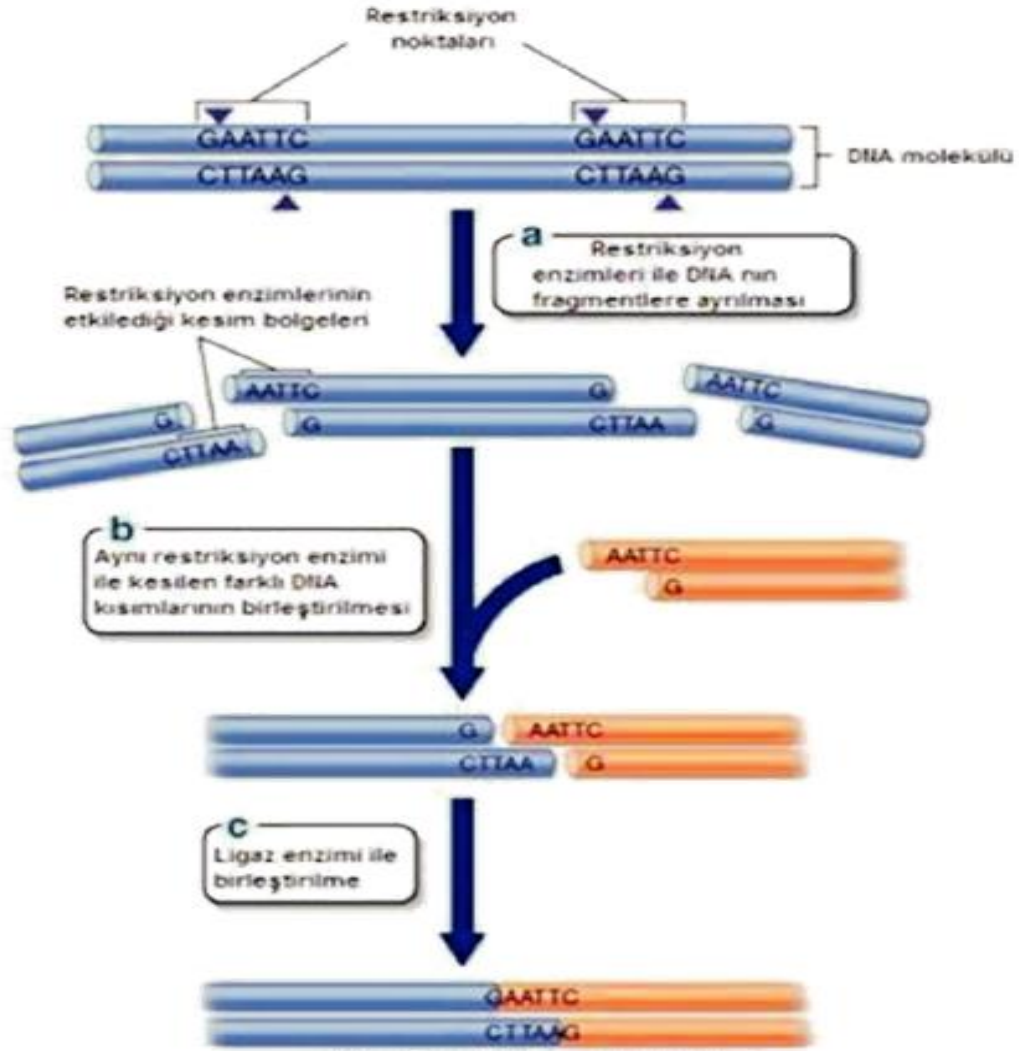
Furtado ve ark. (2011), yapmış oldukları çalışmada *Bacillus subtilis* 168'den  $\beta$ -(1,3-1,4)-glukanaz geninin izolasyonunu yaparak *E.coli*'ye aktarmışlardır. Bu işlemlerin sonucunda üretilen enzimin aktivitesini gösterebildiği optimum değerlerin 50 °C ve pH: 6.0 olduğunu saptamışlardır. Enzimin yarılanma ömrünün ise 60 °C'de ve  $Ca^{+2}$  iyonun varlığında 90 dakika sürerken  $Ca^{+2}$  iyonunun yokluğunda 5 dakika sürdüğünü saptamışlardır.

Chaari ve ark.(2012), yapmış oldukları çalışmada *Bacillus licheniformis* UEB CF'den EG1 ve EG2 isimli iki farklı  $\beta$ -(1,3-1,4)-glukanaz enziminin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu enzimlerin SDS-PAGE analizi sonucunda belirlenen moleküler ağırlıkları ise yaklaşık sırasıyla 30 kDa ve 55 kDa olduğunu saptamışlardır. EG1' in optimum çalışma pH'sı 5.0 ve optimum çalışma sıcaklığı da 70 °C iken EG2 için değişen bu değerler sırayla pH 7.0 ve 60 °C'dir. Her iki endoglukanaz enzimlerinin likenana ve arpa  $\beta$ -glukanına karşı oldukça aktif özellik gösterirken, CMC ve laminarine karşı ise inaktiftir özellik göstermediklerini saptamışlardır. (Sarıtürk,2012).

## 2.5. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisinin hızlı bir şekilde gelişmesi araştırmacılara gen aktivite seviyelerinin belirlenmesi için farklı çalışmalar yapma fırsatını sunmuştur. Bu durumun yanı sıra genetik mühendisliği gibi alanlarda sürdürülen araştırmalarda, gen aktarımı alanında kullanılan teknolojinin kıymeti günden güne artmaktadır. Çiftlikte üretimi gerçekleştirilen hayvanlara gen transfer işlemi; yavrulama sayılarının artırılması, temin edilen süt miktarının artırılması, yemi tüketerek elde edecekleri verim ve hastalıklara karşı sergileyecekleri direncin artırılması için gerçekleştirilmektedir. Bir diğer önemli amaç ise organ transferinde transgenik hayvanların kullanılabilir hale getirilmesinin amaçlanmasıdır.

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaya başlandığı ilk zamanlar sadece gen yapılarının organizasyonu, düzenlenmesi ve mutasyonlar gibi, akademik temelli çalışmalarda yapılan araştırmaların aydınlatılması için gerçekleştirilirdi. Bilim insanları, rekombinant DNA teknolojisini zaman içerisinde endüstriyel alanlarda da kullanmaya başlayarak günümüzde biyoteknoloji bilimi ışığında tıp alanında, kozmetik alanında ve tarımsal faaliyetler gibi farklı alanlarda ekonomiye yüklü miktarda katkı sağlayacak olan önemli bir alan oluşturmuşlardır.



Şekil 2.4. Rekombinant DNA Eldesi (Fridin, 2010).

### 2.5.1. Rekombinant DNA Eldesi

Rekombinant DNA teknolojisinde gen klonlama işlemi temel olarak 4 basamakta gerçekleşmektedir. Genin klonlanma işlemi ise şu şekilde söylenebilir: Hedef olarak belirlenen ve ticari veya araştırma anlamında önemli bir ürünün elde edilmesini sağlayacak olan DNA bölgesinin dışarıdan belirlenmiş olan bir vektör sistemine aktararak bu özel konak hücrelerin içerisinde birden fazla sayıda kopyasının elde edilme işlemidir.

#### Gen izolasyon işlemi

- a) Hedef olarak belirlenen genin mRNA'sı kullanılarak buna komplementer DNA (cDNA) elde edilerek gerçekleştirilebilir,
- b) Gen kütüphanelerinden Elde etme: Elde edilmesi planlanan genin etiketli bir kopyası ya da etiketli mRNA'sı mevcut ise tüm genom içerisinde istenilen geni bulunduran klonlar arasından elde edilmeye çalışılan genin bulunduğu klon bulunarak, bu klondan fazlaca miktarda elde edilmeye çalışılan genin izolasyon işlemi gerçekleştirilebilir.

#### Uygun gen taşıma aracı (Vektör)

a) Plazmitler: Gen taşıma vektörü olarak kullanılan plazmitler *E.coli*'de çoklu kopyalar halinde bulunan 2kb-200kb büyüklüğünde romozomdan bağımsız olarak duran dairesel yapıda molüküllerdir. Sıklıkla tercih edilen pBR322 isimli plazmit farklı antibiyotiklere karşı direnç gösteren bölgeler içermektedir. Bu plazmit birden fazla kesim enzimi için sadece bir tane kesim yeri bulundurup, 6000 bp büyüklüğüne kadar yabancı DNA'ları taşıyabilir.

b) Virüsler: 1978 senesinde gerçekleştirilen Asimolar konferansında tehlike olarak en düşük olan ve en çok incelenmesi gerçekleştirilen  $\lambda$ -fajı virüsünü kullanılmaya karar kılınmıştır.  $\lambda$  virüsünün DNA yapısı 49 kb büyüklüğünde çift iplikli yapıda bir moleküldür. Her iki uç kısmında birbirine komplementer olan 12 nükleotit içeren tek iplikli zincirler bulunmaktadır. Tek iplikli zincir içeren bu uç kısımlara "cos" (cohesive = yapışkan) uçlar ismi verilmiştir. İnfekte olmuş haldeki hücre DNA'ları cos olarak adlandırılan uç kısımlarından birbirine bağlı halde bulunan DNA zincirleri şeklinde üretilir ve sonrasında faj iplikleri şeklinde paketlenirler.

c) Cosmidler: Bu yapılar plazmit ve faj yapılarının özelliklerini bünyesinde barındıran melez bir vektör çeşididir. 35000 - 45 000 bp büyüklüğünde DNA parçalarının klonlaması işleminde tercih edilebilir.  $\lambda$  fajının paketlenmesini sağlayan enzimlerin "cos" uçlarını tanıması tercih edilmesinde önemli bir etkidir.  $\lambda$  fajının "cos" uçları örnek olarak

pBR322'nin tetr geninin içerisine klonlanır. Ampr geni ise bozulmadan durur. Yabancı olan DNA biraz daha büyük olan parçalara ayrılıp her birisi “cos” bölgesi plazmitler ile birleştirilir. Daha sonra bakterilerin ekimi yapılarak ampisiline karşı dirençli, tetrasikline karşı duyarlı olan kısımları seçilir.

d) Ekspresyon vektörleri: Bu vektör sistemi dışarıdan alınan genin eklenmesinin yapılacağı bölgenin ön kısmında promoter bölge bulunduran yapay plazmit sistemleridir. Klonlama işlemi gerçekleştirilen genin ürünü olan proteinin sentezlenmesi istenirse ekspresyon vektörü olarak kullanılabilir.

### **Genin hücreye sokulması**

- a) Plasmid veya virüs yapılar kullanılabilir,
- b) Kimyasal yöntemle:  $Ca^{2+}(PO_4)_2$  ile DNA tuzaklanarak spesifik bir ortamda,
- c) Fiziksel yöntem: Mikropipetler yardımıyla (uçları 0,1 - 0,5 mikron olmalı) DNA aktarımı yapılabilir. Bu yöntem kullanılarak DNA parçası farklı bir hücrenin içerisine direkt aktarılabilir.

d)Füzyon Tekniği ile: Lipozomlar ya da içerisinde bulunan proteinler ve hemoglobininin boşaltıldığı fakat bütünlüğü bozunmadan korunan eritrositeler yardımıyla gerçekleştirilen yöntemdir. Bu yöntemde DNA eritilerek transfer edilir.

### **Geni içeren hücrenin seçimi**

- a)Antibiyotiğe karşı direnç , b)Seçici olarak geliştirilen ortamlar
- Yabancı geni ihtiva eden hücre yapısı belirlendikten sonra uygun koşullar sağlanarak uzun bir süre korunabilir veya istenildiği zaman bahse konu genin üretilmesi için kullanılabilir. Günümüzde farklı açılardan değerli kabul edilen proteinleri kodlayan genler (insülin, büyüme hormonu vb.) ekspresyon vektör sistemlerine klonlanmışlardır. Hatta bu işi ticari amaçlı yapan farklı firmalardan tedarik edilmesi de mümkündür.

Rekombinant DNA teknolojisinin uygulama alanları genellikle genetik mühendisliği ve biyoteknoloji gibi alanlar olmuştur. Dünya üzerinde yaşayan insanların yaklaşık olarak %5'lik bir kısmı genellikle tedavi imkanının bulunmadığı kalıtsal olarak aktarılan hastalıklardan etkilendiği bilinmektedir. Bu alanda dünyadaki en büyük beklenti genetik olarak aktarılan bu bozuklukların gen aktarımı metodu kullanılarak tedavi edilmesinin günümüzde mümkün hale getirilmesidir. Oldukça geniş bir çalışma alanı oluşturan bu gen aktarım yönteminin gerçek değeri ilerleyen yıllarda çok daha iyi bir şekilde anlaşılacaktır. (Firdin, 2010).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışması kullanılan cihaz ve bu cihazların markaları aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar**

<b>Kullanılan Cihaz</b>	<b>Markası</b>
MD <sub>500</sub> mikrodalga fırın	ARÇELİK
DNA Engine, PCR makinesi	BIORAD
Güç kaynağı	BIORAD
Bio TDB100 Termostatlı Blok Isıtıcı	BIOSAN
Spin Cihaz	BIOSAN,
Çalkalayıcı İnkübatör	BIOSAN ES 20
Mikro 22R santrifüj	HETTICH
80 dondurucu,	HETTICH
50L otoklav,	HMC HIRAYAMA
UV/VIS Spektrofotometresi,	VARIAN CARRY 50
Etüv	MEMMERT
Sonikatör	SONICS (VCX130)
UV Gösterici	SYNGENE SYTC/1422
Dikey Soğutucu +4°C	UĞUR
Isıtıcı Magnetik Karıştırıcı	VELP SCIENTIFICA ARE
Buzdolabı	VESTEL GTP 455A
Yüksek Hızlı Santrifüj	VISION VS 30 000i
Kar makinesi	VISION
Çalkalayıcı İnkübatör	ZHICHENG - ZHWY111C

### 3.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

#### Çizelge 3.2. Tez çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Markası
Maya ekstrakt	Difco
Metanol	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carlo Erba
<i>NcoI</i>	Takara
PCR Master Mix	Thermo Scientific
Plazmit DNA saflaştırma kiti	Bio Basic
PMSF	Sigma Aldrich
SDS	Serva
Sükroz	Merck
T <sub>4</sub> DNA ligaz	Takara
TEMED	Biorad
Tetrasiklin	Sigma
Tripton	BD Bacto™
Tris	Sigma Aldrich
Triton X 100	Takara
Üre	Sigma
<i>XhoI</i>	Takara
<i>KpnI</i>	Takara
<i>BamHI</i>	Takara

#### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler

**Kanamisin çözeltisi:** 10 ml otoklavlanmış ultra saf suyun içerisine 0.50 g kanamisin eklenerek çözünmesi sağlandı. Ardından bu çözelti 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Son aşama olarak steril mikrotüplere paylaştırılarak 20°C'de muhafaza edilmiştir



**PMSF çözeltisi:** 150 µg PMSF maddesi 1 ml'lik mutlak etanol ile çözdürülmüştür..

**Kloramfenikol Çözeltisi:** Kloramfenikol maddesinin 34 mg/ml miktarında olacak şekilde mutlak etanol ile çözdürülmesi yapılmış ve 0.2 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiştir.

