T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bacillus subtilis ATCC 6051'den α-AMİLAZIN KLONLANMASI ve KARAKTERİZASYONU

Besi SERİN

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Eylül 2014

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Besi SERİN tarafından yapılan "*Bacillus subtilis* ATCC 6051'den α-Amilazın Klonlanması ve Karakterizasyonu" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı
Başkan:	Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Üye :	Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL
Üye :	Prof. Dr. Kemal GÜVEN
Üye :	Prof. Dr. Fikret UYAR (Danışman)
Üye :	Doç. Dr. Veysel TOLAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 29/09/2014

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

Doç.Dr. Mehmet YILDIRIM

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Akademik hayata başladığım ilk günden beri danışmanlığımı yaparak bana emek veren, bilgi ve tecrübesiyle beni bir bilim adamı gibi düşünmeye cesaretlendiren, bana bilimi sevdirerek yaşanılacak bir macera gibi görmemi sağlayan, Saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Fikret UYAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Dinamik araştırmacı profiliyle beni yönlendiren, özverili yardımlarıyla çalışmalarıma destek olan, Kafkas Üniversitesi'ndeki laboratuar imkanlarından faydalanmamı sağlayan ve aynı zamanda ikinci danışman hocam olan Yrd. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ'e teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımın büyük bir kısmını gerçekleştirdiğim İsveç Lund Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Hücre Biyolojisi bölümünde projeme destek sunarak bana danışmanlık yapan, sabır ve hoşgörüyle yol gösteren değerli hocalarım Senior Lecturer Claes von WACHENFELDT ve Prof. Dr. Susanne WIDELL'e, teşekkür ederim.

Lund Üniversitesi laboratuarında beraber çalıştığım, fedakarlığı ve enerjisiyle beni cesaretlendiren, yardım eden değerli arkadaşım, Yusra AL-ERYANI'ye teşekkür ederim.

Önerileriyle deneylerime yön vermemi ve analitik düşünmemi sağlayan laboratuar arkadaşlarım, Dr. Sai Sham NARAYANAN, Dr. Fernando SORROCHE, Jakob ENGMAN, Ewa BUKOWSKA, Kerstin FIEGE ve Madelene ISAKSSON'a teşekkür ederim.

Akademik bilgilerinden her zaman faydalandığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL ve Doç. Dr. Veysel TOLAN'a teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımda fikirleriyle bana destek veren değerli arkadaşım Dr. Ömer ACER'e teşekkür ederim.

Bana sağladığı toleransıyla akademik hayata başlamamda büyük bir unsur olan, yaptığı iyilikleri asla unutmayacağım, her zaman kahramanım dediğim, yüreği güzel insan Uz. Dr. Delal Emine AYÇİÇEK'e teşekkür ederim.

Bana her zaman moral vererek destek olan değerli dostlarım Aynur SEZGİN ve Nohbet ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım için bana evinde rahat bir çalışma ortamı sağlayan değerli kardeşim Ciwan SERİN ve eşi Çimen SERİN'e teşekkür ederim.

Yaşamıma anlam katan, bana inanan, güvenen, destek olan babam Cezair SERİN, annem Sevim SERİN, kardeşlerim Evin, Zelal, Gülistan, Neçirvan SERİN, enişte lerim Burhanettin ERDİNÇ ve Mazlum KARABİBER'e sonsuz teşekkür ederim.

Doktora projeme vermiş olduğu maddi destekten dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (DÜBAP/13-FF-45) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR……....		I
İÇİNDEKİLER…….....		II
ÖZET…….....		VII
ABSTRACT…….....		VIII
ÇİZELGE LİSTESİ……...		IX
ŞEKİL LİSTESİ…….		X
EK LİSTESİ…….....		XII
KISALTMA VE SİMGELER……...		XIII
1.	**GİRİŞ**……	1
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**……	5
2.1.	Enzimlerin Endüstriye Girişi…….	5
2.2.	Endüstriyel Enzimlerin Küresel Pazardaki Değeri……	8
2.3.	Enzimlerin Geliştirilmesi…….....	8
2.4.	Mikrobiyal Enzimler……..	11
2.5.	*Bacillus subtilis* ve *Bacillus* Türlerinin Endüstride Kullanımı……..	14
2.6.	Amilazlar……	17
2.7.	Amilazların Sınıflandırılması…….	19
2.8.	Amilazların Substratı Nişasta…….	22
2.9.	α-Amilazlar……	24
2.10.	α-Amilazın Üç Boyutlu Yapısı……..	26
2.11.	α-Amilazın Reaksiyon Mekanizması…….	29
2.12.	α-Amilazın Endüstriyel Uygulamaları……...	30
2.13.	α-Amilaz Geninin Klonlanması…….	32

2.14.	Rekombinant Enzim Üretiminin Avantajları…….	34
2.15	Önceki Çalışmalar……..	35
3.	**MATERYAL VE METOT**…….	51
3.1.	Biyolojik Materyal ……	51
3.2.	Kültür Ortamları ……	51
3.2.1.	TBAB (Tryptose Blood Agar Base) ……..	51
3.2.2.	LB (Luria Bertani)……..	52
3.2.3.	LA (Luria Bertani Agar)……	52
3.2.4.	LB Ampisilin …….....	52
3.2.5.	LB Kanamisin …….....	52
3.2.6.	LA Ampisilin...……..	53
3.2.7.	LA Kanamisin ….……..	53
3.2.8.	TBAB Nişasta……	53
3.2.9.	LA Nişasta…….	54
3.2.10.	SOC Besiyeri…….	54
3.3.	Amilaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler…….	55
3.3.1.	Sodyum Fosfat Tamponu……...	55
3.3.2.	Substrat Çözeltisi……...	55
3.3.3.	DNS'nin Hazırlanması……..	55
3.4.	Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler……	55
3.4.1.	Alkalin Çözeltisi……	55
3.5.	DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler……..	56
3.5.1.	TE Tamponu……..	56
3.5.2.	SE Tamponu……..	56
3.5.3.	%10 SDS……	56
3.5.4.	Lizozim……..	56
3.5.5.	RNaz…….....	56

3.5.6. $NaClO_4$……..... 56

3.5.7. Kloroform-İzoamilalkol……..... 57

3.5.8. Çözücü Solüsyon (Resuspend Solution)…… 57

3.6. Agaroz Jel Çözeltileri……. 57

3.6.1. Agaroz Jelin Hazırlanması……..... 57

3.6.2. 50X TAE Tamponu……... 57

3.6.3. 1X TAE Tamponu…… 57

3.7. Protein İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler……..... 58

3.7.1. TES……..... 58

3.7.2. Lizozim……..... 58

3.7.3. Deterjan Kokteyli……..... 58

3.8. Kullanılan Kimyasallar…….. 58

3.9. Kullanılan Cihazlar…… 59

3.10. Kullanılan Kitler……..... 59

3.11. Kullanılan Moleküler Belirteçler……... 59

3.12. Lugol Testi……..... 59

3.13. Amilaz Aktivite Tayini……..... 59

3.14. Protein Miktar Tayini……. 60

3.15. Genomik DNA İzolasyonu……. 61

3.16. Agaroz Jel Elektroforezi……..... 62

3.17. Primer Dizaynı……..... 63

3.18. PCR (Polymerase Chain Reaction)……..... 67

3.18.1. PCR Reaksiyonu……..... 68

3.18.2. PCR Programlama……..... 68

3.19. PCR Ürününün Jelden Saflaştırılması……... 69

3.20. Klonlama Vektörünün Seçimi……... 70

3.20.1. Klonlama Vektörü pDG148' in Saflaştırılması……..... 70

3.20.2. Klonlama Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi……..... 71

3.20.3. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pDG148'in Jelde Görüntülenmesi…..... 72

3.21. pCR Blunt II TOPO Klonlama……..... 72

3.21.1. pCR TOPO amyE Klonunun Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi……..... 73

3.21.2. pCR TOPO amyE Klonlarının EcoRI İle Kesimi……..... 74

3.21.3. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pCR TOPO-amyE Klonunun Jelden Kesimi……..... 74

3.22. pDG148-amyE Ligasyonu……..... 75

3.23. amyE Geninin Ekspresyonu……... 76

3.23.1. RNA İzolasyonu…… 76

3.23.2. cDNA'nın Eldesi……..... 77

3.23.3. RT-PCR ve Jelden Saflaştırma……..... 77

3.23.4. amyE Geni cDNA'sının Ligasyonu ve Transformasyon……..... 77

3.23.4.1. Ligasyon……..... 78

3.23.4.2. Transformasyon……..... 78

3.23.5. Protein İzolasyonu ve Saflaştırma……..... 79

3.23.5.1. Protein İzolasyonu……..... 79

3.23.5.2. Saflaştırma……..... 80

3.23.6. SDS-PAGE Analizi ve Western Blotlama……..... 81

3.23.6.1. SDS-PAGE……..... 81

3.23.6.2. Western Blot Analizi……..... 81

4. ARAŞTIRMA BULGULARI……..... 83

4.1. Lugol Testi……..... 83

4.2. Amilaz Aktivite Tayini……..... 83

4.3. İzole Edilen Genomik DNA'nın Saflık ve Konsantrasyon Kontrolü……..... 84

4.4. Agaroz Jel Elektroforez……..... 84

4.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi……..... 85

4.6. PCR Optimizasyonu……..... 87

4.7. PCR Ürününün Jelden Saflaştırılması…….. 88

4.8. Klonlama Vektörünün Seçimi…….. 89

4.9. Plazmid pDG148'in Saflığının Kontrolü……..... 90

4.10. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pDG148'in Agaroz Jelde Görüntülenmesi……..... 90

4.11. pCR Blunt II TOPO Klonlama……..... 91

4.12. pCR TOPO-amyE Klonlarının Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi……... 93

4.13. pCR TOPO-amyE Klonlarının EcoRI İle Kesimi…….. 94

4.14. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pCR TOPO-amyE Klonlarının Jelden Kesimi…… 95

4.15. pDG148 amyE Ligasyonu……..... 96

4.16. Ekspresyon Vektörünün Seçimi……. 97

4.16.1. Amilaz Geninin Ekspresyon Plazmitine Aktarılması…… 97

4.17. Biyoinformatik Karakterizasyon…… 98

4.17.1. Dizi Analizi Sonuçları…… 99

4.17.2. amyE Geninin Tahmini Protein Dizisi…….. 102

4.17.3. amyE Geninin Tahmini Üç Boyutlu Yapı Analizi……. 103

4.17.4. Filogenetik Analizler……. 104

4.18. Amilazın Rekombinant Proteininin Ekspresyonu……..... 105

4.19. SDS-PAGE Sonucunun Western Blot Analizi İle Doğrulanması……..... 105

5. TARTIŞMA VE SONUÇ……... **107**

6. KAYNAKLAR……..... **113**

EKLER……..... 125

ÖZGEÇMİŞ……. 135

ÖZET

Bacillus subtilis ATCC 6051'den α-AMİLAZIN
KLONLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Besi SERİN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2014

Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte enzim teknolojisi de gelişmektedir. Enzim teknolojisi, endüstriyel öneme sahip enzimlerin daha saf, ucuz ve bol miktarda üretilmelerine olanak tanımaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler endüstriyel sahada yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6051 kullanılmıştır. Bakterinin bol miktarda α-amilaz üretebilmesi, tüm genom yapısının bilinmesi ve stabil olması nedeniyle klonlama ve saflaştırma çalışmaları için kullanılabileceğine karar verilmiştir. Bunun için gen kütüphanesinden *Bacillus* türlerine ait α-amilaz geni taranarak primer dizayn edilmiştir. *Bacillus subtilis* ATCC 6051'in genomik DNA'sı izole edilmiş ve α-amilaz gen bölgesi PCR'da amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jelde ve nanodropta saflık kontrolleri yapıldıktan sonra 3519 bç uzunluğundaki pCR-Blunt II TOPO klonlama kitine aktarılmıştır. Klonlama vektörü olarak 8274 bç uzunluğundaki pDG148 plazmidi kullanılmıştır. PCR ürünü, pCR-Blunt TOPO klonlama kitinden HindIII ve SphI restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ve aynı enzimlerle kesilmiş olan klonlama vektörü pDG148'e klonlanmıştır. Böylece 10 244 bç uzunluğunda pDG148-Bs-amyE klonu elde edilmiştir. Genin ekspresyonu için 6xhis takısı bulunan pET16b ekspresyon vektörü olarak seçilmiş, amyE geni bu vektöre aktarılmış ve *Escherichia coli* BL21(DE3) kompetan hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Ardından amilaz proteininin izolasyonu ve saflaştırması yapılmıştır. Saflaştırma için histidin affinitesi gösteren Ni-NTA agaroz kullanılmıştır. Saflaştırılan proteinin SDS-PAGE'de molekül ağırlığı 67 kDa olarak tespit edilmiştir. Saflaştırılan proteinin doğru protein olduğu, Western blot analizleriyle teyit edilmiştir. Amilaz üretiminden sorumlu amyE geninin ifade ettiği proteinin tahmini üç boyutlu yapısı, daha önce kristal yapısı tanımlanmış amilaz ile SWISS-MODEL programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Klonlanan genin biyoinformatik analizlerinde, *Bacillus subtilis* sp. amyE genine %99 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu sonuç hedeflenen genin başarılı biçimde klonlandığını göstermiştir. amyE geninin ifade ettiği proteinin tahmini amino asit dizisi Genetool programı kullanılarak elde edilmiştir. Dizinin yaklaşık 659 amino asit dizisinden oluştuğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus subtilis*, α-amilaz, klonlama, saflaştırma, western blot

ABSTRACT

CLONING and CHARACTERIZATION of α-AMILAZ
from *Bacillus subtilis* ATCC 6051

PhD THESIS

Besi SERİN

DEPARTMENT of BIOLOGY
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY of DICLE

2014

The enzyme technology is also evolving with today's emerging technologies. The enzyme technology allows to produce cheaper, more pure and abundantly industrially important enzymes. Enzymes obtained from microorganisms are widely used in the industrial field. *Bacillus subtilis* ATCC 6051 was used in this study. Because of producing a large amounts of α-amylase, known all genome structures and its being stable, it was used for cloning and purification. For this, screening primer was designed after detection the gene belonging to *Bacillus* α-amylase from gen library. The genomic DNA of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 was isolated and α-amylase gene was amplified by PCR. The resulting PCR products were controlled in agarose gel and purity NanoDrop then was transferred to 3519 bp long pCR-Blunt II TOPO cloning kit. pDG148 cloning vector plasmid was used in the 8274 bp long. PCR product from pCR-Blunt II TOPO cloning kit cut with restriction enzymes HindIII and SphI and pDG148 cloning vector cut with the same enzymes to have been cloned. Thus 10 244 bp long pDG148-Bs-amyE clone was obtained. For the gene expression, 6xhis tag relating pET16b was chosen as an expression vector and amyE gene of the vector was transferred to *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cells. Then the isolation and purification of amylase protein was performed. For the purification, Ni-NTA agarose showed affinity of histidine was used. The molecular weight of purified protein was determined as 67 kDa by SDS-PAGE. The purified protein was confirmed to be correct protein with Western blot analysis. The estimated of three dimensional structure of protein expressed by amyE gene responsible for amylase production was compared to amylase previously defined crystal sturucture using SWISS-MODEL program. Bioinformatics analysis of the cloned gene showed that 99% homology to *Bacillus* sp. amyE gene. These result showed that targeted gene was cloned successfully. The estimated of amino acid sequence of protein expressed by AmyE gene was obtained using Genetool programme. The protein was determined to consist of about 659 amino acid sequences.

Keywords: *Bacillus subtilis*, α-amylase, cloning, purification, western blot

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1.	Önemli endüstriyel enzimler ve bazı karakteristikleri	7
Çizelge 2.2.	Mikrobiyal enzimler	12
Çizelge 2.3.	Seçilen bazı *Bacillus* türleri ve *Bacillus subtilis*'te exprese edilmiş insan hormon proteinleri	16
Çizelge 2.4.	Amilazlar	20
Çizelge 2.5.	Klonlanan bazı α-amilazlar	33
Çizelge 3.1.	Amilaz geninin amplifikasyonu için hazırlanan program	68
Çizelge 4.1.	Bakterilerin spesifik aktiviteleri	84
Çizelge 4.2.	pCR TOPO-amyE klonlarının saflık ve konsantrasyon sonuçları	92

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.1.	Biyoteknoloji renk kodları	1
Şekil 1.2.	Dünyadaki biyoteknoloji şirketlerinin sayısı	2
Şekil 2.1.	Küresel ve endüstriyel enzim pazarı	8
Şekil 2.2.	Klasik ve mevcut enzim geliştirme sürecinin karşılaştırılması	9
Şekil 2.3.	Biyokatalizörün geliştirilmesi	10
Şekil 2.4.	*Bacillus subtilis*	15
Şekil 2.5.	α-amilaz, β-amilaz ve glukoamilazın üç boyutlu yapıları	18
Şekil 2.6.	Amilaz ailesindeki bazı enzimlerin fonksiyonları	21
Şekil 2.7.	Amiloz ve amilopektinin yapısı	22
Şekil 2.8.	Nişasta parçalayan enzimler	23
Şekil 2.9.	Nişastadaki dallanmış limit dektrinler ve enzimle hidrolizi	24
Şekil 2.10.	CAZy sitesinde yer alan α-amilaz bilgileri	24
Şekil 2.11.	α-Amilaz ailesinin GH-H klanlarına göre evrim ağacı	25
Şekil 2.12.	α-Amilaz ailesinde korunmuş bölgeler	25
Şekil 2.13.	*Bacillus subtilis* α-amilazının üç boyutlu yapısı	26
Şekil 2.14.	α-Amilazın topolojisi	27
Şekil 2.15.	*Bacillus* amilazlarının karşılaştırılması	28
Şekil 2.16.	Tutucu ve çevirici mekanizmalar	29
Şekil 3.1.	amyE1 ve amyE2 primerleri	63
Şekil 3.2.	Primer dizaynı için kullanılan α-amilaz genine ait restriksiyon enzim haritası	64
Şekil 4.1.	TBAB + nişasta	83
Şekil 4.2.	LA + nişasta	83
Şekil 4.3.	*Bacillus subtilis* genomik DNA'sı	85

Şekil 4.4.	*Bacillus subtilis* amyE gen bölgesi	86
Şekil 4.5.	PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	86
Şekil 4.6.	PCR optimizasyonu	87
Şekil 4.7.	PCR ürünü	88
Şekil 4.8.	pDG148 klonlama vektörü	89
Şekil 4.9.	Restriksiyon enzimleriyle kesilen pDG148'in agaroz jelde görüntülenmesi	90
Şekil 4.10.	pCR Blunt II TOPO	91
Şekil 4.11.	pCR TOPO amyE klonları	92
Şekil 4.12.	Restriksiyon enzimi uygulanmamış pCR TOPO-amyE klonları	93
Şekil 4.13.	pCR TOPO amyE klonlarının HindIII ve SphI ile kesimi	94
Şekil 4.14.	Klonların EcoRI ile kontrolü	95
Şekil 4.15.	7. ve 8. klonlara ait saflık ve konsantrasyon değerleri	96
Şekil 4.16.	pDG148-Bs-amyE	96
Şekil 4.17.	pDG148-Bs-amyE klonlarının agaroz jelde görünümü	97
Şekil 4.18.	pET 16b ekspresyon vektörü	98
Şekil 4.19.	amyE dizi analizi sonuçları	101
Şekil 4.20.	Klonlanan amyE geninin *Bacillus subtilis* sp'ye benzerliği	102
Şekil 4.21.	amyE geninin tahmini protein dizisi	103
Şekil 4.22.	amyE geninin tahmini üç boyutlu yapı analizi	103
Şekil 4.23.	amyE protein dizisini içeren *Bacillus* türlerine ait filogenetik ağaç analizi	104
Şekil 4.24.	Ni-NTA ila saflaştırılmış proteinlerin SDS jel görüntüsü	105
Şekil 4.25.	Amilaz rekombinant proteininin western blot analizi ile desteklenmesi	106

EK LİSTESİ

Ek No		Sayfa
Ek-1.	Primer Sentez Raporu	125
Ek-2.	Ligasyon Hesaplamaları	126
Ek-3.	*Bacilus subtilis* Genomik DNA'sının Nanodrop Sonucu	128
Ek-4.	DNA Belirteci	129
Ek-5.	PCR Ürününün Jelden Kesimi	130
Ek-6.	PCR Ürününün Nanodrop Sonucu	131
Ek-7.	pDG148'in Nanodrop Sonucu	132
Ek-8.	pCR Blunt II TOPO Gen Dizilimi	133
Ek-9.	pCR-TOPO-amyE Klonlarının Jelden Kesimi	134

KISALTMA VE SİMGELER

A,G,C,T	: Adenin, Guanin, Sitozin, Timin
Amp	: Ampisilin
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovine Serum Albumin
BCC	: Business Communications Company
Da	: Dalton
DEAE	: Dietilaminoetil
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DNS	: 3,5-Dinitrosalisilikasit
dNTP	: Deoksiribonükleosidtrifosfat
DP	: Degree of polymerization
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
EtBr	: Etidyum bromid
FCR	: Folin ciocalteu reagent
IPTG	: Isopropil β-D-1-thio-galactopiranosid
IUBMB	: International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kb	: Kilobaz
kbç	: Kilobaz çifti
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
LB	: Luria Bertani
M	: Molar
mg	: Miligram

mg/mL	: Miligram/mililitre
mL	: Mililitre
MQ	: Milli Q distile su
Na_2HPO_4	: Disodyum hidrojen fosfat
NaH_2PO_4	: Sodyum dihidrojen fosfat
$NaClO_4$	: Sodyum perklorat 1-hidrat
^oC	: Santigrad derece
OECD	: Economic Cooperation and Development
PAGE	: Poliakrilamit Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleikasit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SSF	: Solid State Fermentation
SOC	: Süper Optimal Katabolit Represyon besi ortamı
TBST	: Tris-buffered saline with Tween
TE	: Tris-Edta
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
Tm	: Erime Sıcaklığı
U	: Ünite
U/µL	: Ünite/mikrolitre
UV	: Ultraviyole
α	: Alfa
β	: Beta