**Tetrasiklin Çözeltisi:** Bu çözelti 12.5 mg/ml olacak şekilde hazırlanıp otoklavlanmış ve ardından saf suda çözülmüştür. 0.2 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiştir.

**FSB çözeltisi:** Bu çözeltinin hazırlanması için 7.5 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 7.4 g KCl, 10 ml 1 M (pH:7.5) KCH<sub>3</sub>COO, 100 g gliserol alınarak pH:6.5'e değerine ayarlanmıştır ve hacim 1 000 ml'ye tamamlanarak otoklavlanmıştır.

**Ampisilin:** Bu antibiyotik çözeltisi için 1.5 gram ampisilin 15 ml saf suda çözülmüştür. Steril 0.2 µm'lik filtreden geçirildikten sonra mikrotüplere bölünerek (-20 °C) saklanmıştır.

**IPTG:** 1.5 gram IPTG ile 15 ml steril su karıştırılarak çözülmüş ve steril Steril 0.2 µm'lik filtrelerden geçirilerek mikrotüplere bölünüp ve -20 °C'ye kaldırılmıştır..

**PİPES'li Tampon Çözeltisi:** Bu tampon çözelti için 0.5 M, 50 ml PİPES çözeltisi hazırlanmıştır. pH değeri KOH çözeltisi ile pH:6.8'e getirilmiştir. Daha sonra 6.92 g MnCl<sub>2</sub>, 18.64 g KCl ve 1.66 g CaCl<sub>2</sub> 980 ml suda çözülmüştür. Üstüne 20 ml PİPES çözeltisi ilave edilerek toplamda hacmin 1000 ml olması sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra steril stok şişelerine bölünüp, -20°C'de saklanmıştır.

**SOB:** Bu çözelti için 5 g maya ekstraktı, 20 g tripton, 2.5 ml 1M KCl, 2 ml 5 M NaCl, 10 ml 1M MgCl<sub>2</sub> ve 10 ml 1M MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O bir behere alınarak üzerine saf su eklenerek bir litreye tamamlanmıştır, iyice karıştırıldıktan sonra otoklavlanmıştır.

### **M9 Minimal Besiyeri:**

1L M9 minimal besi yeri hazırlamak için aşağıdaki bileşenler kullanılmıştır:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
Glukoz solüsyonu	10 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O solüsyonu	1 ml
Tiamin-HCl Çözeltisi	1 ml
Lösin Çözeltisi	2 ml
CaCl <sub>2</sub> solüsyonu	1 ml

**Glukoz Çözeltisi (100 ml):** Bu çözelti için 20 g D-glukoz toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su içerisinde çözülerek stok şişesine alınıp otoklavlanmıştır.

**MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O Çözeltisi:** Bu çözeltinin hazırlanması için 246.5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O nihai hacim 1000 ml olacak şekilde saf su ile çözülüp stok şişesine alındıktan sonra otoklavlanmıştır.

**Tiamin-HCl Çözeltisi:** Bu çözelti için 10 mg Tiamin-HCl nihai hacim 10 ml'ye saf su ile tamamlanmış ardından filtreden geçirilmiştir.

**Lösin Çözeltisi:** 10 mg tartılan Lösin toplam hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlandıktan sonra filtreden geçirilmiştir.

**CaCl<sub>2</sub> Çözeltisi:** Bu çözeltinin hazırlanması için 14.5 g CaCl<sub>2</sub> nihai hacim 1000 ml'ye saf su ile çözüldükten sonra stok şişesine alınarak otoklavlanmıştır.

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O çözeltisi, Lösin çözeltisi, Tiamin-HCl çözeltisi, CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ve Glukoz çözeltisi haricinde kalan bileşenler toplam hacimleri 985 ml olacak şekilde saf su ile çözüldükten sonra otoklavlanmıştır. Daha sonra çözeltinin soğumasının ardından diğer bileşenler steril bir ortamda eklenmiştir.

**LB çözeltisi:** Bu çözeltinin hazırlanması için 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1000 ml su ile çözülmüştür. Hazırlanan 1000 ml'lik bu çözelti 250'er ml olacak şekilde iki ayrı stok şişesinin içerisine alınmıştır daha sonra üzerine 3.75 g olacak şekilde agar ilave edilip karıştırıldıktan sonra otoklavlanmıştır.

**Agaroz Elektroforez Jeli:** Bu jelin hazırlanması için 1.5 gram agarozun üzerine 150 ml 1X TAE tamponunun eklenmesi yapılmış daha sonra mikrodalga fırında eritilip üzerine 1.5 µl etidyum bromür eklenip kasete dökülmüştür.

**SDS Elektroforez Jeli:**

**Alt Tampon:** Alt tampon için 182 g Tris (1.5 M) ve 4 g SDS (%0.4) 1000 ml saf su içerisinde çözülerek pH:8.8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

**Üst Tampon:** Üst tampon için 60.5 g Tris (1.5 M) ve 4 g SDS (%0.4) 1000 ml saf su ile çözülerek pH:6.6 olacak şekilde ayarlanmıştır.

**Yürütme jeli:** yürütme jeli için 2.25 ml alt tampon, 2.7 ml %40 akrilamid, 50 µl %10 APS 4 ml su ve 20 µl TEMED kullanılarak hazırlanmıştır.

**Yükleme jeli:** 1 ml üst tampon, 0.35 ml %40 akrilamid, 50 µl %10 APS 2.55 ml su, ve 10 µl TEMED. Bu maddelerin tamamı karıştırılmıştır ve en son TEMED eklendikten sonra kasete dökülmüştür. Yürütme jelinin polimerleşmesi tamamlandıktan sonra üzerine yükleme jeli eklenerek polimerleşmesi beklenmiştir.

**Elektroforez Tamponu (1X):** 14.4 g Glisin, 3 g Tris, 1 g SDS bileşikleri toplam hacimleri 1000 ml'ye tamamlanacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır.

**SDS Yükleme Tamponu (5X):** 5 ml gliserol (%50), 0.6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.5 ml β-ME (β- Merkaptotanol), 2 ml %10'luk SDS, 0.9 ml saf su ve 1000 µl %1'lik Bromfenol mavisi karışımından hazırlanmıştır.

**SDS Jel boyama (Staining) Çözeltisi:** Bu çözeltinin hazırlanması için 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 maddesi 450 ml metanolun içerisinde çözüldükten sonra filtre kâğıdından süzümüştür. Ardından karışımın içerisine 100 ml asetik asit çözeltisi ve 450 ml saf su ilavesi yapılarak hazırlanmıştır.

**Destaining Çözeltisi:** Bu çözelti 100 ml asetik asit, 100 ml metanol ve 800 ml saf suyun karıştırılması ile hazırlanmıştır

**Amonyum Persülfat (APS-%10):** Bu madde 0.5 g APS'nin 5 ml'lik saf suyun içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır

### **Afinite Kromatografisiyle Saflaştırma İşlemi İçin Kullanılan Çözeltiler:**

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu:** Bu tamponun hazırlanması için 0.2 M 435 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 65 ml 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> karıştırılıp sonra pH:8.0 değerine ayarlanıp son hacim saf su ilavesi ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Yükleme tamponu (Loading Buffer)** Bu tampon 500 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu içerisinde 2.92 g NaCl (pH:8.0) çözündürülmesi ile hazırlanmıştır.

**Yıkama tamponu (Wash Buffer):** Bu tampon 2.92 g 100 mM NaCl ve 0.85 g 25 mM imidazolun 500 ml 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponunda çözündürülmesi ile hazırlanmıştır ve son pH :8,0 olarak sabitlenmiştir.

**Elüsyon tamponu (Elution Buffer):** 2.92 g 100 mM NaCl, 10.2g 300 mM imidazol 500 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponunun içerisinde (pH:8.0) çözündürülmüştür

**Tris Tamponu:** Bu tampon için toplamda 12.12 g tris maddesi bir miktar su içerisinde çözündürülmüştür. pH değeri derişik HCl kullanılarak 7.5'e getirilmiştir. Karışıma 2.92 g NaCl eklendikten sonra hacim saf su ile 1000 ml olacak şekilde tamamlanmıştır.

**300mM immidazol Tris/HCl Tamponu:** Bu tampon için 2.04 g imidazol maddesi 100 ml Tris/HCl tamponunun içerisinde çözündürülmüştür. pH değeri derişik HCl kullanılarak 7.5'e getirilmiştir.

### **Refolding (Yeniden Katlama) İşlemi İçin Kullanılan Çözeltiler:**

**Süspansiyon Tamponu:** Bu tampon için 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH:8.0), 2 mM PMSF bileşenleri saf suda çözündürülmüştür.

**Resüspansiyon Tamponu:** Bu tampon için %2.5 triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH:8.0), %20 sükröz bileşenleri saf su ile çözündürülmüştür.

**Solubilizing (Çözme) Tamponu:** 8 M Üre ve 50 mM Tris-HCl (pH:8.0) pH:8.0 değerine ayarlanacak şekilde saf suda çözüldü.

**Refolding (Yeniden Katlama) Tamponu:** 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, %20 gliserol bileşenleri pH:8.0 değerinde olacak şekilde saf su ile çözdürülmüştür.

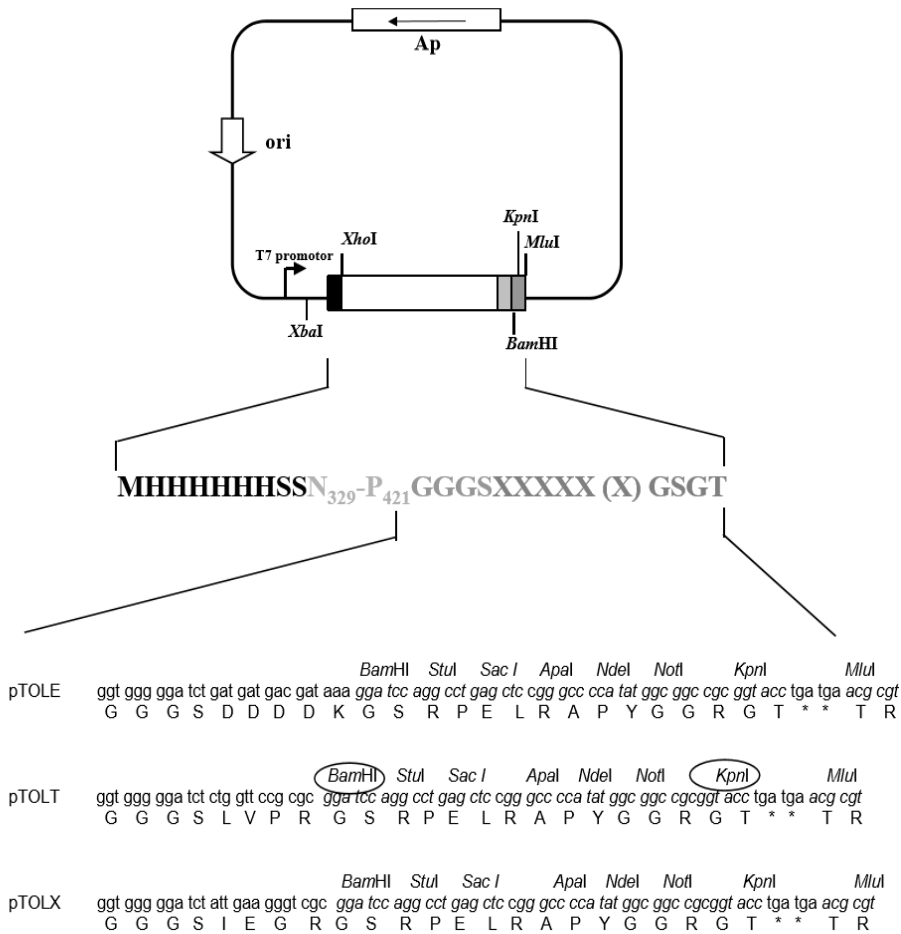
**Diyaliz Çözeltisi:** Bu tampon 100 mM NaCl bileşeni içeren 20 mM Tris HCl, pH:8.0 değerinde olacak şekilde saf su ile çözdürülmüştür.

**Dinitro Salisilik Asit (DNS):** 1g DNS 50 mL distile su ile çözülür. Sonrasında içerisine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2 N NaOH eklenerek 100 mL'ye tamamlanır.