1. GİRİŞ

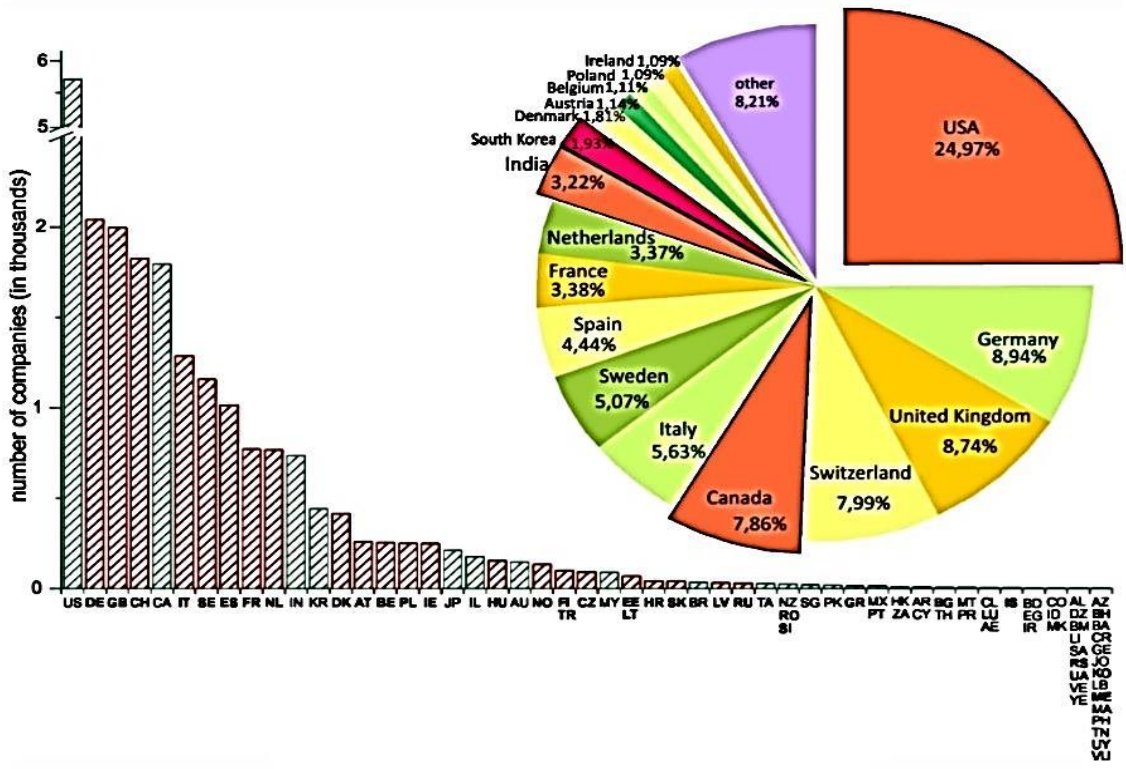
21. yüzyıl biyolojinin ‘‘altın çağı’’ olarak adlandırılmaktadır. Aynı söylem biyolojinin bir dalı için de geçerlidir: Biyoteknoloji (Bruschi ve ark. 2011). Biyoteknoloji; biyolojik sistemlerin, yaşayan organizmaların veya türevlerinin özel kullanım için ürün veya işlemleri yaptığı veya değiştirerek kullandığı teknolojik uygulama olarak tanımlanmaktadır (Okafor 2007, Dundar ve Akbarova 2011, Bruschi ve ark. 2011, Dorocki ve Bogus 2014). Biyoteknoloji; genetik, mikrobiyoloji, biyoistatistik, ekoloji, viroloji, immünoloji, aşı gibi sağlık sisteminde hayati rol oynayan teknikler, hücresel süreçler, tarım, çiftçilik ve bunun gibi oldukça geniş konuları kapsayan disiplinlerarası bir bilimdir (Dundar ve Akbarova 2011). Yeni tekniklerin, uygulamaların ve potansiyel tedavilerin sayısı ile biyoteknoloji, katkıda bulunan disiplinleri, gökkuşağındaki renklerin etkisi gibi birleştirmiştir (Şekil 1.1). Kırmızı biyoteknoloji, ilaç ve tıp bilimindeki uygulamaları; yeşil biyoteknoloji tarım ve çevre bilimindeki uygulamaları ve beyaz biyoteknoloji daha verimli süreç hammaddelerini üreten uygulamaları içermektedir. Her renk biyoteknoloji, hızla büyüyen bu pazara katkıda bulunmaktadır (Gartland ve ark. 2013).

Renk	Biyoteknoloji Faaliyet Alanı
Kırmızı	Sağlık, medikal, tanı
Mavi	Su, sahil, deniz (Akuatik)
Sarı	Gıda, beslenme
Yeşil	Tarım ve çevre (biyobenzin, biyogübre,...)
Kahverengi	Sulama ve çöl
Beyaz	Gen teknolojisine dayalı biyo-endüstriler
Gri	Klasik fermentasyon ve biyoproses teknolojisi
Altın	Biyoinformatik, nanobiyoteknoloji
Mor	Patentler, yayınlar, fikri mülkiyet hakları
Siyah	Biyoterör, biyosuç

Şekil 1.1. Biyoteknoloji Renk Kodları (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2009)

Bugünlerde biyoteknoloji, bilgi tabanlı ekonominin yeni bir dalgası ve teknolojinin en önemli sektörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Biyoteknoloji;

keşifler, nitelikli uzmanların dahil olduğu yüksek tempodaki gelişmeler, araştırma merkezleri, çeşitli bilgi kaynakları, yatırımlar ve bilgi akışını garantileyen bağlantılarla karakterizedir. Toplanan verilere göre Amerika'nın ve Avrupa ülkelerinden özellikle İngiltere, Almanya, İsviçre, İtalya ve İsveç gibi ülkelerin, biyoteknolojinin gelişmesinde oldukça büyük rolleri vardır (Şekil 1.2). Ayrıca Türkiye, Hindistan, Güney Kore, Japonya'nın da bulunduğu bazı Asya ülkelerinde de biyoteknoloji dinamik bir şekilde genişlemektedir. Biyoteknoloji, bilgi teknolojisi eşliğinde yalnızca Avrupa'da 22 milyon işçisiyle 21.yy'ın en büyük endüstrisi olmuştur (Gartland ve ark. 2013).



Şekil 1.2. Dünyadaki biyoteknoloji şirketlerinin sayısı (Dorocki ve Bogus 2014)

Son yirmi yılda moleküler biyolojide meydana gelen gelişmeler sayesinde genetik süreçlerdeki bilgiler büyük ölçüde artmıştır. Bu durum, genetik mühendisliği gibi moleküler seviyedeki teknolojilerde, biyolojik manipülasyon uygulamalarına yol açmıştır. Biyolojik manipülasyonlara yönelik bütün yaklaşımlar, biyoteknolojiyi, nükleik asit ya da moleküler manipülasyonlar içeren moleküler biyoteknoloji ve bunları içermeyen geleneksel biyoteknoloji olarak ayırmışlardır (Okafor 2007).

Biyoteknoloji ve rekombinant DNA teknolojisinin birleşiminden meydana gelen moleküler biyoteknoloji insanlığa faydalar sağlayabilir. Şöyle ki;

- Bulaşıcı ve genetik hastalıkların doğru teşhisini sağlamak, önlemek veya geniş bir yelpazede tedavi olanakları sağlamak,
- Böcek istilasına, fungal ve viral hastalıklara ve çevresel streslere dayanıklı bitkiler yaratarak ürün verimini artırmak ve aynı zamanda tehlikeli tarımsal kimyasalların uygulamalarını azaltmak,
- Kimyasal maddeler, antibiyotikler, polimerler, amino asitler, enzimler ve gıda üretimi için önemli olan çeşitli gıdalara ve diğer sanayilere katkı üretecek mikroorganizmalar geliştirmek,
- Hayvancılığı ve genetik özellikleri geliştirilmiş diğer hayvanları geliştirmek (Glick ve ark. 2009).

Moleküler biyoloji teknolojisinin köşetaşı gendir. Genlerle çalışmayı kolaylaştırmak için genler, izole ve amplifiye edilebilir. Bir genin izolasyon ve amplifikasyon metodlarından biri, ilgili geni klonlamak yani geni, bir taşıyıcı veya vektör aracılığıyla başka bir DNA molekülüne aktarmak ve canlı hücrede replike olmasını sağlamaktır (Mullis 1990). Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gerekli proteinlerin eldesi, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşılarının oluşturulması ve rekombinant proteinlerin ekspresyonu gibi amaçlarla yapılmaktadır (Kuk ve Erensoy 2008).

Enzim teknolojisi, sürdürülebilir endüstriyel kalkınmanın önemli bir bileşeni olarak Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (Economic Cooperation and Development, OECD) tarafından tanınan, disiplinler arası bir alandır. OECD tarafından yapılan biyoteknolojik süreçlerin hayatı nasıl etkilediğine yönelik ‘‘maliyet ve sürdürülebilirlik’’ konulu araştırmada 21 vaka çalışmasından 15’nin enzim bazlı süreçler olduğu belirtilmiştir (Beilen ve Li 2002). Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde

değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Kıran ve ark. 2006). Endüstriyel enzimlerin çok sayıda ticari uygulamaları vardır (Adrio ve Demain 2014). Enzimler kullanılarak üretilen 500'ün üzerinde endüstriyel ürün mevcuttur (Kumar ve Singh 2013). Sürdürülebilir çözümlere duyulan ihtiyacın büyümesinden dolayı endüstriyel enzimlere olan talep devamlı olarak artmaktadır (Demain ve Adrio 2008). Enzim sektörünün beklentileri, mevcut kullanım için artan pazar pozisyonu, bilinen enzimlerin yeni kullanımı ve yeni endüstriyel uygulamaları olan enzimler için oldukça parlak görünmektedir (Sengupta ve Dasgupta 2006).

Enzimler herhangi bir canlı organizmadan izole edilebilmektedir. Ticari enzimlerin kaynağı mikroorganizmalardan hayvansal kaynaklara ve bitkilere kadar geniş bir aralığı kapsamaktadır. Ancak çeşitli sebeplerle enzimlerin en büyük kaynağı, mikroorganizmalar olmuştur (Gupta ve ark. 2003, Costa de Freitas 2014). Bitki ve hayvanlardan ziyade mikroorganizmalar ucuz kaynaklar olmaları, enzim içeriklerinin tahmin edilebilmesi ve substratlarının standart hammadde olarak elde edilebilmesi avantajları nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir. Üstelik genetik mühendisliği, enzim teknolojisinin gelişmesinde yeni bir çığır açmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde kolay büyüyen mikroorganizmalarda değerli kaynaklara sahip enzimlerin sentezlenmesi ve aynı zamanda müşterilerin ihtiyaçlarına göre istenilen özelliklere sahip ısmarlama enzim proteinleri üretmek mümkün olmuştur (Sengupta ve Dasgupta 2006).

Mikroorganizmaların fizyolojik fonksiyonlarının gen düzeyinde kontrol edilebilmesi, gen manipülasyonlarına olanak vermesi, içinde özellikle de enzimlerin bulunduğu istenen metabolik ürünlerin işlenmesi mümkündür (Okafor 2007). Özellikle *Bacillus* türleri, ilk kullanımları *Bacillus subtilis*'in binlerce yıl önce Japonya'da, katı faz fermantasyon (Solid State Fermentation, SSF) yöntemiyle ''natto'' üretimine dayanan ve halen uygulamalı mirobiyolojide en çok kullanılan mikroorganizmalardır. *Bacillus* türleri amilazların üretiminde kullanılmaktadır (Schallmey ve ark 2004). Amilazlar biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamaları ile önemli bir enzim sınıfını oluşturmaktadır. Bu sınıf dünya enzim piyasasının yaklaşık % 25'ini temsil etmektedir. Bu enzim grubunun gıda, kimya, farmösötik, bira, deterjan, kağıt, tekstil ve medikal amaçlar gibi oldukça geniş uygulama alanları vardır (Costa de Freitas 2014).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enzimlerin Endüstriye Girişi

Enzimlerin insanlar tarafından kullanımı uygarlığın ilk zamanlarına kadar uzanır. İnsanlar enzimleri uzun süre bilmeden kullanmışlardır. Şeker fermentasyonuyla bira ve şarap hazırlanması, etanolün oksidasyonuyla sirke üretimi, laktoz fermentasyonuyla sütün dondurulması kimyasal transformasyondan sorumlu enzimlerin katalitik aktiviteleriyle binlerce yıldır gerçekleşen eski işlemlerdir (Sengupta ve Dasgupta 2006). Biyokimyanın gelişmesi, enzimlerin yapısı ve nasıl çalıştıklarının açıklığa kavuşturulması ancak 19. yy'a kadar seçkin bilim adamlarının bir dizi öncü çalışmaları ile gerçekleşmiştir (Polaina ve MacCabe 2007).

Enzimlerin modern tarihi 1833'lere dayanmaktadır. Fransız Payen ve Persoz, arpadan izole ettikleri amilazı ''diastase'' olarak adlandırmışlardır (Novozym 2013). 1835'te İsveçli kimyager Berzelius, kimyasal reaksiyonları hızlandıran belirli maddelerin özelliğini tanımlamak için ''catalysis'' terimini ilk kez kullanmıştır. 1836'da Alman fizyolog Schwan, sindirim enzimi olan pepsin'i keşfetmiştir. 1877'de Kühne, ''enzyme'' terimini ilk kez kullanmıştır (Polaina ve MacCabe 2007). 1870'lerde Danimarkalı kimyager Christian Hansen'in, buzağı midesinden saflaştırdığı renini peynir yapımında kullanarak, ürünün hem kalitesinde hem de miktarında artış elde etmesiyle enzimlerin endüstride kullanılma dönemi başlamıştır (Binod ve ark. 2013).

İlk ticari enzimin 1914'te Almanya'da kullanıldığı rapor edilmiştir. İlk ticari enzim olan 'tripsin' hayvanlardan izole edilen bir proteazdır ve bu enzim proteinlerin degredasyonu için deterjanlarda kullanılmıştır. Mikrobiyal proteazların deterjanlara girmesi, deterjan endüstrisi için gerçek bir atılım olmuştur. İlk ticari bakteriyel Bacillus proteaz, 1959'da marketlere girmiş ve Novozym'lerin Danimarka'da bu enzimi üretmeye başlamaları ile 1965'te deterjan üreticileri de kullanmaya başlamıştır (Binod ve ark 2013, Sengupta ve Dasgupta 2006). Enzimler 1930'da meyve suyunun bulanıklığının giderilmesi için meyve suyu imalatında kullanılmıştır. Ancak büyük çapta kullanımı 1960'larda nişasta endüstrisinde başlamıştır. Nişastanın geleneksel asit hidrolizinin yerini nişastayı %95 glukoz ürününe dönüştüren α-amilaz ve glukoamilaz almıştır. Nişasta endüstrisi deterjan endüstrisinden sonra en çok kullanılan ikinci endüstri olmuştur (Sivaramakrishnan ve ark. 2006).

Enzimler metabolizma ve biyokimyasal reaksiyonların her aşamasında önemli rol oynayan biyolojik katalizörlerdir (Nigam 2013). Enzimler genellikle spesifiktir; ayrıca sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu gibi ekstrem koşullar altında ve kısmen aktif organik çözücüler içinde etkinliğini muhafaza eder (Sengupta ve Dasgupta 2006). Bilinen kimyasallardan daha fazla etkilidirler. Üstelik kolayca biyolojik olarak parçalanabilirler ve endüstride kullanıldıktan sonra çevreye ulaştığında toksik değildirler veya o yolu indirgerler. Bu özellikler, üreticilere daha az ham madde, kimyasal su ve/veya enerji tüketimi, daha az atık ve daha kaliteli ürün oluşturma imkanlarını sağlar (Soetart ve Vandamme 2010).

Kimyasal ve farmasötik maddelerin üretimi için kimyasal sentez içeren pek çok endüstriyel sürecin çeşitli dezavantajları vardır. Bunlar: Düşük katalitik etki, kiral sentezi için enantiomerik özgünlüğün eksikliği, yüksek sıcaklığa duyulan ihtiyaç, düşük pH, yüksek basınçtır. Ayrıca organik çözücülerin kullanımı, kirlenmeye ve organik atığa yol açar. Enzimler; substratın fonksiyonel gruplarını koruma ihtiyacı olmadığı, yarılanma ömrü uzun olduğu, yüksek stereo seçiciliği, 10^5-10^8 kat hızlandırılmış reaksiyon ürünleri ve doğal olmayan substratlar ile ve ılımlı reaksiyon koşulları altında (sıcaklık, pH, atmosferik şartlar) çalıştığı için daha faydalıdır. Ayrıca, enzimler genetik olarak seçilebilir ve stabilite, substrat özgünlüğü ve spesifik aktivite gibi önemli özelliklerini geliştirmek için kimyasal olarak değiştirilebilirler. Bunun yanısıra bazı enzimler kofaktör kullanmayı gerektirdiğinden dezavantajları vardır. Ancak, bütün hücrelerin kofaktörü geri kazanım ve kullanımı gibi çeşitli yaklaşımlar bu sorunu çözebilir (Adrio ve Demain 2014).

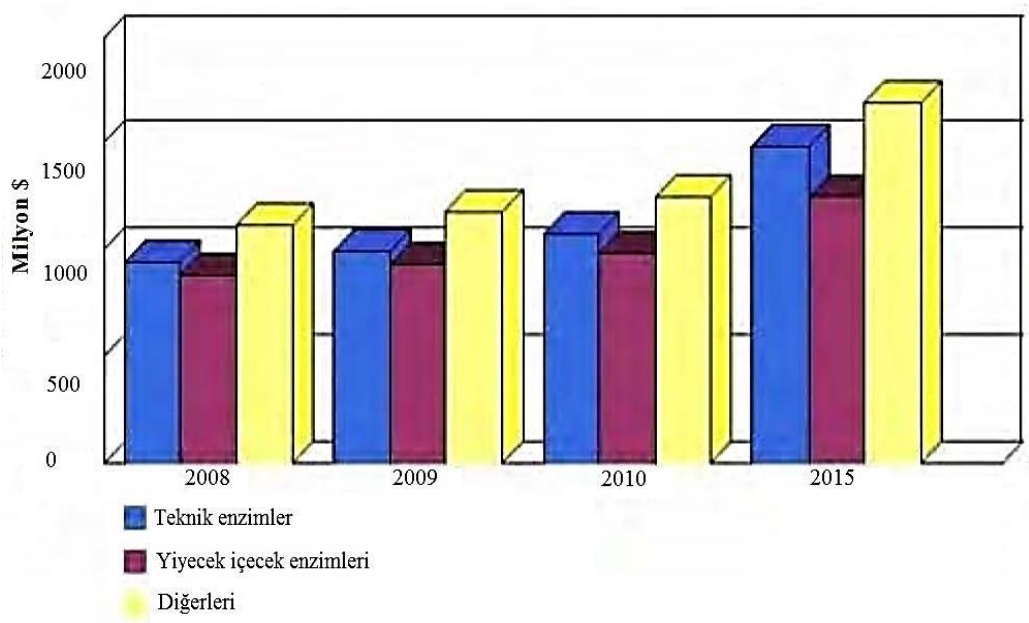
Enzimatik süreçlerin faydaları konusunda son 10 yılda pek çok kitap, makale ve rapor yayınlanmıştır (Jegannathan ve Nielsen 2013). Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin kullanıldığı üretim süreçlerinin çeşitliliği oldukça geniştir. Örneğin kağıt ve kağıt hamuru (Nguyen ve ark. 2008), deri (Kandasamy ve ark. 2012), tekstil üretimi (Araujo ve ark. 2008, Soaeres ve ark. 2011, Sabale ve Rane 2012), deterjan üretimi (AISE 2013), içecek üretimi (Uçan ve Akyıldız 2012), yiyecek üretimi (Synowiecki ve ark. 2006, Beer ve ark. 2006), hayvan yemi üretimi (Zhu ve ark. 2011), ilaç üretimi (Sengupta ve Dasgupta 2006), kozmetik üretimi (Lods ve ark. 2001), biyodizel üretimi (Hernandez-Martin ve Otero 2008) bunlardan başlıcalarıdır.

Çizelge 2.1. Önemli endüstriyel enzimler ve bazı karakteristikleri (Singh Nigam 2013)

Enzim	**Özellikler**	**Mikroorganizma**	**Uygulamalar**
PROTEAZ (Proteolitik aktivite)	Asidik Nötral Alkalin Termofilik İnhibitor bileşiklerin etkisinde aktif	*Bacilli* *Pseudomonas* *Clostridium* *Rhizopus* *Penicillium* *Aspergillus*	Deterjan Gıda endüstrisi Deri işleme Farmosötik Moleküler Biyoloji Peptid sentezi
KERATİNAZ (Keratin hidroliz aktivitesi)	Yün, tüy, kürk, saç gibi çözünmeyen lifli proteinler üzerine proteolitik aktivite Termofilik Alkalofilik Oksidasyon direnci	Bacteria Actinomycetes Fungi	Hayvan yemi üretimi Tekstil işleme Deterjan formülasyonu Deri imalatı Tıp
AMİLAZ (Nişasta hidroliz aktivitesi)	Termotolerant Termostabil Alakali-resistant Exo-,Endo-dallanan Siklodekstrin- enzimlerin üretimi	*Bacillus* sp. *Geobacillus*	Nişasta endüstrisi Kağıt endüstrisi Gıda endüstrisi Farmosötikal endüstri Tekstil endüstrisi Fırıncılık
KSİLANAZ (Ksilan-Pentoz polimer hidroliz aktivitesi)	Ekstremofilik Alkalofilik Termofilik Termostabil	*Thermoactinomyces thalophilus* *Bacillus* sp. *Humicola insolens* *Bispora* (asidofilik fungus)	Pentoz üretimi Yakıt için hemiselülozun biodönüşümü Meyve suyu berraklaştırma Kağıt endüstrisi
LİGNİNAZ (Ligninolitik-kompleks enzim)	Lignin peroksidazda oksidadif özellikler Manganaz peroksidaz Lakkaz Termofilik	*Bacidiomycetes* suşları *Steccherinum ochraceum* *Polyporus versicolor* *Panus tigrinus*	Biosensörler Bioağartıcı Bioremediasyon Kirlilik kontrolü Tekstilde ve endüstride inatçı kimyasalları işleme
SELLÜLAZ (Sellülolitik-kompleks enzim)	Kristal sakkarifikasyonu Amorf sellüloz Termofilik Termostabil	*Bacidiomycetes* suşları *Polyporus* sp *Pleurotus* sp *Trichoderma* sp *Aspergillus* sp	Selülozdan glukoz hammadde Biorafineri Bioetanol Kağıt endüstrisi
LİPAZ (Lipolitik aktivite)	Yağ parçalama Stereoselektivite Rasemik-çözünürlük aktivite Çözücülere direnç Termotolerant	Maya suşları Mantar suşları *Candida* sp *Aspergillus* sp *Penicillium* sp *Rhizopus, Mucor*	Deterjanlar Günlük endüstride Besin desteği Terapötik ajanlar

2.2. Endüstriyel Enzimlerin Küresel Pazardaki Değeri

Endüstriyel enzim piyasası, her yıl yaklaşık %10 oranında genişlemektedir. (Saha ve ark. 2009). BCC (Business Communicatications Company, piyasa araştırma raporları, yorumları ve teknik bültenleri yayımlayan kuruluş)'nin belirttiğine göre endüstriyel enzimlerin küresel pazardaki tahmini değeri 2011 yılında 3.3 milyar dolar iken 2015'te 4.4 milyar dolar olarak beklenmektedir (Bhattacharya ve Pletschke 2014). Teknik enzimlerin değeri 2010'da 1 milyar doların üzerinde olmuştur. Bu sektör yıllık %6.6 artarak 2015'te 1.5 milyar dolara ulaşacaktır. Teknik enzimlerin içinde en yüksek satış oranı deri endüstrisinde olup bu sırayı bioetanol pazarı izlemektedir. Yiyecek ve içecek enzim segmentinin 2010 yılındaki değeri 975 milyar dolar iken 2015'te 1.3 milyar dolara ulaşması beklenmektedir. Yiyecek ve içecek enzim segmentinde süt ve günlük market en yüksek paya sahip olup 2009'da ki değeri 401.8 milyar dolardır (Binod ve ark. 2013) (Şekil 2.1).