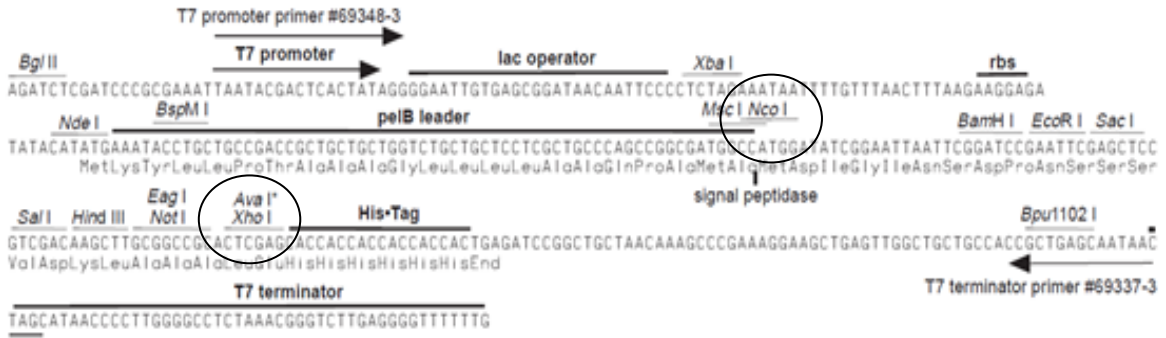
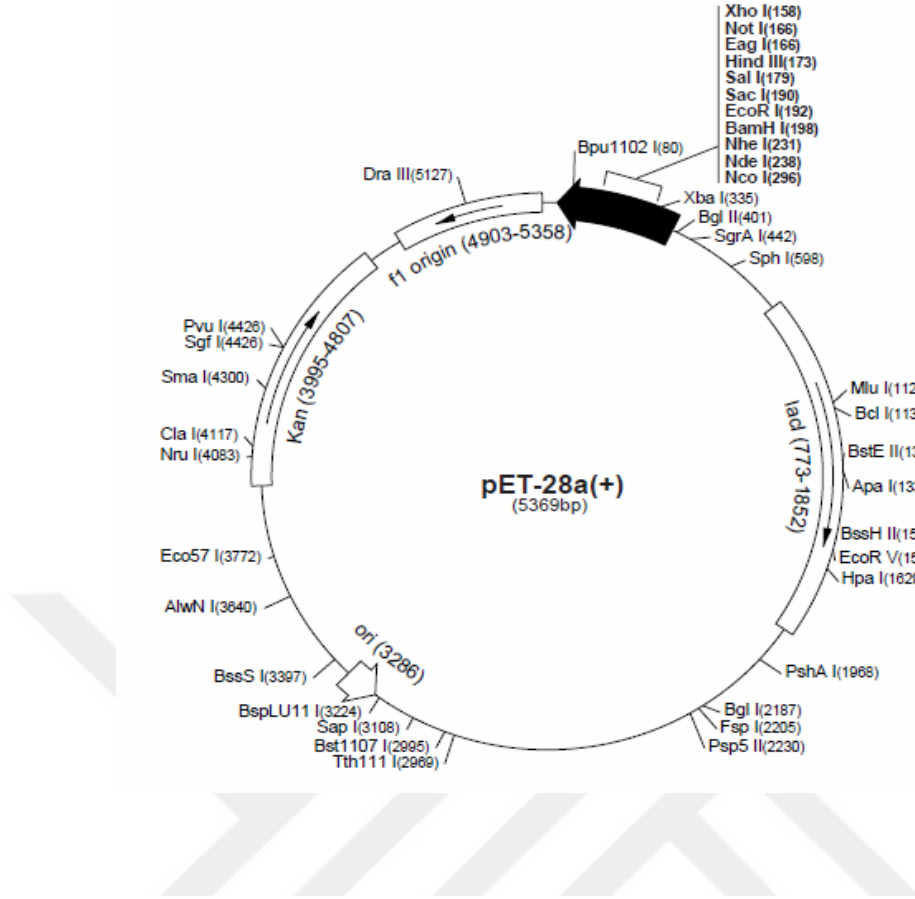
Substrat çözeltisi: Arpa  $\beta$ -glukamı (Sigma): %1 oranında 0.1 M asetik asit tamponunda (pH=5) çözülmüştür.

### 3.2. Yöntem

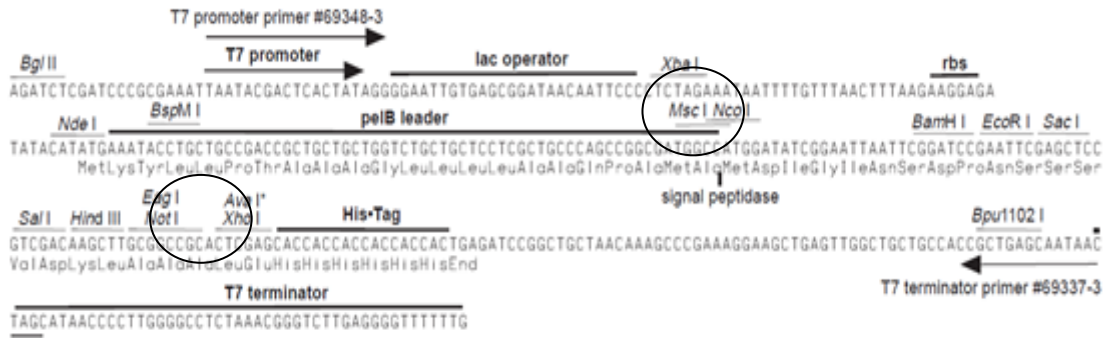
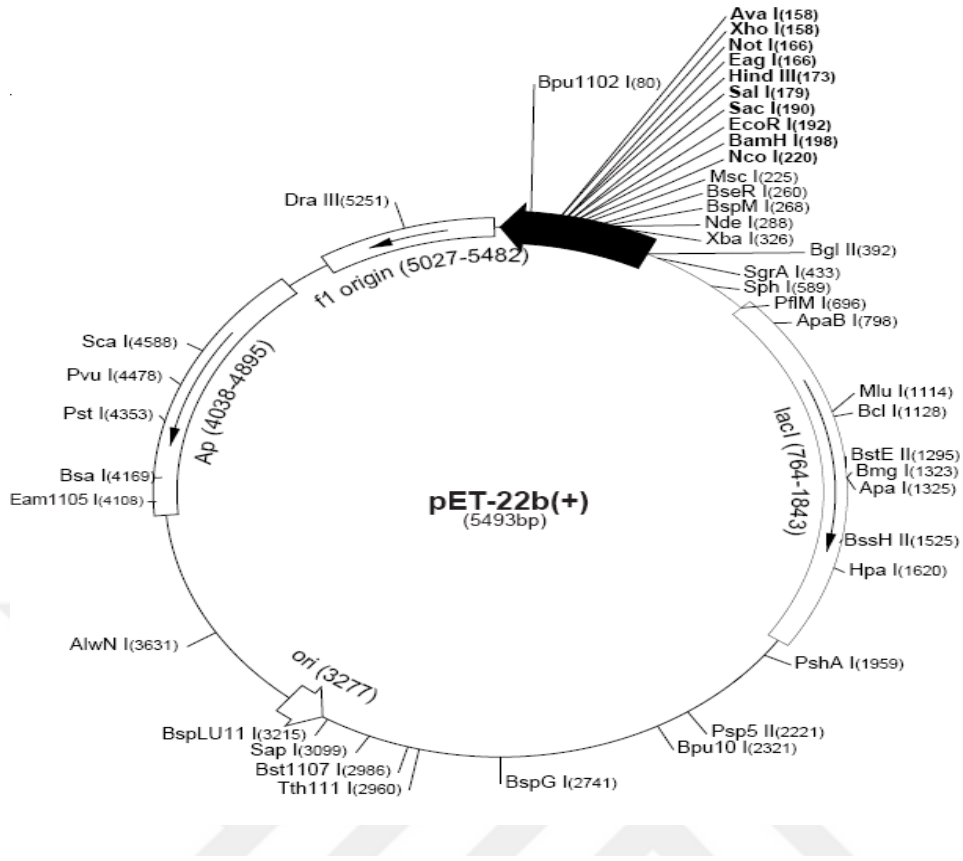
*Aspergillus niger*  $\beta$ -glukanaz enziminin üretimi için gerekli olan DNA dizisi araştırmalar sonucunda bir biyoinformatik sitesi olan NCBI'dan alındı. Biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen genomik dizi yapay olarak sentezletirilip kullanılacaktır. Bir sonraki işlem olan klonlama işlemlerinde vektör olarak pTOLT, pET22b vektörleri kullanılacaktır. NCBI'dan alınan diziyeye *E. coli* mikroorganizmasının *K12* suşu için biyoinformatik araçlar kullanılarak kodon optimizasyonu yapıldı. Klonlama işleminin kolaylıkla yapılmasının sağlanabilmesi amacıyla dizinin başına restriksiyon enzimleri olan *NcoI* ve *BamHI*, dizinin sonuna ise yine aynı şekilde restriksiyon enzimleri olan *XhoI* ve *KpnI* restriksiyon enzim kesim bölgesi eklenmiştir. Nükleotid dizisi yapay olarak sentezletirilen proteinin saflaştırma işleminin kolay bir şekilde yapılabilmesi için vektör sistemlerinde bulunan His tag'ları kullanılacak şekilde dizayn edilmiştir.



**Şekil 3.1** pTOLT vektör sisteminin poli-linker kısmının detaylı olarak kesim enzimleri ile verilen DNA dizisi (Anderluh ve ark., 2003)



Şekil 3.2. pET-28a(+) vektör sisteminin halkasal haritası ve poli-linker kısmının detaylı kesim enzimleri ile verilen DNA dizisi (Anonim, 2014b)



**Şekil 3.3.** pET-22b(+) vektör sisteminin halkasal haritası ve polilinker kısmının detaylı kesim enzimleri ile verilen DNA dizisi (Anonim, 2014c)



ATGCGTCTGCACCGTACCCTGCTGCTGGCTGCTGCTGCTGGTTCTGCTCT	50
GGCTGTTCCGCAGGGTCCGGGTCACAAAAACGTGCTTCTGTTTTCGAAT	100
GGTTCGGTTCTAACGAATCTGGTGTGAATTCGGTACCAACATCCCGGGT	150
GTTTGGGGTACCGACTACATCTTCCCGGACCCGTCTGCTATCTCTACCCT	200
GATCGACAAAGGTATGAACTTCTTCCGTGTTTCAGTTCATGATGGAACGTC	250
TGCTGCCGGACTCTATGACCGGTTCTTACGACGAAGAATACCTGGCTAAC	300
CTGACCACCGTTATCAAAGCTGTTACCGACGGTGGTGCTCACGCTCTGGT	350
TGACCCGCACAACACTACGGTTCGTTACAACGGTCAAATCATCTCTTCTACCT	400
CTGACTTCCAGACCTTCTGGGAAAACCTGGCTGGTCAGTACAAAGACAAC	450
GACCTGGTTATGTTTCGACACCAACAACGAATACCACGACATGGACCAGGA	500
CCTGGTTCTGAACCTGAACCAGGCTGCTATCAACGGTATCCGTGCTGCTG	550
GTGCTACCTCTCAGTACATCTTTCGTTGAAGGTAACCTCTTGGACCGGTGCT	600
TGGACCTGGGTTGACGTTAACGACAACATGAAAAACCTGACCGACCCGGA	650
AGACAAAATCGTTTACGAAATGCACCAGTACCTGGACTCTGACGGTTCTG	700
GTACCTCTGAAACCTGCGTTTCTGAAACCATCGGTAAAGAACGTGTTACC	750
GAAGCTACCCAGTGGCTGAAAGACAACAAAAAAGTTGGTTTCATCGGTGA	800
ATACGCTGGTGGTTCTAACGACGTTTGCCGTTCTGCTGTTTCTGGTATGC	850
TGGAATACATGGCTAACACACCGACGTTTGGAAGGTGCTTCTTGGTGG	900
GCTGCTGGTCCGTGGTGGGGTGAAGTACATCTTCTCTCTGGAACCGCCGGA	950
CGGTACCGCTTACACCGGTATGCTGGACATCCTGGAAGCTTACCGT	999

**Şekil 3.4** Kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiş *A. niger*  $\beta$ -glukanaz enziminin DNA dizisi

### 3.2.1. $\beta$ - Glukanaz geninin vektörlere klonlanması

Yapay olarak sentezlettirilen  $\beta$ - Glukanaz genini taşıyan plazmitin (pBSKGLU) çoğaltılması için, bu plazmit gerekli işlemler ile kompetent hale gelmesi sağlanan *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine ısı şoku işlemi ile transfer edilmiştir. Transformasyon işleminin ardından *E. coli* hücreleri bire bir oranında 50 mg/ml kanamisin antibiyotiği ile hazırlanmış olan katı besi yerinde ekimi yapılarak 37°C sıcaklık değerinde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından elde edilen koloniler 4 ml'lik bire bir oranında 50 mg/ml kanamisin antibiyotiği ile hazırlanmış sıvı besi yerinde eklenip 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca yetiştirilmiştir. Yetiştirilen bu kültürlerden plazmit DNAsaflaştırma işlemi Biobasic Plazmit DNA izolasyon kiti yardımıyla kit üzerinde belirtilen protokole uygun bir şekilde saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

## Restriksiyon Enzimleri Kullanılarak Kesme İşlemi

Çizelge 3.3. pTOLT vektör sisteminde kesim işlemi için gereken madde miktarları

<b><math>\beta</math>- Glukanaz Geni İçin Kesim</b>	<b>pTOLT Vektörü İçin Kesim</b>
28 $\mu$ l $\beta$ - Glukanaz plazmit DNA 80 ng/ $\mu$ l	20 $\mu$ l pTOLT plazmit DNA 80 ng/ $\mu$ l
4 $\mu$ l 10X Buffer K	3 $\mu$ l 10X Buffer K
4 $\mu$ l BSA (10 mg/ml)	3 $\mu$ l BSA (10 mg/ml)
2 $\mu$ l <i>Bam</i> HI (15 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l <i>Bam</i> HI (15 U/ $\mu$ l)
2 $\mu$ l <i>Kpn</i> I (10 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l <i>Kpn</i> I (10 U/ $\mu$ l)

Çizelge 3.4. pET22b vektör sistemimde kesimi işlemi için gereken madde miktarları

<b><math>\beta</math>- Glukanaz Geni İçin Kesim</b>	<b>pET22b Vektörü İçin Kesim</b>
28 $\mu$ l $\beta$ - Glukanaz plazmit DNA 80 ng/ $\mu$ l	20 $\mu$ l pET22b plazmit DNA 80 ng/ $\mu$ l
4 $\mu$ l 10X Buffer K	3 $\mu$ l 10X Buffer K
4 $\mu$ l BSA (10 mg/ml)	3 $\mu$ l BSA (10 mg/ml)
2 $\mu$ l <i>Nco</i> I (10 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l <i>Nco</i> I (10 U/ $\mu$ l)
2 $\mu$ l <i>Xho</i> I (10 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l <i>Xho</i> I (10 U/ $\mu$ l)

Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4.'te belirtildiği şekilde ependorf tüpleri içerisine gerekli maddeler eklenerek tüpler vortekslenmiştir. Daha sonra 3-5 saniye boyunca hızlı bir şekilde santrifüjle işlemi yapılarak tüpler 37°C sıcaklık değerinde inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresi boyunca 45 dakika aralıklarla tüpler bir spin işlemi yapılarak 4 saatlik bir süre boyunca inkübasyon işlemi sürdürülmüştür. 4 saatlik bu sürenin ardından,  $\beta$ - Glukanaz geni için gerçekleştirilen kesim işlemi ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforezinde analiz edilip elde edilen gen kesilerek alınıp ticari olarak kullanılan “Biobasic Gel and PCR Clean-Up” kiti ile kit üzerinde belirtilen protokole bağlı kalınmak kaydıyla saflaştırılmıştır. Kit üzerinde belirtilen saflaştırma protokolü ise aşağıdaki gibidir:

- Elde edilen ürün mikrosantrifüj tüpüne koyulmuş ve jel miktarının 3 katı olacak şekilde “Cleanup Solution” çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım 60 °C'lik sıcaklık değerinde 10 dk

boyunca zaman zaman karıştırma işlemi yapılarak jelin erimesi işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Eriyik halde bulunan ürün EZ-10 Spin kolona eklenip 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 2 dakika 10 000 rpm (8 000xg)'de santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Santrifüj sonrasında alt kısımda kalan sıvı atılmıştır. Kolon içerisine 750 µl olacak şekilde "Wash Solution" eklenip 2 dakika boyunca 10 000 rpm (8 000xg)'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Bu işlemin ardından da alt kısımda kalan sıvı atılıp kolon aynı tüpe tekrar yerleştirilmiştir.
- Bu işlemlerin ardından Kolona 750 µl kadar "Wash Solution" eklenip ve 2 dakika boyunca 10 000 rpm (8 000xg)'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrasında altta kalan sıvı kısım atılarak Wash Solution'ın kolon içerisinde kalan diğer kısmını da uzaklaştırmak için 10 000 rpm de 1 dakika süresince santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Daha sonra kolon temiz eppendorf tüpüne transfer edilmiştir. Kolonun merkezine doğru yaklaşık 30 ila 50 µl kadar "Elution Buffer" veya su eklenip 50°C sıcaklıkta 2 dakika boyunca bekletilmiştir
- Tüm bu işlemlerin ardından kolon 10000 rpm (8 000 g)'de 2 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

Vektörlerin kesim işlemi için yapılan 4 saatlik protokolün ardından kesim işlemi tamamlanmış olan ürünler ise "Biobasic Gel and PCR Clean-Up" isimli kit ile kit içeriğinde belirtilen protokole bağlı kalmak kaydıyla saflaştırılmıştır. Bahse konu kitin protokolü ise aşağıdaki gibidir:

- Elde edilmiş olan DNA karışımı Eppendorf tüpüne aktarılır ve bu karışımın üzerine hacminin yaklaşık olarak 3 katı olacak şekilde "Cleanup Solution" eklenir.
- Sonrasında bu karışım EZ-10 Spin kolona alınarak 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra ise 2 dakika boyunca 10000 rpm (8 000 g)'de santrifüj işlemi gerçekleştirilir.
- Alt kısımda kalan sıvı atıldıktan sonra kolonun üzerine 750 µl "Wash Solution" eklenip 2 dakika boyunca 10000 rpm (8 000xg)'de santrifüj işlemi yapılır. Santrifüj işleminin ardından altta kalan sıvı atılır ve kolon tekrar aynı tüpe konulur.
- Bu kolona tekrar 750 µl "Wash Solution" eklemesi yapılır ve 2 dakika boyunca 10000 rpm (8 000 g)'de santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Altta kalan sıvı kısım tekrar atıldıktan

sonra Wash Solution'ın kolon içerisinde kalan diğer kısmı da çıkarmak için 10 000 rpm de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi yapılır.

- Son olarak kolon mikrotüpe transfer edilir. Kolonun tam merkezine doğru 30 ila 50 µl olacak şekilde “Elution Buffer” ya da saf su eklenir 50°C sıcaklıkta 2 dakika bekletildikten sonra 10 000 rpm (8 000 g)'de 2 dakika santrifüj işlemi yapılarak protokol tamamlanmış olur.

## DNA ligasyonu

Kesim işlemi gerçekleştirilen vektör plazmit DNA'ları ile gen fragmanlarının T4 DNA Ligaz enzimi kullanılarak birleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemi için oluşturulacak olan karışımı aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

**Çizelge 3.5. pTOLT vektör sisteminde gerçekleştirilecek olan ligasyon işlemi için gerekli olan madde miktarları**

<u>Ligasyon Karışımı I</u>	<u>Ligasyon Karışımı II</u>
1 µl pTOLT plazmiti 80 ng/µl	3 µl pTOLT plazmiti 80 ng/µl
3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu	3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu
20 µl β- Glukanaz Geni 90 ng/µl	18 µl DNA β- Glukanaz Geni 90 ng/µl
1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µl	1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µl

**Çizelge 3.6. pET22b vektör sisteminde gerçekleştirilecek olan ligasyon işlemi için gerekli olan madde miktarları**

<u>Ligasyon Karışımı I</u>	<u>Ligasyon Karışımı II</u>
0.5 µl pET22b plazmiti 80 ng/µl	2.5 µl pET22b plazmiti 80 ng/µl
3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu	3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu
20.5 µl β- Glukanaz Geni 90 ng/µl	18.5 µl β- Glukanaz Geni 90 ng/µl
1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µl	1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µl

Çizelge 3.5. ve Çizelge 3.6.'da belirtildiği gibi yapılan pipetleme işlemlerinin ardından hazırlanan ligasyon karışımlarının inkübasyonu işleminin 18°C sıcaklıkta bir gece boyu

gerçekleştirilmesinin ardından ileriki işlemlerde yapılacak olan transformasyon işlemi için kullanılmaya kadar 4°C sıcaklıkta saklanmıştır.

### **PİPES'li kompetent hücre hazırlanması**

- Önceden -80°C sıcaklıkta stoklanmış DH5α hücreleri alınarak LB besi yeri içeren petri kaplarına ekilip ve 37°C sıcaklıkta 16 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- Bu 16 saatlik inkübasyon işleminin ardından petriden büyüdüğü gözlenen 1 koloni alınarak; içerisinde 25 ml miktarında SOB bulunan 250 ml'lik bir erlene inokülasyonu gerçekleştirilir ve sonrasında 250 rpm'de ve 37°C sıcaklıkta 6 saat boyunca inkübe edilir.
- 6 saatlik inkübasyon süresinin ardından kültürde edilmesi için, içerisinde 250 ml miktarında SOB bulunan 3 farklı erlen hazırlanmış ve 25 ml'lik DH5α kültüründen hazırlanan bu erlenlere 10 ml, 4 ml ve 2 ml olacak şekilde sırasıyla inoküle edilmiştir.
- İnokülasyon işlemi sonrası hazır hale gelen erlenler 18-22 °C sıcaklık arasında 150 rpm'de ve 14 saat boyunca inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur.
- İnokübasyon süresi içerisinde her 45 dakikada bir kültürlerden bir örnek alınarak 600 nm'de OD değerlerinin ölçümü yapılmış ve bu ölçüm değeri 0.55'e ulaştığında çalkalayıcı içerisinde bulunan kültür çalkalayıcıdan çıkarılmıştır.
- Çıkarılan kültür 10 dakika boyunca buzlu-su banyosu içerisinde bekletilmiştir.
- Su banyosunda bekletme işleminin ardından hücreler 4°C sıcaklıkta 2500 g değerinde (3 900 rpm) 10 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonrasında Süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır ve santrifüj şişesi içerisindeki besi yerinin tamamıyla çıkarılmasına özen gösterilmiştir.
- Daha sonra hücrelerin üzerine 0 °C sıcaklıktaki 80 ml PİPES'li tampon ilavesi yapılarak, hassas olarak kısım tekrardan süspansiyon haline getirilmiştir.
- Bu Hücreler, 4°C sıcaklıkta ve 2500 g (3900 rpm)'de 10 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminin ardından tüpün içerisinde bulunan tampon çözeltinin tamamıyla uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Hücrelerin üzerine 0°C sıcaklıkta 20 ml PİPES'li tampon çözelti ilavesi yapılmış ve sonrasında hücreler tekrar hassasça süspansiyon hale getirilmiştir.
- Elde edilen süspansiyonun üzerine 1.5 ml DMSO eklenip ve hafif bir şekilde karıştırılmış ve bu karışım buz banyosunda 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

- İnkübasyonun ardından hücreler hızlı bir şekilde steril mikrotüplere bölünmüş ve hızlı bir şekilde donması için sıvı azota içerisinde atılmıştır. Daha sonra hücreler -80°C sıcaklıkta saklanmıştır (Inoue ve ark., 1990)

### **Transformasyon**

- Buz banyosu içerisindeki kompetent hücrelerden 200 µl'lik miktarlar alınmıştır. Yeterli sayıdaki mikrotüpe bu hücrelerin pipetlemesi yapılmıştır. Bu hücrelerin üzerine 5 µl ligasyon işlemi sonrasında elde edilen ürün eklenmiş ve bu karışım karıştırılarak 1 saat boyunca buz banyosuna gömülmüştür.
- 1 saatlik sürenin ardından hücreler 2 dakika boyunca 42°C sıcaklıkta ısı şokuna maruz bırakılmıştır.
- Isı şokunun ardından tekrar buza gömülen hücreler 5 dakika boyunca bekletilmiştir.
- Buz üzerindeki inkübasyonun ardından karışıma 200 µl LB besi yeri eklenerek yarım saat boyunca 37 °C sıcaklıkta, 240 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
- Yarım saatlik inkübasyonun ardından her bir mikrotüp içerisinde bulunan hücreler antibiyotikli petrilere ayrı ayrı sprader yardımıyla yayılmıştır ve 37°C sıcaklıkta 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Hanahan, 1985).

### **Plazmit DNA saflaştırılması**

Plazmit DNA saflaştırma işleminde petri tabaklarına ekimi yapıp büyüyen kolonilerden pTOLT ve pET22b vektör sistemlerinin her ikisi için ampisilin antibiyotigi içeren 4 ml'lik ve steril olan sıvı LB besi yerleri içerisine tek koloni olacak şekilde inoküle edilmesinin ardından 37 °C sıcaklıkta de gece boyunca inkübasyona tabi bırakıp yetiştirildiler. Yetişen bu hücreler Santrifüjle mikrotüp tüplerine toplanıp hücrelerden plazmit DNA “Biobasic Plasmid DNA Purification” isimli kit kullanarak aşağıda belirtilen protokol doğrultusunda göre saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işleminin protokolü ise aşağıda belirtildiği gibidir:

- Hücre kültüründen 1.5 ila 5 ml arası ürün tüpe transfer edilir. 2 dakika boyunca 12 000 rpm'de santrifüj işlemi yapılır ve sıvı kısım tamamen uzaklaştırılır.
- Santrifüj sonrası 100 µl Solution 1 eklenerek vorteks ile iyice karıştırılır ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilir.

- Daha sonra bu karışım içerisine 200 µl Solution 2 eklenir ve nazik bir şekilde 4-6 defa alt üst edilir ardından 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilir.
- Solution 2'nin ardından karışıma 350 µl Solution 3 eklenir ve yine nazikçe karıştırılır oda sıcaklığında 1 dakika boyunca bekletilir.
- 12 000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi yapılır.
- Süpernatant kısım EZ-10 Spin kolona konular ve 2 dakika boyunca 10000 rpm 'de santrifüj işlemi yapılır.
- Alt kısımda kalan sıvı uzaklaştırılır, kolona 750 µl "Wash Solution" eklenir ve 2 dakika boyunca 10000 rpm 'de santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Alt kısımdaki sıvı tekrar atılır ve kolon tekrar aynı tüpe konular.
- Kolonun üzerine 750 µl "Wash Solution" eklenir ve 2 dakika boyunca 10000 rpm (8 000 g)'de santrifüj işlemi yapılır. Aynı şekilde alt kısımda kalan sıvı tekrar atılır ve Wash Solution'ın kolonda kalan miktarını uzaklaştırmak için ek olarak 1 dakika boyunca bir santrifüj işlemi daha yapılır.
- Daha sonra Kolon 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne konular, kolonun tam merkezine olacak şekilde 50 µl steril saf su eklenir ve 50°C sıcaklıkta 2 dakika bekletilmiştir.
- Son olarak 10000 rpm'de 2 dakikalık santrifüj işlemi yapılarak plazmit DNA saflaştırma işlemi tamamlanmış olur.

### Doğrulama restriksiyon kesimi

Plazmit hücreler *E.coli* DH5α hücrelerinden saflaştırıldıktan sonra klonlama işleminin (genin plazmite klonlanıp klonlanmadığı) doğru olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için doğrulama restriksiyon kesim işlemi gerçekleştirilir.

### Çizelge 3.7. pTOLT vektör sistemi için doğrulama kesimi işleminde gerekli olan madde miktarları

<b>pTOLT Vektör Sistemi İçin Kesim İşlemi</b>
18 µl Plazmit DNA 80ng/µl
2.5 µl 10X Buffer K
2.5 µl BSA (10 mg/ml)
1 µl <i>KpnI</i> (10 U/µl)
1 µl <i>BamHI</i> (15 U/µl)

**Çizelge 3.8. pET28b vektör sisteminde yapılan doğrulama kesiminde gereken madde miktarları**

<b>pET28b Vektör Sistemi İçin Kesim</b>
18 µl <u>Plazmit DNA</u> 80ng/µl
2.5 µl 10X <u>Buffer K</u>
2.5 µl BSA (10 mg/ml)
1 µl <u>NcoI</u> (10 U/µl)
1 µl <u>XhoI</u> (10 U/µl)

**DNA dizileme**

Pozitif olarak değerlendirilen plazmit DNA'lardan 30'ar µl alınır ve T7 promotor ve T7 terminatör primerleri ile dizi analizi işleminin gerçekleştirilmesi için DNA dizileme işlemine gönderilir.