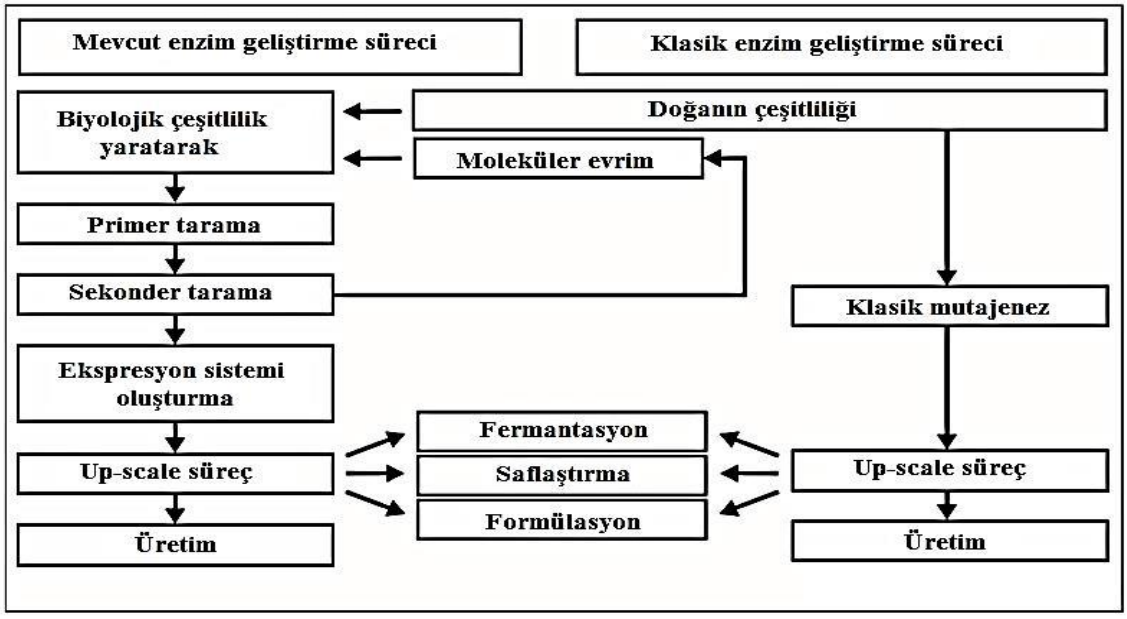


Şekil 2.1. Küresel endüstriyel enzim pazarı 2008-2015 (Binod ve ark. 2013)

2.3. Enzimlerin Geliştirilmesi

1980'lerde genetik müdendisliğinin gelişmesi, yeni enzimlerin üretimi ve ticarileştirilmesi için gerekli araçları sağlamıştır. Böylece milyar dolarlık enzim

endüstrisinin genişlemesinin adımları atılmıştır. X ışını kristalografisi, evrim, gen ve genom karılması, genomik programlardan elde edilen biyolojik bilgi miktarındaki artış ile protein kimyası alanındaki diğer analitik metodlar, enzimlerin yapı ve fonksiyonlarına yönelik çalışma ve manipülasyonlarına katkı sağlamıştır. Araştırmalar; mevcut enzim kataliz prosedürlerinde iyileştirme, hammaddelerin kullanımı ve tekrar kullanılması için gereksinimleri karşılama, yeni teknolojilerin geliştirilmesi, enzimlerin sadece rasyonel değişiklikleri değil aynı zamanda tamamen yeni özelliklere sahip yeni enzimlerin dizaynı konularında geliştirilmektedir (Polaina ve MacCabe 2007) Şekil 2.2). DNA teknolojisi aynı zamanda substrat özgünlüğünü değiştirmek, enzim katalizörlü reaksiyonların verimini artırmak, enzimlerin stabilite özelliklerini geliştirmek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda, fermantasyon ürünlerinin verimini arttırmak için hücre metabolizmasının metabolik mühendisliği kullanılmaktadır (Taniguchi ve Honnda 2009).



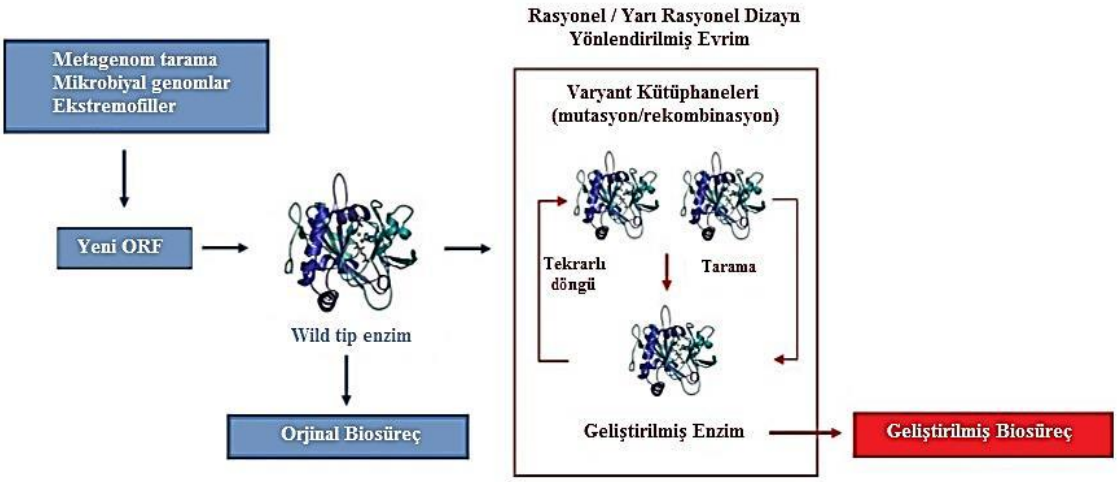
Şekil 2.2. Klasik ve mevcut enzim geliştirme sürecinin karşılaştırılması (Kirk ve ark. 2002)

Genetik mühendisliğindeki bilgiler; endüstriyel enzimleri, kristal yapıları, rastgele veya yere özgü mutasyonla değişik pH profilleri, substrat özgünlüğü, gelişmiş stabilite, metal bağlama kapasitesi, oksitleyici ajanlara direnç ve klonlanmış genlerin elde edilmesini sağlayarak enzim üretimini kolaylaştırmıştır (Schallmey ve ark. 2004).

Son zamanlarda kataliz yerine biyokataliz ile geliştirilen enzimler daha ekonomik ve çevresel etkileri azaltarak enzim üretimini teşvik etmektedir (Costa de Freitas 2014). Enzimlerin sürekli genişleyen uygulama alanları, geliştirilmiş veya yeni özellikler sergileyen biyokatalizörlere gittikçe büyüyen bir talep yaratmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi biyokatalizör üretimini 100 kat arttırmıştır. Şekil 2.3'te görüldüğü gibi yeni/geliştirilmiş biyokatalizörler geliştirmek zor ve karmaşık bir iştir. Biyokatalizör geliştirilirken uygulanan fonksiyonlara uyum için modifiye edilen enzimlerin iki yolu vardır:

(i) Mevcut biyokatalizörlerin rasyonel yeniden dizaynı,

(ii) Rastgele oluşturulan kütüphanelerde istenen fonksiyonlar için araştırmalar yapılması (Adrio ve Demain 2014).



Şekil 2.3. Biyokatalizörün geliştirilmesi (Adrio ve Demain 2014)

Bazı durumlarda (terapötik proteinler gibi), ürünün saflığının yüksek olması istenir. Bu gibi durumlarda biyoteknoloji şirketleri, kimyasal üretimlerde kullanmak amacıyla biyolojik sistemlerden yararlanarak enzim gibi biyokatalizörleri ya da kimyasal maddeleri üretirler. Böylece doğrudan biyokatalizör kullanılarak verimlilik arttırıldığı gibi maliyet de enzimlerin immobilizasyonu ile düşürülebilir (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2009). Enzimler istenen ürünün verimini arttırmak için sinerjik aksiyonda kullanılabilir. Bu süreç çok adımlı endüstriyel süreçlerde zaman ve maliyeti azaltmak açısından oldukça ekonomiktir. İmmobilizasyon, endüstriyel enzim uygulamaları için

en iyi tekniklerden biridir. İmmobilize enzimler yeniden kullanılabilme, reaksiyon karışımından kolaylıkla ayrılabilme, ekstrem şartlar altında stabil kalabilme gibi teknik ve ekonomik avantajlar sağlar (Jadhav ve Singhal 2014).

2.4. Mikrobiyal Enzimler

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyal enzimler, en iyi enzimler olarak bilinmektedir. Enzimler 20. yüzyılda mikroorganizmalardan keşfedilmiş olmasına rağmen, onların izolasyonu, karakterizasyon özellikleri üzerine çalışmalar, tezgah-ölçekten pilot-ölçekli üretim ve biyo-sanayi uygulamaları ile sürekli ilerlemiş ve bilgiler düzenli olarak güncellenmiştir (Singh Nigam 2013). Mikrobiyal enzimlerin metabolik katalizörler olarak çeşitli endüstriyel kullanım ve uygulamalarda çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Adrio ve Demain 2014) (Çizelge 2.2).