**β- Glukanaz Enziminin Üretilmesi (İndükleme)**

Protein ekspresyon çalışmaları işlemlerinde *E. coli* BL21 pLysE suşu tercih edilmiştir. -80°C sıcaklıkta derin dondurucuda bekletilen stok hücreler 4 µl kloramfenikol antibiyotiği içeren 4 ml'lik LB besi yerine inoküle edilmiş ve bir gece boyunca 37°C sıcaklıkta 240 rpm'de yetiştirilmiştir. Yetiştirildikten sonra FSB'li kompetent hücre hazırlama işlemi protokolüne uygun şekilde elde edilen hücreler kompetent hale getirilmiştir.

**FSB'li kompetent hücre hazırlanması**

- 50'şer ml steril bir şekilde hazırlanmış LB besi yeri içeren iki tane erlen içerisine gece boyu inkübe edilen kültürden 1'er ml alınarak eklendi ve 37 °C sıcaklıkta ve 250 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.
- OD değeri 600 nm'de ölçüm sonucu yaklaşık 0.7 olduğu zaman erlenler inkübatör cihazından alınarak 4°C sıcaklıkta 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır.



- Sonrasında süpernatant kısım atılmıştır. Kalan pelet kısma 50 ml kadar soğuk FSB çözeltisi eklenmiştir ve sağlam bir şekilde vortekslenmiştir. Vorteks sonrasında 1 saat boyunca buz banyosunda bekletilmiştir.
- 1 saatlik sürenin sonunda 4<sup>0</sup>C sıcaklıkta ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısım atılmıştır. Pelet kısma 8 ml kadar soğuk FSB çözeltisi eklendikten sonra tüpe vurarak çözünmesi sağlanmıştır.
- Pelet kısmın tamamı çözüldükten sonra 560 µl DMSO çözeltisi eklenmiş ve 3 saat boyunca buza gömülmüştür. 3 saatlik süreninden sonra kompetent hücre hazırlama işlemi tamamlanmıştır. (Hanahan, 1983).

Hazırlanmış olan kompetent hücelere pozitif olduğu düşünülen plazmitler başlık 3.2.5.'te de anlatıldığı gibi protokole uygun bir şekilde etransfer edilmiştir. Transformasyon işleminin ardından hücreler ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiği içeren LB Agar besi yerine yayarak ekilmiştir ve bir gece boyunca 37<sup>0</sup>C sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. Gece boyu çoğalan hücrelerden seçilen birer koloni ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiği içeren 4 ml'lik LB besi yerine inoküle edilmiş ve bir gece boyunca 37<sup>0</sup>C sıcaklıkta 240 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. Gecenin ardından hücreler 600 ml hacimde antibiyotik içeren ve içerisinde LB besi yeri bulunan 2 L'lik erlenlere inoküle edilmiştir. Her saat başında 600 nm'deki absorbans değerleri okunarak yetiştirilme işlemi yapılmıştır.

OD:0.7 değerine ulaştığında vektör sistemine uygun IPTG ilavesi ile indüklenme işlemi yapılmıştır. 3 saat süren inkübasyonun ardından erlenler toplanarak, 6 000 rpm'de 8 dakika boyunca santrifüj işlemi yapılarak toplanan *E. coli* BL21 pLysE hücreleri -20<sup>0</sup>C sıcaklıkta saklanmıştır (Guda ve ark., 1995).

### ***E. coli* BL21 pLysE hücrelerinin parçalanması**

İndükleme işleminin ardından -20<sup>0</sup>C sıcaklıkta saklanan hücreler dışarı çıkarılarak buza gömülmüştür. Buza gömülen hücrelerin üzerine yükleme tamponu (pH:8) eklenip süspansiyon hale getirilmiştir. Elde edilen süspansiyona 100 mM PMSF ve bezamidin eklenip süspansiyon tekrar buz üzerine konulmuştur. Buz üzerinde bulunan hücreler sonikatör yardımıyla 1 saat boyunca parçalanmıştır. Parçalanmış hücrelerden Santrifüj işlemi ile (60000 rpm, 10 dakika) süpernatant kısım ayrılarak alınmıştır. Alınan bu süpernatant kısım 30 000

rpm ve 4<sup>0</sup>C sıcaklıkta 60 dakika ultra santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu sayede karışımda bulunan hidrofobik proteinler ile diğer hidrofobik hücre materyallerinin çöktürülmesi sağlanmıştır.

### **Afinite kromatografisi yöntemi ile $\beta$ - Glukanaz enziminin saflaştırılması**

Afinite kromatografisi işleminde kolon dolgu maddesi Ni-NTA agaroz rezin kullanılmıştır. Kolondan elüsyon işlemi için ise içerisinde imidazol bulunan elüsyon tamponu kullanılmıştır. İlk olarak küçük bir polikarbonat kolon içerisine 1 ml civarında Ni-NTA agaroz konulur (Qiagen) sonra, daha sonra kolon yükleme tamponu vasıtasıyla yıkanmıştır. Bu işlemlerin ardından santrifüj sonrasında elde ettiğimiz protein karışımı kolona tatbik edilir ve kolondan geçen bütün fraksiyonlar eppendorf tüplerine toplanır. Protein yüklenmiş olan kolon yıkama tamponu vasıtasıyla yıkanarak kolonda tutunmuş olan diğer proteinlerinde aynı şekilde ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra elüsyon tamponu kullanılarak kolona tutunmuş halde bulunan protein 2 farklı fraksiyon şeklinde elüe edilmiştir. Ayrıca elüe işlemi boyunca kolondan elüe edilen farklı her fraksiyondan alınan 200  $\mu$ l civarında alınan numuneler 100'er  $\mu$ l olarak alınan jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100<sup>0</sup>C sıcaklıkta 2 dakika boyunca denatüre hale getirilip daha önceden hazırlanan SDS PAGE jeli kuyucuklarına yüklenmiştir. SDS-PAGE işlemi tamamlandıktan sonra saf su yardımıyla yıkanan jel daha sonra boyanmıştır. Boyanan jelde bulunan fazla boyanın çıkarılması sağlandıktan sonra bir tarayıcı vasıtasıyla taranmıştır (Laemmli, 1970).

### **$\beta$ - Glukanaz enzimi için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması**

SDS-PAGE analizi sonrasında görüntüler incelendiğinde  $\beta$ - Glukanaz proteininin pelet kısmında yer aldığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak elde edilmeye çalışılan  $\beta$ - Glukanaz proteininin inklüzyon cisimcikleri oluşturarak çöktüğü anlaşılmıştır. Hücrenin oluşturmuş olduğu inklüzyon cisimciği oluşumunu engellemek için *Origami* hücrelerinin kompetent hale getirilmesi işlemi gerçekleştirilmiştir (Bkz.: başlık 3.2.9.1) ve 10 numaralı pozitif olan plazmit *Origami* hücrelerine ısı şoku işlemi ile transfer edilmiştir. Daha sonra ise 3 farklı sıcaklık değeri (37<sup>0</sup>C, 27<sup>0</sup>C ve 18<sup>0</sup>C), belirlenen 2 farklı IPTG konsantrasyonu (1 mM ve 0.1 mM), İki farklı besiyeri (M9 minimal besiyeri ve LB besiyeri) ve bu belirlenmiş olan parametrelerin kombinasyonlarında gerçekleştirilerek *origami* hücreleri yetiştirilmiştir.

**Çizelge 3.9.  $\beta$ - Glukanaz Enzimi için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması denemeleri**

	Sıcaklık			
<u>Besiyeri</u>	37 °C	27°C	18°C	<u>IPTG konsantrasyonu</u>
<u>Minimal Besiyeri (m9)</u>	3 saat <u>inkübasyon</u>	12 saat <u>inkübasyon</u>	Gece boyu <u>inkübasyon</u>	1 <u>mM</u> IPTG
<u>Minimal Besiyeri (m9)</u>	3 saat <u>inkübasyon</u>	12 saat <u>inkübasyon</u>	Gece boyu <u>inkübasyon</u>	0.1 <u>mM</u> IPTG
<u>LB Besiyeri</u>	3 saat <u>inkübasyon</u>	8 saat <u>inkübasyon</u>	Gece boyu <u>inkübasyon</u>	1 <u>mM</u> IPTG
<u>LB Besiyeri</u>	3 saat <u>inkübasyon</u>	8 saat <u>inkübasyon</u>	Gece boyu <u>inkübasyon</u>	0.1 <u>mM</u> IPTG

### **$\beta$ - Glukanaz enzimi için refolding (yeniden katlama)**

Yapılan işlemler sonucunda inklüzyon cisimciğinin oluşması engellenememiştir. Bu nedenle proteinin inklüzyon cisimciklerinin çözdürülmesi ve yeniden katlanmasıyla proteinin elde edilmesine karar verilmiştir. Bu süreçte uygulanacak olan protokol aşağıdaki gibidir:

Origami hücreleri kullanılarak 27°C sıcaklık ve LB besi yerinde büyümesi sağlanan hücreler O.D. değeri 0.7 olduğu zaman 0.1 mM IPTG ile indüklemeye işlemi yapılmış ve bu işlemden 6 saat sonra hücreler toplanmıştır. Toplanan bu hücreler -20°C sıcaklıkta saklanmıştır.

Stoklanan hücrelerden alınanlar Tris-HCl buffer (50 mM tris, 0.1 mM DTT, 2 mM PMSF pH:8.0) yardımıyla süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon haline getirilen hücrelere lizozim enziminin eklenmesinin ardından 90 dakika boyunca sonikatör ile parçalanmıştır. Sonikatör ile parçalama işleminin ardından 12 000 rpm de 15 dakika boyunca hücreler santrifüj edilmiştir. Daha sonra pelet kısım iki kez resüspansiyon buffer (%2.5 triton X-100, 50 mM tris-HCl (pH:8.0), %20 sükröz) kullanılarak süspansiyon haline getirilmiş, yıkanmış (5ml/g) ve pelet kısım 12 000 rpm de 15 dakika santrifüj edilip toplanmıştır.

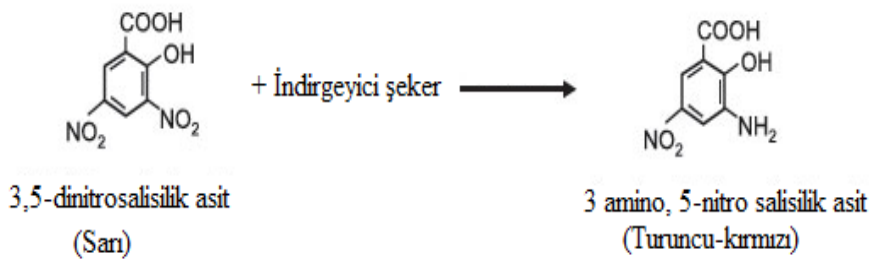
Yıkanan pelet kısım 8 M üre ihtiva eden 50 mM Tris-HCl buffer (pH:8.0) ile (5ml/g) 5 saat boyunca nazik bir şekilde karıştırılarak çözdürülmüştür. Çözdürülen pelet kısım 12 000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonuç olarak toplanan süpernatant kısım üstüne damla damla olacak şekilde soğuk refolding buffer (10 mM DTT, 100 mM tris-HCl,

%20 gliserol (pH:8.0)) finalde protein konsantrasyonundan 0.2 mg/ml'den daha az olacak şekilde eklenmiştir ve 16 saat 4 derece sıcaklıkta nazik bir şekilde karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra 12 000 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüjün ardından süpernatant kısım alınıp 100 mM NaCl ihtiva eden 20 mM Tris HCl (pH:8.0) diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir.

Diyalizden sonra elde edilen ürün yükleme tamponu vasıtasıyla yıkanmış ardından Ni-NTA agaroz içeren kolon içerisine eklenmiştir. Kolondan akan fraksiyonların hepsi toplanmıştır. Proteinle yüklenen olan kolon 10 mM imidazol ihtiva eden 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponu ile yıkanıp kolonda tutunan diğer proteinlerinde elenmesi sağlanmıştır. Daha sonra 300 mM imidazol ihtiva eden, 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponu vasıtasıyla kolona tutunmuş halde bulunan protein elüe edilmiştir (Melissis ve ark., 2010). Elüe işlemi sonrası toplanan fraksiyonlardan alınan numuneler yükleme tamponu ile karıştırılıp, 100°C sıcaklıkta 2 dakika boyunca denatüre işlemine tabi tutulup önceden hazırlanmış olan SDS PAGE jelinin kuyucuklarına yüklenmesi yapılmıştır. Bu işlemlerin ardından boyanan jelin fazla boyasının çıkarılmasından sonra jel bir tarayıcı vasıtası ile taranıp dijital platforma alınmıştır.

### Beta Glukanaz Enziminin Aktivite Tayini

Refolding işlemi sonrasında saflaştırma işlemi gerçekleştirilen endo- $\beta$ -1-4-Glukanaz enziminin aktivite tayini DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) yöntemi ile belirlenmiştir. DNS yöntemi  $\beta$ -Glukanaz enziminin  $\beta$ -glukan ile reaksiyona girdiğinde açığa çıkan indirgen şeker miktarının belirlenmesi esasına dayanır. DNS alkalın çözeltide (sarı) monosakkaritler gibi indirgeyici şekerler ile reaksiyona girdiğinde 3-amino-5-nitrosalisilik aside (turuncu-kırmızı) dönüşür. Bu değişim 540 nm dalga boyunda absorbans değişimine neden olur. 540 nm'deki absorbans değeri ortamdaki indirgeyici şeker miktarıyla orantılıdır (Negrulescu ve ark., 2012).



Şekil 3.5.  $\beta$ -Glukanaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan DNS yönteminin prensibi (Negrulescu ve ark., 2012).

2 farklı ependorf tüpü içerisine Substrat olarak %1 arpa  $\beta$ -glukan (sigma) çözeltisi kullanılmıştır. Saflaştırılan enzim ve substrat çözeltisi karıştırılmış ve 60°C sıcaklıktaki su banyosunun içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Kontrol olarak enzim yerine protein saflaştırma işlemlerinde kullanılan tampon çözelti kullanılmıştır. Daha sonra 1:1 oranında DNS çözeltisi ilave edilip 5 dk kaynatılmış ve tüpler soğutulduktan sonra spektrofotometrede 540 nm'de ölçüm alınmıştır.