Mikrobiyal enzimlerin özel nitelikleri başlıca sıcaklık, pH ve anormal koşullar altında kayda değer aktivite yeteneklerini içerir. Bu nedenle belirli mikrobiyal enzimler; termofilik, asidofilik ve alkalofilik olarak sınıflandırılmaktadır. Termostabil enzim sistemli mikroorganizmalar, normal reaksiyon sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda işlev görebilirler ve bu durum uzun süreli büyük ölçekli endüstriyel reaksiyonlarda mikrobiyal kontaminasyon olasılığını azaltmaktadır. Enzimlerde termostabilite kalitesi hammaddenin parçalanmasını ve sindirimini uyarır; ayrıca daha yüksek bir reaksiyon sıcaklığı da enzim penetrasyonunu arttırır (Singh Nigam 2013). Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme açısından önemli etkilere sahiptir. Fakat 40^{o}C'de enzim zarar görmeye başlar. Böylece reaksiyon yavaşlar ve 60^{o}C'de enzim tamamen bozulur. Bu noktada çözüm olarak mikroorganizmalardan elde edilen enzimler büyük ilgi çekmektedir (Kıran ve ark. 2006). Enzimlerin üretiminde mikroorganizmaların kullanılması oldukça ekonomiktir ayrıca, enzimlerin spesifik özelliklerini elde etmek için mikroorganizmaların üzerinde manipülasyonlar yapmak kolaydır (Kumar Sen ve ark. 2014, Vengadaramana 2013, Gupta ve ark. 2003). Pek çok çeşitteki enzim, gerek gıda sanayinde gerekse temizlik sanayinde geniş kullanım alanına sahiptir. Teknolojideki gelişmelere bağlı olarak kullanım alanları yaygınlaşmakta daha da önem arz eder hale gelmektedir. Bu enzimlerin elde edilmesinde ise mikroorganizmaların önemi her geçen gün artmaktadır (Kıran ve ark. 2006).

Çizelge 2.2. Mikrobiyal Enzimler (Saha ve ark. 2009)

Enzim	**Bakteri**	**Uygulama Alanları**
Asetolaktat dekarboksilaz	*Lactobacillius* sp *Bacillus brevis*	Biranın olgunlaşma sürecini hızlandırmak
Aminoaçilaz	*Aspergillus oryzae*	Aminoasitlerin optik çözünürlüğü
Aminoksidaz	*Aspergillus niger*	Rasemik aminlerin optik çözünürlüğü
Alfa amilaz	*Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus licheniformis* *Bacillus stearothermophilus*	Nişasta, fırın, tekstil, deterjan
Beta amilaz	*Bacillus polymixia*	Nişastanın maltoza dönüşümü, fırın
Aminopeptidaz	*Lactococcus lactis*	Proteinin peptidlere parçalanması, peynir
Antosiyanaz	*Aspergillus niger*	Şarap ve meyve suyunu berraklaştırma
Arabinofuranosidaz	*Aspergillus niger* *Aereobasidium pullulans*	Arabinoz çözme, şarap yapımı, hayvan yemi, odunun biokütle dönüşümü
L-aspartat amoniliyaz	*Escherichia coli*	Amonyak ve fumarattan aspartik asit yapımı
L-aspartat-4-dekarboksilaz	*Pseudomonas dacunhae*	Aspartik asitten alanin yapımı
Katalaz	*Aspergillus niger*	Yumurta beyazlatma, kontakt lens bakımı
Sellülaz	*Trichoderma reesei* *Penicillium purpurogenum* *Clostridium thermocelium*	Meyve sebze işleme, meyve suyu berraklaştırma, yağ ekstraksiyonu, tekstil, deterjan, hayvan yemi
Kitinaz	*Trichoderma harzianum* *Streptomyces* sp	Antimikrobiyal aktivite
Siklomaltodektrin glukanotransferaz	*Bacillus* sp	Siklodekstrin üretimi
Beta glukanaz	*Aspergillus niger* *Bacillus subtilis*	Geliştirilmiş hayvan yemi kullanımı
Alfa galaktosidaz (Raffinaz)	*Aspergillus niger* *Aspergillus phoenicis* *Saccharomyces cerevisiae*	Raffinozun sükroz ve galaktoza hidrolizi
Beta galaktosidaz (Laktaz)	*Aspergillus niger* *Kluyveromycesfragilis* *Candida pseudotropicalis*	Sütteki şekerin glukoz ve galaktoza hidrolizi
Fumaraz	*Brevibacterium filavum*	Malik Asit içine fumarik asit dönüşümü
Glukoamilaz	*Aspergillus niger* *Endomycopsis fibuligera* *Rhizopus niveus*	Nişastanın glukoza şekerlendirilmesi, alkol üretimi

Çizelge 2.2. Mikrobiyal Enzimler (Saha ve ark. 2009) devamı		
Glukoz izomeraz	*Bacillus coagulans* *Actinoplanes missouriensis* *Streptomyces olivochromogenes*	Yüksek fruktozlu mısır şurupları
Glukoz oksidaz	*Aspergillus niger* *Penillium amagasakiense*	Oksijen tutucu, içecekler yumurta, meyve suyu, şarap
Invertaz	*Aspergillus* sp *Saccharomyces* sp	Şeker üretim dönüşümü, suni bal üretimi, şekerleme
Izoamilaz	*Pseudumonas amyloderamosa*	Nişastanın dallanması, maltoz üretimi
Lakkaz	*Coriolus versicolor*	Lignin degredasyonu
Lipaz	*Aspergillus* sp *Candida rugosa* *Geotrichum candidum* *Humicolalanuginosa* *Rhizomucor miehei*	Peynirin olgunlaşması, lezzet geliştirme, yağların modifikasyonu, kağıt, deterjan endüstrisi, organik sentezler
Naringinaz	*Aspergillus niger*	Narenciye sularının acısının giderilmesi
Nitril hidrataz	*Rhodococcus rhodochrous*	Akrilonitrilden akrilamid üretimi
Pektinaz	*Aspergillus niger* *Aspergillus oryzae*	Meyve suyu, kahve, şarap işleme
Penisilin açilaz	*Bacillus megaterium*	Antibiyotik üretimi
Fitaz	*Aspergillus ficuum* *Aspergillus niger*	Fosfat gruplarının serbest bırakılması, hayvan yemi
Proteinaz	*Bacillus* sp *Aspergillus niger*	Protein hidrolizi, peynir, et, balık, meyve, fırın, deri, deterjan, jelatin hidrolizi, peptid sentezi
Pullulanaz	*Aerobacter aerogenes* *Bacillus acidopullulyticus*	Nişasta dallandırma, glukoz ve maltoz üretimi
Rennet	*Mucor* sp	Günlük endüstri
Tannaz	*Aspergillus oryzae*	Hazır çayın çözünürlüğünü geliştirme, birada bulanıklığı giderme, şarap yapımı, yem katkısı
Termolizin	*Bacillus thermoproteolyticus*	Aspartam sentezi
Ksilanaz	*Trichoderma* sp *Aspergillus* sp	Kağıt, meyve sebze işleme, tekstil, deterjan, hayvan yemi endüstrileri

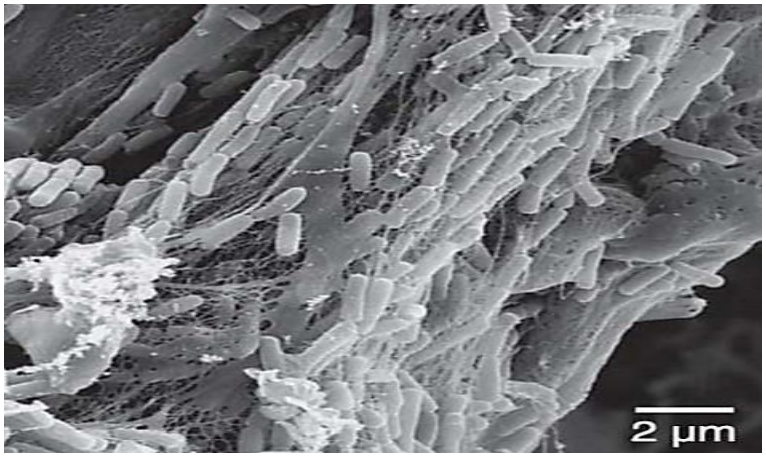
2.5. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus* Türlerinin Endüstride Kullanımı

Bacillus subtilis ve *Bacillus* türleri enzim üretimindeki etkinlikleri nedeniyle uygulamalı mikrobiyolojide en çok kullanılan endüstriyel mikroorganizmalardır. Suşları ve üretim stratejilerinin geliştirilmesi, moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanması ile kolaylaştırılmıştır. Bunun yanısıra özellikle *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* gibi türlerin, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından, GRAS (generally regarded as safe) sınıfında yani güvenilir ve zararsız kabul edilen mikroorganizmalar olarak kabul edilmesi endüstriyel çekiciliğine katkı sağlamıştır (Schallmey ve ark. 2004).

Bakteriler arasında *Bacillus* türleri ticari enzimlerin üretimi için sıklıkla kullanılmaktadır (Afzal-Javan ve Mobini-Dehkordi 2014). Oldukça çok miktarda *Bacillus* türleri tarafından üretilen bu ticari enzimler; α-amilaz, proteaz, lipaz (Kakeshita ve ark. 2011), sellülaz, ksilanaz gibi ekzoenzimlerdir (Xie ve ark. 2014). Olumlu enzimatik özellikleri ile endüstriyel olarak değerli enzimleri üreten yeni mikroorganizmaların incelenmesi yıllardır önemini korumuştur. Birçok mikroorganizmalar arasında *Bacillus* türlerinin, yüksek sıcaklık, bazik veya asidik pH ve yüksek tuz konsantrasyonu (Pandey ve ark. 2000) gibi stresli koşullarda, enzimlerinin istikrarı nedeniyle olağanüstü popülaritesi vardır. Ancak sporulasyon kabiliyeti, düşük enzim üretimi ve arzu edilen proteinin hücre içi ya da hücre dışı proteazlar tarafından sindirimi bu mikroorganizmalardan yararlanılmasını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, uygun bir vektör aracılığıyla, bir konakçıya, istenilen enzimi kodlayan genin klonlanması ve ekspresyonu belirtilen engellerin üstesinden gelmek için geliştirilmiş entegre yaklaşımlardır (Tuzlakoglu Öztürk ve ark. 2013).

Bacillus türleri, organizmaların heterojen biçimidir ve çevreye uyumları açısından çok kullanışlıdırlar (Kumar Sen 2014). Kısa fermantasyon süreleri, yüksek büyüme oranları ve hücre dışı ortama proteinleri salgılama kapasitesi gibi nedenlerle oldukça cazip endüstriyel organizmalar olmuştur. Bu organizmaların özellikle amilaz ve proteazın da aralarında bulunduğu önemli ekstrasellüler enzim kaynağı olmalarından dolayı suşlarının fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. Bu türlerin, arzu edilen enzimlerin her bir litresi için, gram miktarda üretmek ve salgılamak konusunda kanıtlanmış yetenekleri nedeniyle heterolog proteinlerin üretimi için potansiyel aday olarak kabul edilmişlerdir. Ayrıca gram pozitif bakteriler arasında

Bacillus subtilis genomik karakterizasyonu için öncelikli organizma olarak seçilmiştir (Schallmey ve ark. 2004) (Şekil 2.4). Genom dizisi tamamlanan bazı türler *Bacillus subtilis* 168 (Kuns ve ark. 1997), *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus anthracis* A202, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Ivanova ve ark. 2003).



Şekil 2.4. *Bacillus subtilis* (Steen, 2006)

Bacillus subtilis ilaç uygulamalarında yüksek değerdeki insan proteinlerinin üretimi için de kullanılabilmektedir. Çizelge 2.3'te seçilen bazı *Bacillus* türleri ve *Bacillus subtilis*'te eksprese edilmiş insan hormon proteinleri gösterilmiştir. Pek çok tıbbi uygulama, proteinlerin temel sekansları ve katlanmış 3 boyutlu yapılarının bozulmamış olmasını gerektirir. *Bacillus subtilis* ekspresyon sistemindeki son gelişmeler ile özellikle proteaz eksiği olan suşlar oluşturulmuştur. *Bacillus subtilis* diğer ekspresyon sistemlerinde üretimi zor olan ve tıpta önemli olan proteinlerin üretimi için kullanılabilmektedir. Örneğin memelilerde bulunan hIL-1 (human interleukin) protein *Kluyveromyces lactis* ve *Saccharomyces cerevisae* sistemlerinde biyolojik olarak inaktif iken *Bacillus subtilis* ilgili genin aktarılmasıyla bu proteini üretme ve salgı yeteneğine sahiptir (Wong 1995).