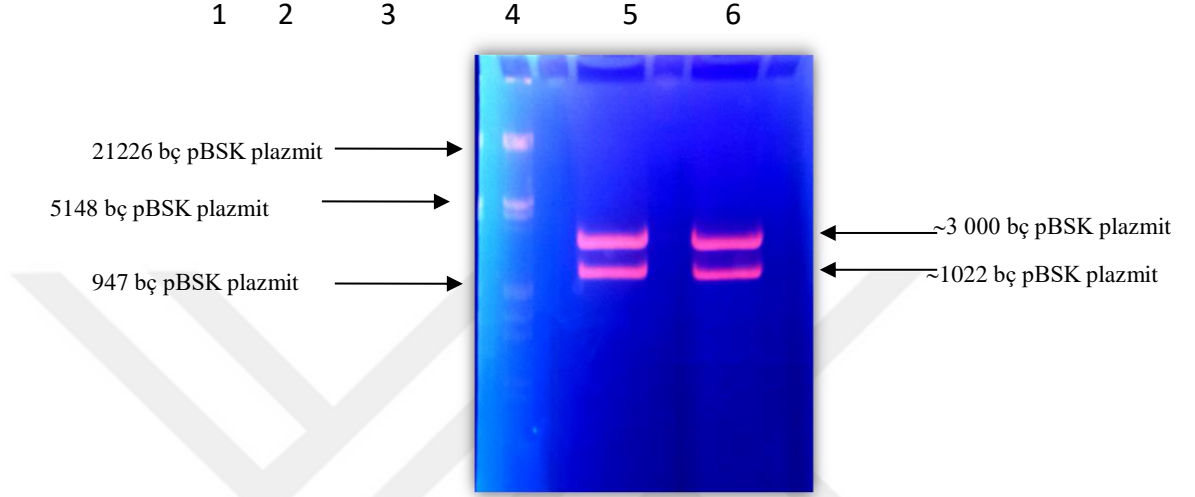


## 4. BULGULAR

### 4.1. $\beta$ -Glukanaz Geninin Vektörlere Klonlanması

#### 4.1.2. Restriksiyon Enzimi İle Kesim

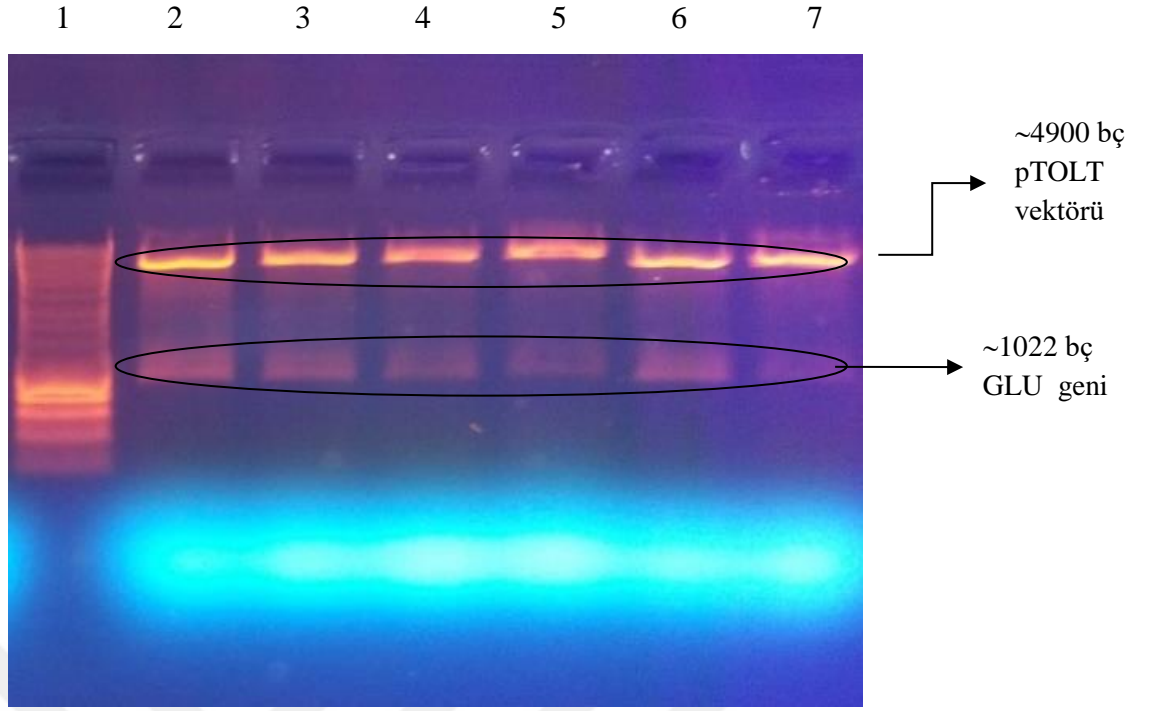
Yöntem kısmında da anlatıldığı üzere  $\beta$ -Glukanaz genini taşıyan plazmit restriksiyon enzimleri şle kesime bırakılmış ve ardından %1'lik agaroz jelde yürütülen örneklerin saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.



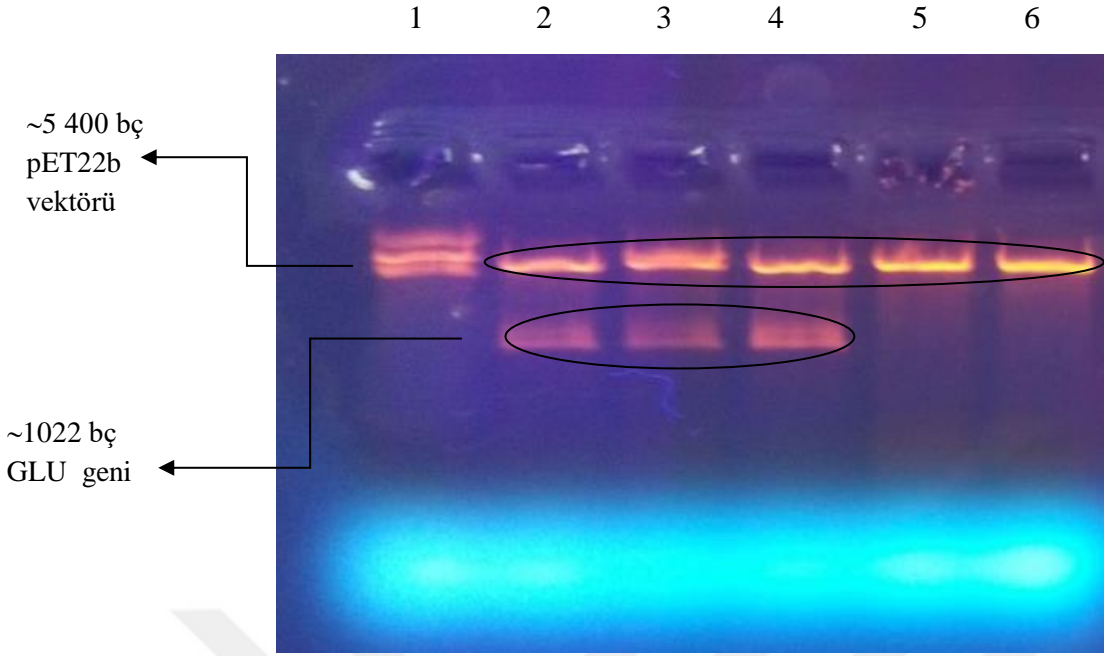
**Şekil 4.1.** KpnI ve BamHI enzimleri ile kesilmiş olan pBSKGLU plazmit DNA'sını agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonraki görüntüsü. 1. DNA marker. 3 – 5. Belirtilen enzimlerle kesilmiş  $\beta$ -Glukanaz genini taşıyan pBSKGLU plazmit DNA.

#### 4.2. Doğrulama Restriksiyon Kesimi

Restriksiyon enzim kesimi sonucu elde edilen  $\beta$ -Glukanaz geni ve vektör sistemler uygun restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra ligasyon işlemi gerçekleştirilir. Ligasyon işleminin ardından *E. coli* DH5 $\alpha$  suşu ile transformasyon işlemi yapılır. Transformasyon işlemi sonucu elde edilen ürünler içerisinde 4'er ml antibiyotik içeren LB besi yerlerine inoküle edilir. İnokülasyon sonucu elde edilen kültürden pplazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilir. Elde edilen plazmitler klonlamada kullanılan enzimlerle kesilerek doğrulama kesimi gerçekleştirilir. 2 saatlik kesim işleminin ardından kesilen ürünler agaroz jel elektroforezinde kontrol edilir.



**Şekil 4.2.** pET22bGLU plazmit DNA'sının kesim sonucu agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü; bu işlemde pET22bGLU plazmit DNA'sı *XhoI* ve *NcoI* enzimleri yardımıyla kesilmiştir. 2,3,4,5,6 ve 7 numaralı kuyucuklarda kesim sonucunda 1022 bç büyüklüğündeki Beta Glukanaz genini içeren pozitif plazmitler bulunmaktadır. 1 numaralı kuyucukta ise DNA marker kullanılmıştır. (Hyper Ladder 1kb)

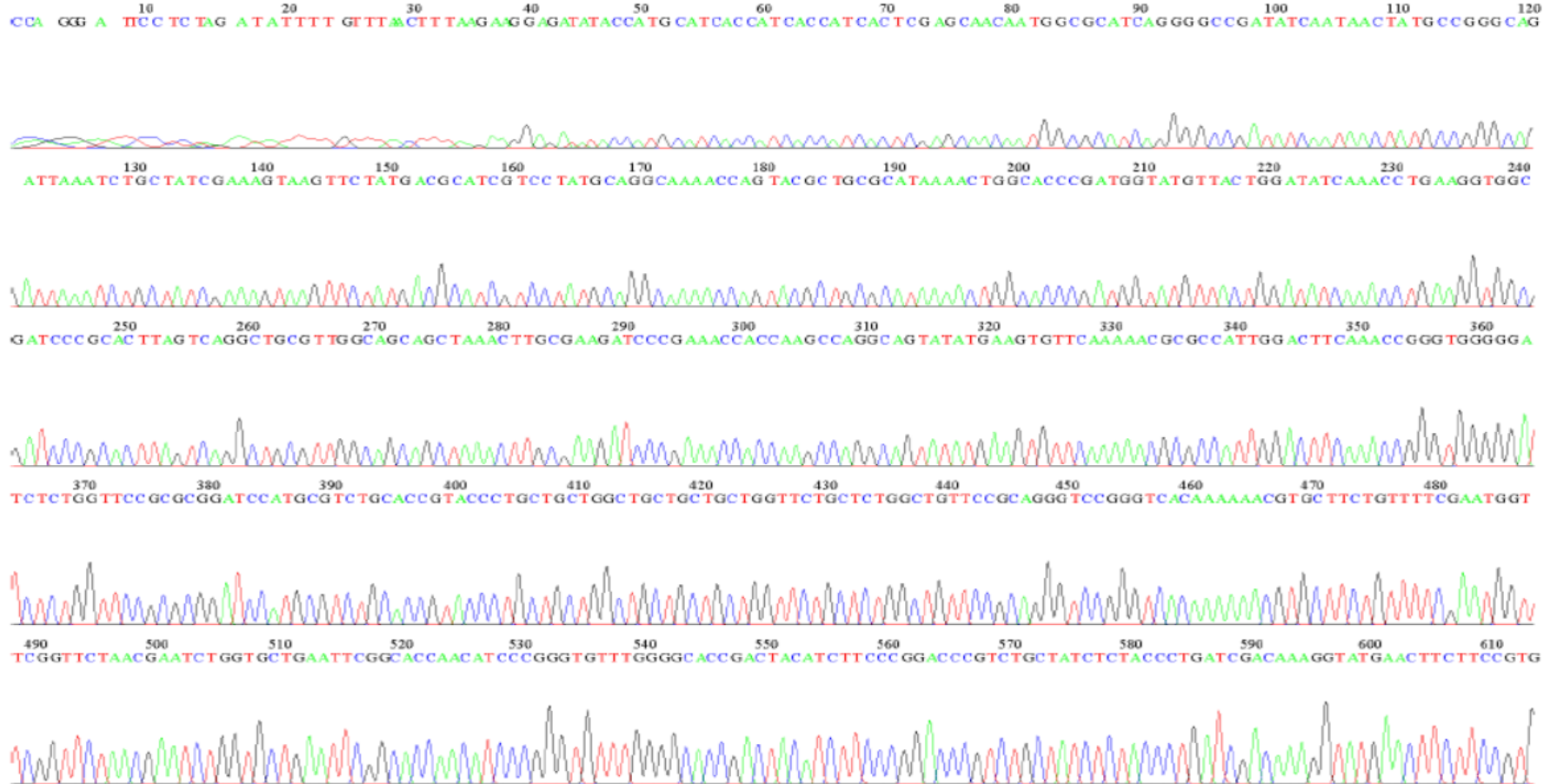


**Şekil4.3.** pTOLTGLU plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezindeki doğrulama kesiminin görüntüsü. *BamHI* ve *KpnI* enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. 2,3,4 numaralı kuyucuklarda bulunan örnekler kesim işlemi sonucunda elde edilen 1022 bç büyüklüğündeki Beta Glukanaz genini içeren pozitif plazmitlerdir. 1 kuyucukta ise DNA marker (Lamda *HindIII/EcoRI*) kullanılmıştır.