Yaklaşık olarak 20 yıldan beridir Bacilluslar hakkında çok miktarda bilgi toplanmıştır. Adım adım bu bakterilerin bazı proteinlerin üretiminde konak suş olarak kullanılması için optimize çalışmaları yapılmış ancak başarılı çalışmalar temelde bakterinin kendi kendine ya da yakın türlerinden enzimin çok fazla üretimi üzerine olmuştur. Bugünlerde ise gen dizisi tamamlanmış olan *Bacillus subtilis*'in genlerinin bilinmeyen fonksiyonları üzerine çalışılmaktadır (Westers ve ark. 2004).

Çizelge 2.3. Seçilen bazı *Bacillus* türleri ve *Bacillus subtilis*'te eksprese edilmiş insan hormon proteinleri (Schallmey ve ark. 2004)

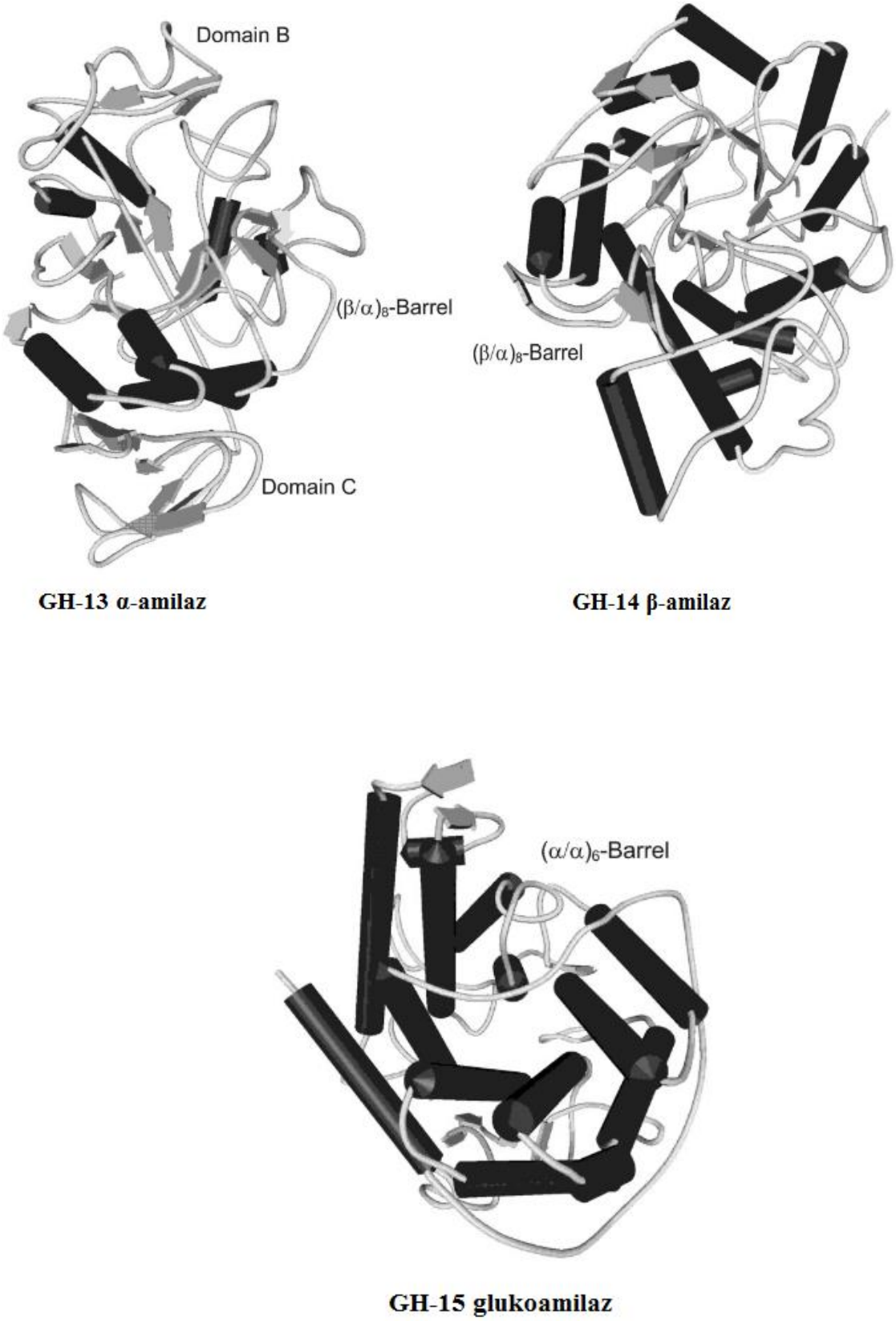
Ürün	**Ürün kaynağı**	***B.subtilis* konak suş**	**Yapılandırma Yöntemi**	**Klonlama modu**	**Hücresel lokasyon**
α-Amilaz	*B. amyloliquefaciens*	BRB1	D	CI	SE
α-Amilaz	*B. licheniformis*	SO103	D	PL	SE
α-Amilaz	*B. licheniformis*	GP208	F	PL	SE
α-Amilaz	*B. licheniformis*	QB1098	F	CI	SE
α-Amilaz	*G. stearothermophilus**	TN106	D	PL	SE
Alkalin proteaz	*B. amyloliquefaciens*	BR151	D	PL	SE
Alkalin proteaz	*B. amyloliquefaciens*	168	D	PL	SE
Nötral proteaz	*B. amyloliquefaciens*	BR151	D	PL	SE
Nötral proteaz(nprT)	*G. stearothermophilus**	MT-2	D	PL	SE
Nötral proteaz(nprM)	*G. stearothermophilus**	MT-2	D	PL	SE
Keratinaz	*B. licheniformis*PWD-1	FDB-29	D	PL	SE
Endoksilanaz	*Bacillus* sp	DB104	D	PL	SE
Penicilin G açilaz	*B. megaterium*	WB-600	D	PL	SE
Growth hormon	İnsan	MT-500	F	PL	SE
Growt hormon	İnsan	BG2035	D	PL	IE
Interferon-alfa2	İnsan	IH6140	F	PL	SE
Interferon-alfa2	İnsan	I168	D	PL	IE
Interferon-beta	İnsan	MT400	F	PL	SE
Interferon-beta	İnsan	I168	D	PL	IE
Interferon-beta	İnsan	1S53	D	PL	IE
Interlökin-1beta	İnsan	BR151	F	PL	SE
Proinsülin	İnsan	1S53	F	PL	SE
Doku plazminojen aktivatörü	İnsan	DB104	D	PL	IE

Not: D, direk; F, füzyon; CI, kromozomal integrasyon; PL, plazmid vektör; IE, intrasellüler ekspresyon; SE, salgılanan. **Geobacillus stearothermophilus*, eskiden *Bacillus stearothermophilus.*

2.6. Amilazlar

Amilolitik enzimler veya diğer bir deyişle amilazlar en basit tanımıyla nişastadaki glikozidik bağları hidroliz eden başlıca etki noktalarına göre; α-amilaz, β-amilaz ve glukoamilazdan oluşmuş enzim grubudur (Taniguchi ve Honnda 2009, Polaina ve MacCabe 2007). Amilazlar nişastanın endüstriyel dönüşümündeki spesifik kullanımından dolayı önemli enzimlerdir. Bu enzimler nişasta ve bağlı oligo ve polisakkaritlere etki eder. Nişastanın hidrolizine yönelik evrensel araştırmalar, DNA dizisi, üç boyutlu yapısı ve katalitik mekanizması özellikle bir enzim ailesi üzerinde yoğunlaşmıştır; α-amilaz (Sing Nigam 2013). Ancak son zamanlarda bulunan yeni enzimler, bilinen enzimlerin nişasta üzerindeki yeni etkileri ve enzimlerin birincil ve üçüncül yapıları hakkındaki bilgi birikimi amilaz kavramını genişletmiştir (Taniguchi ve Honnda 2009). Enzimlere artan talepten dolayı çalışmalar, enzimlerin keşfi ile nişastanın degredasyon özelliklerinin geliştirilmesi ve aynı zamanda amilolitik türevlerin üretim maliyetlerinin azaltılmasına yönelik tekniklerin geliştirilmesine odaklanmıştır (Sivaramakrishnan ve ark. 2006).

Son 10 yıl içinde ortaya çıkan çeşitli endüstriyel uygulamalar için uygun hidroliz enzimlerinin aranması, ayırtedici özelliklerine göre enzimlerin taranmasına yol açmıştır (Costa de Freitas 2014, Sharma ve Satyanarayana 2013). Farklı amilazlar aynı reaksiyona aracılık ettiği halde, (hepsi aynı substratı kullanarak α-glikozidik bağların hidrolizini kataliz eder) yapısal ve mekanik özellikleri oldukça farklıdır. Hem α-amilaz hem β-amilaz TIM-barrel katlanması gösterirler. Katalitik bölgeleri $(\beta/\alpha)_8$-barrel formunda olup 8 paralel β-levhayı kuşatan 8 α-heliks'ten meydana gelmiştir. Ancak detayları birbirinden farklıdır. Glukoamilazlar ise $(\alpha/\alpha)_6$-barrel yapıya sahiptir ve 6 heliks'ten meydana gelmiştir. $(\beta/\alpha)_8$ bölgesindeki levha ve heliksler, $(\alpha/\alpha)_6$ bölgesindeki helikslere uçlardan ve çeşitli uzunlukta döngü bölgeleri ile bağlanır (Şekil 2.5). Amilazlar temel yapılarındaki benzerlik ve farklılıklara göre Glikozid Hidrolazlar ailesinde sınıflandırılmıştır; (i) α-amilazlar GH13, (ii) β-amilazlar GH14, (iii) glukoamilazlar GH15. Bu sınıflandırma CAZy (Carbohydrate Active enZymes) internet sitesinde yer almakta ve amilazların 3 tipi ve reaksiyon mekanizmaları hakkında bilgi vermektedir (Polaina ve MacCabe 2007).



GH-13 α-amilaz

GH-14 β-amilaz

GH-15 glukoamilaz

Şekil 2.5. α-amilaz, β-amilaz ve glukoamilazın üç boyutlu yapıları (Janecek 2005)

2.7. Amilazların Sınıflandırılması

Uluslararası enzim komisyonu, enzimleri EC numarası ile sınıflandırmıştır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) tarafından da bu numaralar yayınlanmıştır. Bu sınıflandırma enzimlerin kataliz ettikleri reaksiyonlara göre yapılmaktadır. Buna göre enzimler, üç EC sınıfına ayrılır:

- transferazlar (EC 2),
- hidrolazlar (EC 3),
- izomerazlar (EC 5)

Enzimler reaksiyon mekanizmalarına göre iki gruba ayrılır:

- retaining (tutucu)
- inverting (çevirici)

β-Amilaz (EC 3.2.1.2) ve glukoamilaz (EC 3.2.1.3) inverting enzimler iken, α-amilaz içeren bütün enzimler (EC 3.2.1.1) retaining enzimdir.