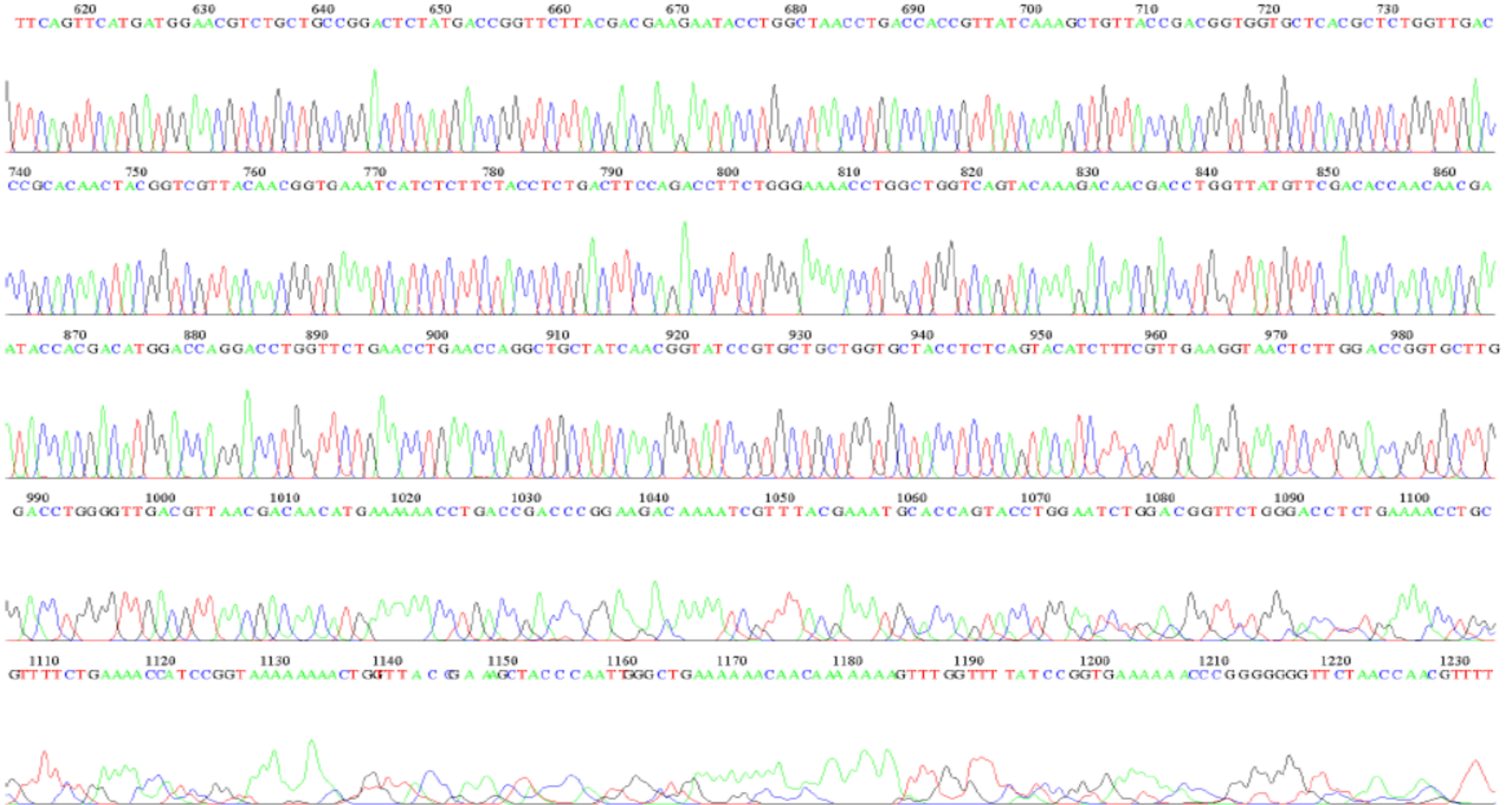
### 4.3. DNA DİZİLME

File: glu-10\_Ptolit\_I7promoter.ab1 Run Ended: 2015/9/10 15:19:28 Signal G:4631 A:4277 C:6828 T:5617  
Sample: glu-10\_Ptolit\_I7promoter Lane: 40 Base spacing: 16.059587 1454 bases in 17745 scans Page 1 of 2



Şekil 4.4. Doğrulama kesiminin ardından pozitif olduğu değerlendirilen 10 numaralı plazmit DNA'nın dizileme sonucu.

File: glu-10\_Ptolit\_I7promoter.ab1 Run Ended: 2015/9/10 15:19:28 Signal G:4631 A:4277 C:6828 T:5617  
Sample: glu-10\_Ptolit\_I7promoter Lane: 40 Base spacing: 16.059587 1454 bases in 17745 scans Page 2 of 2

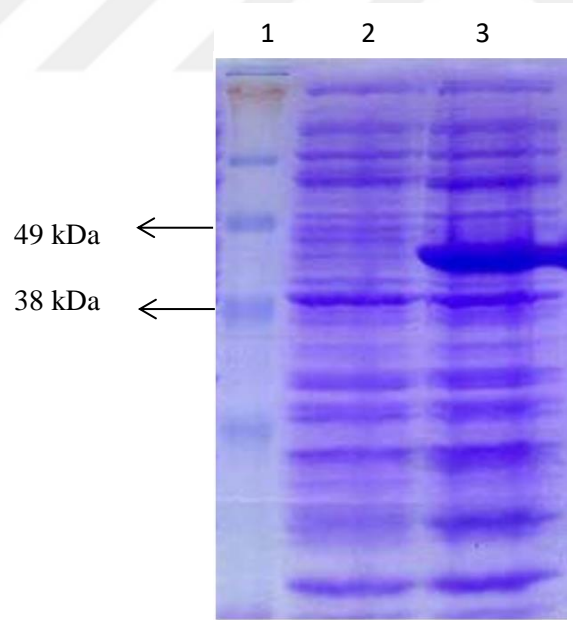


Şekil 4.4. (Devam) Doğrulama kesiminin ardından pozitif olduğu değerlendirilen 10 numaralı plazmit DNA'nın dizileme sonucu.

DNA dizilme sonuçlarının ışığında Beta Glukanaz enzimini kodlayan DNA fragmanının herhangi bir sorun ile karşılaşmadan klonlanabildiği ortaya çıkarılmıştır.

#### 4.4. Beta Glukanaz Enziminin Üretilmesi (İndükleme)

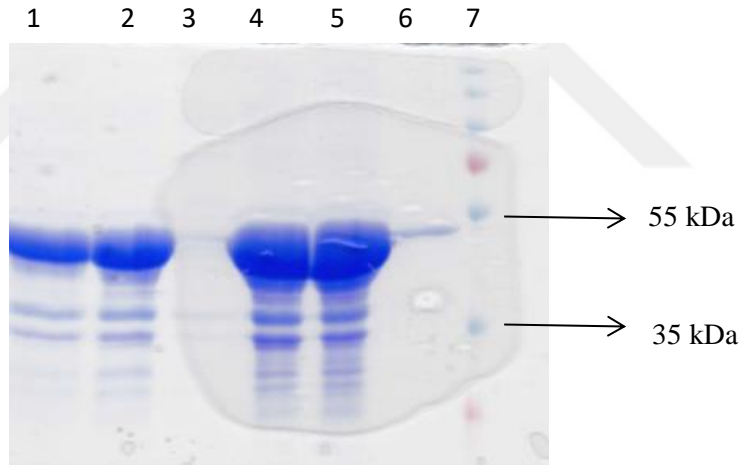
DNA dizileme işlemine gönderilen ve gelen sonuçlar doğrultusunda pozitif olduğu düşünülen plazmitlerden *E. coli* BL21 pLysE suşuna transfer gerçekleştirilmiştir. Sonrasında gerçekleştirilen transformasyon işleminin ardından petrilere ekimi yapılan kolonilerden birer koloni alınarak 4 ml'lik LB besi yeri ve antibiyotik içeren tüplere konulmuştur. Bu tüpler 37°C de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında bu kültür 50 ml'lik aynı koşullarda daha büyük bir besi yerine transfer edilerek 37°C'de ve 240 rpm de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ara ara yapılan kontroller sırasında OD<sub>600</sub> değeri 0,7 seviyesine eriştiği gözlemlendiği zaman IPTG le indükleme yapılmıştır. Bu işlemin ardından yaklaşık olarak 4 saat boyunca hücreler inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatlik sürenin ardından besi yerlerinden alınan numuneler SDS PAGE'de analiz edilmiştir.



**Şekil 4.5.** pTOLT vektör sisteminde yapılan ekspresyon sonucunda elde edilen SDS-PAGE görüntüsü 1. Protein marker (Bio-Rad dual color precision plus protein marker), 2. IPTG ile indüklenmeden önce *Origami* hücreleri, 3. IPTG ile indükledikten sonra *Origami* hücreleri

#### 4.5. Beta Glukanaz Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

İndükleme işleminin ardından  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan hücreler buz içerisinde sonikatör ile parçalanmıştır. Parçalama işleminin ardından 30000rpm ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat santrifüjlenmiştir. Bu sayede karışım içerisindeki hidrofobik proteinler ve hidrofobik hücre materyallerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Pelet kısımdan alınan örnekler SDS örnek yükleme tamponuyla çözülerek jele yüklenmiştir. Peletin etkin bir şekilde çözünmesi sağlanarak protein varlığının net olarak saptanması sağlanmaya çalışılmıştır. Süpernatant kısım ise afinite kromatografisi ile saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Saflaştırma işlemine Afinite Kromatografisi metodu kullanılmıştır. Bu metotta Kolon dolgu maddesi olarak Nİ-NTA agaroz rezin kullanılmıştır. Kolondan elüsyon için ise imidazol içeren Elüsyon tamponu kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen ürünler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Yapılan SDS-PAGE işlemi sonucunda Beta Glukanaz proteininin pelette olduğu anlaşılmıştır. Nihai elde edilmeye çalışılan proteinin inklüzyon cisimciği oluşturarak çöktüğü saptanmıştır.



Şekil 4.6. pTOLT vektör sisteminde yapılan ekspresyon sonrası SDS-PAGE görüntüsü. 1, 2, 4 ve 5 numaralı kuyucuklar yüksek hızda santrifüj sonrası elde edilen peletten alınan örnekler. 7. Protein marker (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder)

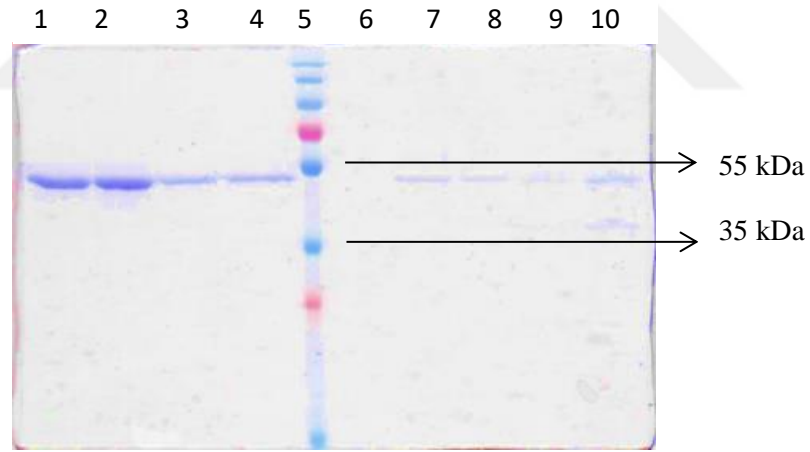
#### 4.6. Beta ,Glukanaz Enzimi İçin İnküzyon Cisimciği Oluşumunun Azaltılması

İnküzyon cisimciği oluşumunun engellenmesi amacıyla Origami hücreleri kullanılmış ve bu hücreler kompotent hale getirilmiştir. Sonrasında dizileme sonucunda pozitif olduğunu anlaşılan 10 numaralı plazmit ısı şoku ile Origami hücrelerine transfer edilmiştir. Sonrasında

37°C, 27°C ve 18°C olmak üzere üç farklı sıcaklık, 1mM ve 0,1 mM olmak üzere 2 farklı IPTG konsantrasyonu, M9 minimal besi yeri ve LB besi yeri olmak üzere iki farklı besi yeri ve bu değerlerin kombinasyonları kullanılarak origami hücreleri yetiştirilmiştir. Minimal besi yeri ve 18°C değerlerinde protein üretimi gerçekleşmemiş, LB besi yeri ve 37°C, 27°C değerlerinde ise protein çözümlü halde elde edilmiştir.

#### 4.7. Beta Glukanaz Enziminin Refolding(Yeniden Katlama) İşlemi ve Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

Refolding işlemi için 27°C ve LB besiyerinde Büyütülen hücreler kullanılmıştır. Bu hücre kültürlerinin OD:0,7 olduğunda indüklemeye işlemi 0,1 mM IPTG ile yapılmış ve indüklemeye işlemi 6 saat süreyle devam ettikten sonra 6. Saatin sonunda hücreler toplanmıştır. Toplanan bu hücreler sonikatör ile parçalanmıştır. Parçalama sonrası santrifüj işlemi ile toplanan pelet kısım için refolding prosedürü uygulanmıştır. Sonrasında afinite kromatografisi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma sonucu elde edilen örnekler SDS PAGE ile analiz edilmiştir.



Şekil 4.7. Refolding işlemi sonrası yapılan saflaştırma işleminin SDS-PAGE görüntüsü 1-4. ve 6-10. kuyucular afinite kromatografisi sonucunda elde edilen örnekler, 5. Protein marker (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder)

#### 4.8. Beta Glukanaz Enzimin Aktivite Tayini

Refolding işlemi sonrasında saflaştırma işlemi gerçekleştirilen endo-β-1-4-Glukanaz enziminin aktivite tayini DNS (3,5-dinitrosalsilik asit) yöntemi ile belirlenmiştir. 2 farklı ependorf tüpü içerisine Substrat olarak %1 arpa β-glukan (sigma) çözeltisi

kullanılmıştır. Saflaştırılan enzim ve substrat çözeltisi karıştırılmış ve 60°C sıcaklıktaki su banyosunun içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Kontrol olarak enzim yerine protein saflaştırma işlemlerinde kullanılan tampon çözelti kullanılmıştır. Daha sonra 1:1 oranında DNS çözeltisi ilave edilip 5 dk kaynatılmış ve bu işlemler sonucunda ependorf tüplerinde oluşan renk değişimleri analiz edilmiştir. Tüpler soğutulduktan sonra spektrofotometrede 540 nm’de ölçüm alınmıştır.



Şekil 4.8. Üretim ve saflaştırma işlemlerinin ardından yapılan enzim aktivite testi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hayvancılık, geçmişten bugüne kadar insanların besin piramidinde en önemli temel besin maddelerinin üretilmesini sağlamıştır. Bu özelliğinin dışında bitkisel üretim ve endüstriyel alanda oluşan artıklar gibi ürünlerin değerlendirilmesi ve bu ürünlere istihdam alanı yaratma konusunda ekonomik ve toplumsal görevlere de sahiptir. Dünya nüfusunda hızla gerçekleşen artış hayvansal ürünlere karşı olan talebi sürekli artırdığı için, hayvancılık faaliyetlerinin ülke ekonomilerindeki yerleri ve önemi gün geçtikçe artacaktır.

Ülkelerdeki hayvancılık sektörünün gelişmesi veya et, süt, yumurta gibi temel hayvansal gıdaların üretimini artırılmasının sağlanması amacıyla, yüksek oranda verim veren ırkların kullanılmasının yanısıra, hayvanlar kendileri için gerekli olan besin maddelerini de yeterli ve dengeli bir oranda almalıdırlar. Bu bağlamda yüksek oranda verim elde edilen büyükbaş hayvanların veya kanatlı kümes hayvanlarının 40'tan fazla besin maddesi ihtiyaçlarının bir iki yem ile karşılanmaya çalışılması imkansızdır. Hayvanlarda yetersiz ve dengesiz beslenmeye bağlı olarak oluşabilecek sağlık sorunlarının önüne geçilmesi, daha çok miktarda ve daha nitelikli düzeyde hayvansal ürünlerin elde edilmesi için hayvanların beslenmesinde yeterli miktarda yem kullanımı büyük ölçüde önem taşımaktadır. Bu sebeple hayvancılık faaliyetleri gelişmiş ülkelerde, yem endüstrisinin tarih boyunca büyük gelişmeler gösterdiği bilinmektedir. Bunun yanısıra yem endüstrisi alanında gerçekleşen teknolojik ilerlemeler, yem endüstrisinin hayvansal kaynaklı üretime katkısını daha da büyük boyutlara taşımıştır(Karabulut. A., ve ark.2000. ).

Hayvancılık sektöründe yılın her döneminde otlak arazilerde hayvanların beslenmesi mümkün olmadığı için yem kullanılması kaçınılmazdır. Hayvancılık sektörü ile uğraşanlar tarafından istenilen durum ise yem ile besleme sırasında da elde edecekleri verimden bir kayıp olmadan faaliyetlerinin devam etmesidir. Ama enzim kullanımı gerçekleştirilmeden üretimi gerçekleştirilen yemlerden hayvanların maksimum ölçüde fayda sağlaması mümkün değildir. (Nuray. N., Yılmaz. T.A, 2012). Bu ölçüde hayvanların yemden elde edecekleri verimi yüksek tutmak için enzim kullanımı kaçınılmazdır.

Rekombinant olarak enzim üretimi ülkemizde çok yaygın olarak gerçekleştirilen bir üretim prosedürü değildir. Halbuki doğal yollardan enzim eldesine göre daha az maliyetli ve daha kısa sürede kesin sonuçlar veren ve devamlılığı olabilen bir üretim tekniğidir. Tez çalışması kapsamında üretilmesi planlanan  $\beta$ -glukanaz enzimi rekombinant olarak üretililecektir. Bu sayede doğal yollardan elde edilen  $\beta$ -glukanaz enzimine göre daha ucuza üretililecektir.

*E. coli* ve benzeri prokaryotik ekspresyon sistemleri rekombinant enzim üretim proseslerinde sıkça kullanılan sistemlerdir. Sıklıkla kullanılmalarının başlıca sebepleri bu hücrelerin hızlıca büyüebilmeleri, basit tekniklerle saflaştırılabilmeleri, kolaylıkla çoğaltılabilmeleri ve en önemli sebeplerden birisi olan nispeten daha ucuz olmalarıdır. Fakat *E. Coli* ve benzeri tek hücreli prokaryot canlılar bazı post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirememektedir. Bu post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştirilememesi ve bunun yanı sıra üretilmesi istenen proteinin büyüklüğü, hidrofobik özelliği gibi nedenlerden dolayı üretimi sağlanan proteinler çözünmemiş bir formda inklüzyon cisimciği oluşturabilirler. Bu durumda işlevsel olmayan bir protein elde edilmiş olur. Üretim koşullarında yapılacak bazı değişiklikler ile inklüzyon cisimciği oluşumu engellenebilir (sıcaklık değerinin değiştirilmesi, besi yeri içeriğinin değiştirilmesi vb.). Gerçekleştirilmiş olan bu tez çalışmasında da nihai ürün olan Beta Glukanaz enziminin ekspresyon çalışmaları sırasında inklüzyon cisimciği oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu yapıdan kurtulup aktif olarak proteini elde edebilmek için refolding (yeniden atlanma) işlemi yapılmıştır. Bu sayede proteinin aktif olarak elde edilmesi sağlanmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasının nihai sonucu olarak Beta Glukanaz enzimi saf ve yapılan testler sonucunda anlaşıldığı üzere aktif bir şekilde elde edilmiştir. Üretimi gerçekleştirilen bu enzim ticari anlamda yem katkı maddesi olarak kullanılabilir formda üretilmiştir. Bu sayede hayvanların yemden maksimum oranda faydalanması sağlanabilecektir. Rekombinant olarak üretimi sağlanan bu enzim emsallerine göre daha ucuz bir maliyetle üretildiği için yem katkı maddesi olarak kullanılması durumunda yem fiyatlarında da doğru orantılı olarak düşüşü sağlayabilecek niteliktedir. Fakat önemli ve gerekli olan nokta bu enzimin üretiminin seri üretim şeklinde gerçekleştirilebilmesi ve hayvancılık sektörünün kış aylarında mali yükten kurtulup rahat bir nefes alabilmesinin sağlanmasıdır. Seri üretim öncesinde ise karşılaşılan pürüzler ile tekrardan karşılaşmamak adına üretim proseslerinin optimum şartlarının net olarak belirlenmesi gerekmektedir.



## 6.KAYNAKLAR

- Aşan, M., 2002. Genetik mühendisliği teknikleri ile yem katkısı kanatlı probiyotiklerinin oluşturulması, yüksek lisans tezi, çukurova üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, adana, 77s.
- Akita, M., Kayatama, K., Hatada, Y., Ito, S., And Horikoshi, K. 2005. A novel  $\beta$ -glucanase gene from *bacillus halodurans* c-125. *fems microbiology letters*. 248:9-15.
- Aşan M. ve Özcan N., 2007. expression of the  $\beta$ -(1,3-1,4)-glucanase gene in *streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. *turk. j. vet. anim. sci.*, 31(5): 319-324
- Anderluh, G., Gokce, I., Lakey, J.H., 2003. expression of proteins using the third domain of the escherichia coli periplasmic-protein tola as a fusion partner, protein expression and purification, 28, 173-81.
- Anonim, 2014a. <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1aq0.html>
- Anonim,2014b.<http://biocpd2.biodesign.asu.edu:8080/DNASURerepository/file/map/pET28.pd>
- Anonim, 2014c. <https://www.addgene.org/12651/>
- Bhat, M.K., Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15: 583-620.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advences*. 18 (5): 355-458.
- Chaari, F., Bhiri F., Blibech M., Maktouf S., Chaabouni S. E., Ghorbel R.E., 2012. potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *bacillus licheniformis* ueb cf: purification and characterization. *process biochemistry*, 47:509-516.
- Çiftçi İ. 2001. yem katkı maddesi olarak enzimler, çiftlik hayvanlarının beslenmesinde temel prensipler ve karma yem üretiminde bazı bilimsel yaklaşımlar. *farmavet ilaç sanayi ve ticaret a.ş. istanbul*, 543-583.
- Demain, A.L. ve Solomon, N.A., 1981. in industrial microbiology and the advent of genetic engineering, pp. 3-14. scientific american, freeman&comp., san francisco
- Ekinci, M.S., Mccrae, S.I., and Flint, H.J., 1997. isolation and overexpression of a gene encoding an extracellular  $\beta$  -(1,3-1,4)-glucanase from *streptococcus bovis* jb1. *appl. environ. microbiol.*, 63: 3752-3756
- Firidin Ş. yunus araştırma bülteni yıl 10 salı 3 eylül 2010
- Furtado, G.P., Ribeiro, L.F., Santos, C. R., Tonoli, C. C., Souza, A. R., Oliveira, R.R., Murakami, M. T., Ward, R. J., 2011. biochemical and structural characterization of a  $\beta$ -1,3–1,4-glucanase from *bacillus subtilis* 168. *process biochemistry*,46:1202-1206.
- Gümüşel, F. 2002. biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. *kocaeli sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi*. s. 73-135.
- Guda, C., Zhang, X., McPherson, D.T., Xu, J., Cherry, J.H., Urry, D.W., Daniell, H., 1995. hyper expression of an environmentally friendly synthetic polymer gene. *biotechnol. lett.*, 17,745–750.
- Hanahan, D., 1985. techniques for transformation of e. coli. in *dna cloning: a practical approach*, ırl press, oxford, united kingdom, 1, 109-135
- Inoue, H., Nojima, H., ve Okayama, H., 1990. high efficiency transformation of escherichia coli with plasmids. *gene*, 96, 23-28.
- John, F.K., 1987. enzyme technology. *biotechnology*, vol 7a. newyork. p. 37-62
- Kırık, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002. industrial enzyme applications. *current opinion in biotechnology*, 13: 345-351
- Krishna, S.H., Rao, K.C.S., Babu, J.S., Reddy, D.S. 2000. studies on the production and application of cellulase from *trichoderma reesei* qm-9414. *bioprocess engineering* 22: 467-470.

- Kitamura, E. ve Kamei, Y., 2006. molecular cloning of the gene encoding  $\beta$ -1,3-(4)-glucanase a from a marine bacterium, *pseudomonas* sp. pe2, an essential enzyme for the degradation of *phytium porphyrae* cell walls. *appl. microbiol. biotechnol.*, 71: 630-637.
- Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O., Schoemaker, H. 2001, 6.54.2.10 industrial use of enzymes, *unesco encyclopedia of life support systems*.
- Li, X., YU, H. Y. 2012. purification and characterization of an organic-solventtolerant cellulase from a halotolerant isolate, *bacillus* sp. 11. *journal industrial microbial biotechnology*, 10295-012-1120-2.
- Liming, X. And Xueliang, S. 2004. high-yield cellulase production by *trichoderma reesei* zu-02 on corn cob residue. *bioresource technology*. 91:259-262.
- Laemmli, U.K., 1970. cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *nature*, 227 (5259), 680–685
- Kim, J.Y., 2003. overproduction and secretion of *bacillus circulans* endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene (*bglbc1*) in *b. subtilis* and *b. megaterium*. *biotechnol. lett.*, 25: 1445-1449.
- Minussi, R.C., Pastore, G. M., Duran, N. 2002, potential applications of laccase in the food industry, *trends in food science and technology*, 13: 205-216.
- Nır I, Şenköylü N. kanatlılar için sindirimi destekleyen yem katkı maddeleri, 208 s.. 2000.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., And Antranikian, G., 1999. extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *app microbiol biotechnol*, 51:711-729
- Qiao, J., Dong, B., Li, Y., Zhang, B., Cao, Y., 2009. cloning of a  $\beta$ -1,3-1,4–glucanase gene from *bacillus subtilis* ma139 and its functional expression in *escherichia coli*. *appl biochem.biotechnol.*,152:334-342.
- RAO, B.M., TANKSALE, M.A., GHATHE, S.M., And DESHPANDE, V.V., 1998. molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *microbiology and molecular biology reviews*. 62 (3):597-635.
- Sarıtürk S., 2012.  $\beta$  -1,4-endoksilanaz ve  $\beta$  -(1,3-1,4)-glukanaz enzimlerini üreten *bacillus* sp. izolasyonu, enzimlerin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., 2013. brenda in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in brenda. *nucleic acids research*, 41, 764-772.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P., 2004. developments in the use of *bacillus* species for industrial production. *canadian journal of microbiology*, 50: 1-17.
- Smith, J.E.,1996. *biotechnology*. chambridge university pres, chambridge, 233s.
- Taberero, C., Coll, P.M., Fernandez-Abalos, J.M., Perez, P., And Santamaria, R.I., 1994. cloning and dna squencing of bgaa, a gene encoding an endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanase, from an alkalophilic *bacillus* strain (n137). *appl. environ. micribiol*. 60,1213-1220.
- Teng, D., Wang, J., Fan, Y., Yang, Y., Tian, Z., Luo, J., Yang, G., Zhang, F., 2006. cloning of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene from *bacillus licheniformis* egw039 (cgicc 0635) and its expression in *esherichia coli* bl21 (de3). *appl. microbiol. biotechnol*, 72:705-712.
- Viladot. J.L., ve ark 2001. “long-lived glycosyl-enzyme intermediate mimic produced by formate re-activation of a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile”
- Wiseman, A., 1987. *handbook of enzyme biotechnology*. second edition.chapter3. the application of enzymes in industry, p.274-373.
- Wolfgang, A. 2004. *enzymes in industry: production adapplications*. wiley-vch verlag gmbh&co. kga, weinheim.
- Zhang, X.Y., Ruan, H., Mu, L., He, G., Tang, X.J., And Chen, O.H. 2006. enhancement of the thermostability of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase by directed evolution. *j zhejiang univ science a* .7(11):1948-1955.

## 7.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : İskender ŞAHİNGÖZ  
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.04.1992 Boğazlıyan  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 05393059036  
e-mail : iskender675@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü	09.06.2014

### Yürüttüğü Projeler

- Single-Stranded Binding Protein (SSB) Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Proje Yürütücüsü, Bideb 2241-A Tübitak, Tamamlandı-2014)
- Endüstriyel Kullanım Amaçlı *A.niger* Beta Glukanaz Enziminin E.coli de Üretilmesi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Proje Yürütücüsü, Bideb 2210-C Tübitak, 2015)

### Aldığı Burslar ve Ödüller

- 2015-1 dönemi TÜBİTAK 2210 C öncelikli alanlara yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı (Bursiyer)
- Bölgesel İnovasyon Yarışması ve Proje Pazarı (Orta Karadeniz Kalkınma Ajansı, 13 Mayıs (2015), Amasya, Proje Sunumu) (Birincilik Ödülü)
- Farklı Flüoresans Proteinlerin Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması Ve Boyar Madde Olarak Boya Duyarlı Güneş Pillerindeki Kullanılabilirliğinin Araştırılması (TÜBİTAK ARDEB 1001 (Proje Çalışanı- 2015-2017)