Amilaz grubundaki enzimlerin sınıflandırılmasındaki üçüncü kriter ise α-glukan zincirleri üzerindeki spesifik etkilerine göre:

- exo-acting
- endo-acting enzimler

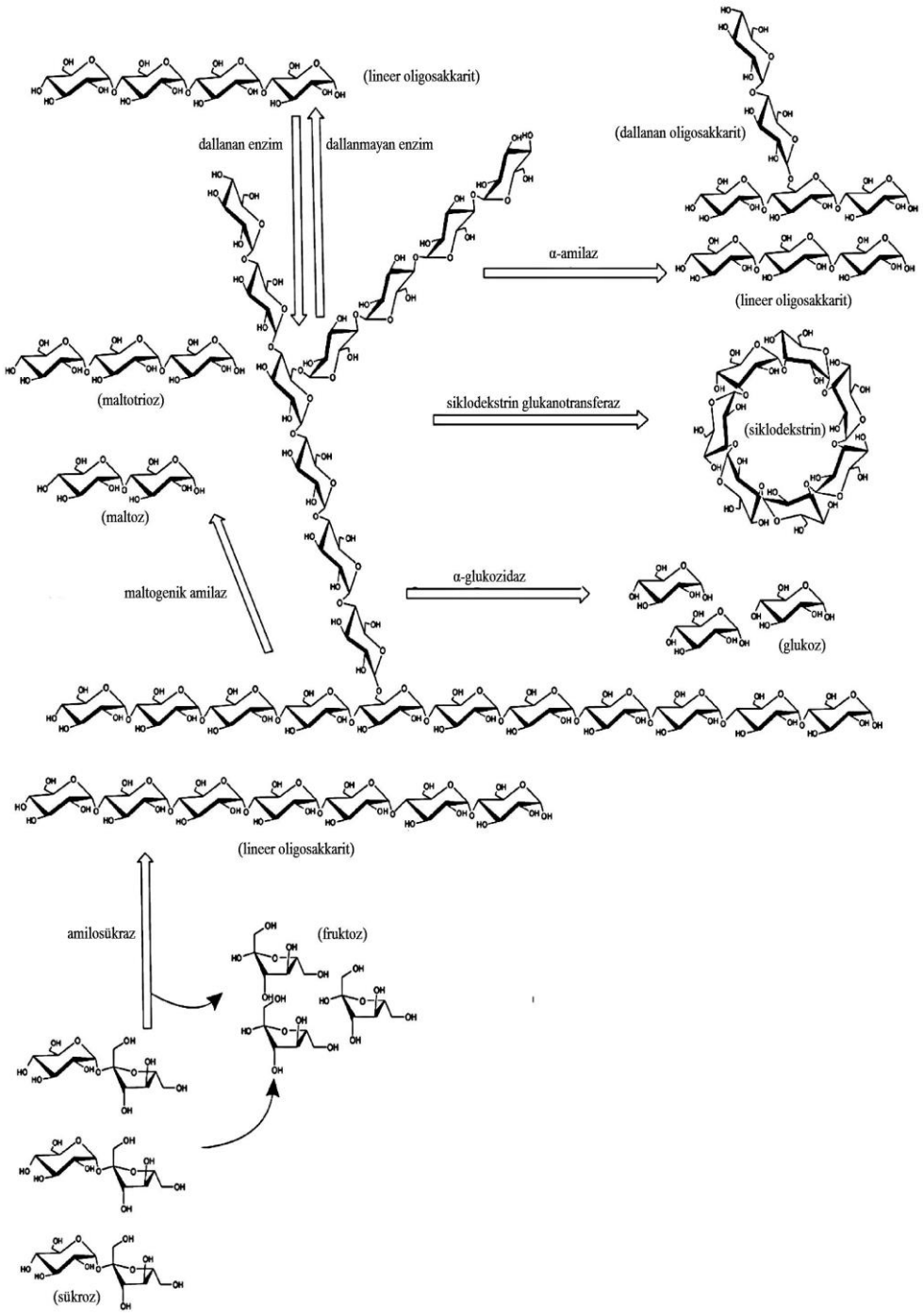
β-Amilaz ve glukoamilaz exo-acting enzimlerdir çünkü α-glukan zincirlerinin indirgen olmayan uçlarına etki eder. α-Amilaz ise endo-acting enzimdir çünkü içteki α-glukanlara etki eder. Bütün mikrobiyal amilazlar 5 Glikozid Hidrolaz (GH) ailesindedir: GH 13, 14, 15, 31 ve 77 (Taniguchi ve Honnda 2009). Bu enzimlerin bazı özellikleri ve fonksiyonları Çizelge 2.4 ve Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Amilazlar (Taniguchi ve Honnda 2009)

Enzim Adı	**EC Numarası**	**GH Ailesi**	**GH13 Alt sınıf**	**Mekanizma**	**Mod**	**Katlanma**	**Baz**	**Asit**
α-Amilaz	3.2.1.1	13	1,(2),5,7,(19),27,28,32	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
β-Amilaz	3.2.1.2	14		I	Ekzo	$(\beta/\alpha)_8$	Glu	Glu
Glukoamilaz	3.2.1.3	15		I	Ekzo	$(\alpha/\alpha)_6$	Glu	Glu
Oligo-1,6-glukozidaz	3.2.1.10	13	31	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
α-Glukozidaz	3.2.1.20	13	21, 29	R	Ekzo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
		31					Asp	Asp
Amilo-1,6-glukozidaz	3.2.1.33	13	25	R	Ekzo?	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
Pullulanaz	3.2.1.41	13	12, 13, 14	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
Siklomaltodekstrinaz	3.2.1.54	13	(20)	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
Glukan-1,4-α-maltotetrahidrolaz	3.2.1.60	13	NC	R	Ekzo?	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
İzoamilaz	3.2.1.68	13	11	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
Glukan-1,4-α-maltohekzahidrolaz	3.2.1.98	13	(19)	R	Ekzo?	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
Glukan-1,4-α-maltotrihidrolaz	3.2.1.116	NC	NC	R	Endo	NK	NK	NK
Glukan-1,4-α-maltohidrolaz	3.2.1.133	13	(20)	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
Neopullulanaz	3.2.1.135	13	(20)	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
4-α-D-glukanotrehaloz trehalohidrolaz	3.2.1.141	13	10	R	Ekzo?	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
Dallanan enzim	2.4.1.18	13	9	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
Siklomaltodekstrin glukanotransferaz	2.4.1.19	13	2	R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
4-α-glukanotransferaz	2.4.1.25	77		R	Endo	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu
4-α-glukan 1-α-D-glukosilmutaz	5.4.99.15	13	26	R	Ekzo?	$(\beta/\alpha)_8$	Asp	Glu

Not: NC (not classified), sınıflandırılmamış; NK (not known), bilinmeyen.

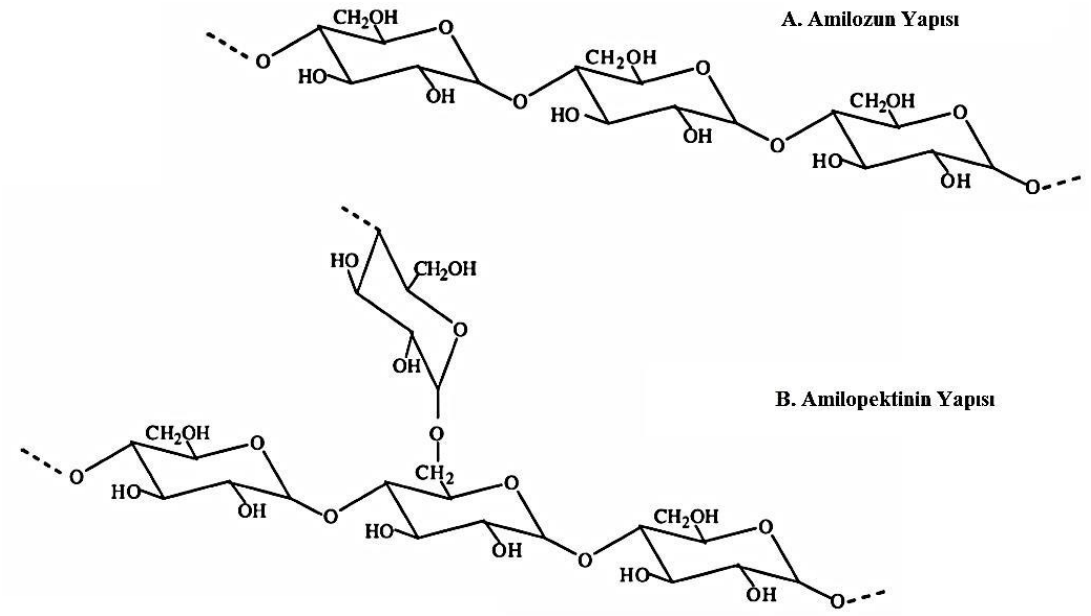
Çizelge 2.4'te yer alan amilaz ailesindeki bazı enzimlerin fonksiyonları Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Amilaz ailesindeki bazı enzimlerin fonksiyonları (Maktouf 2013, Kelly ve ark. 2009)

2.8. Amilazların Substratı Nişasta

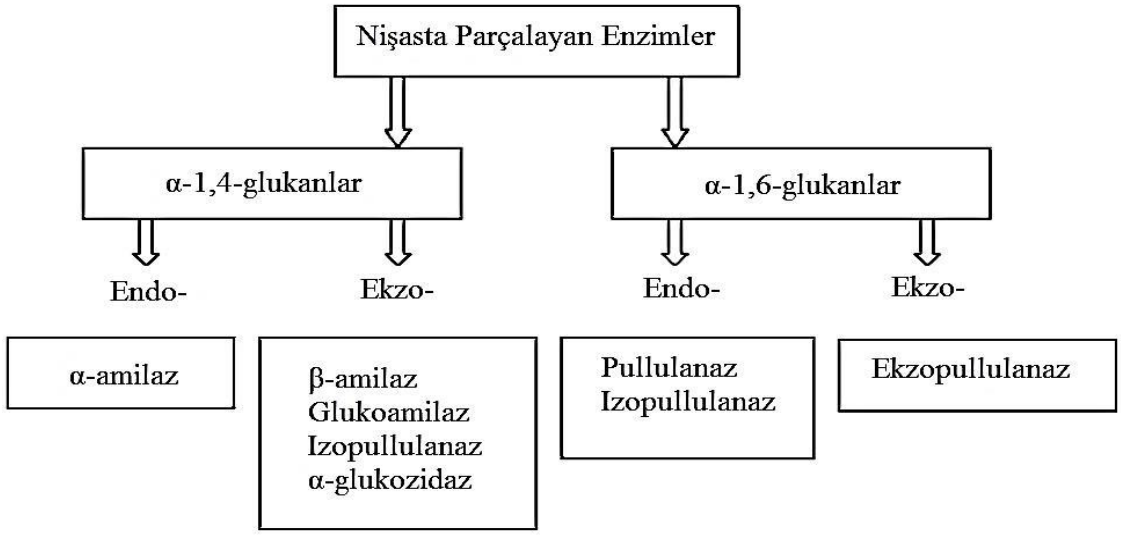
Nişasta, doğada bol olarak bulunan, doğal olarak yenilenebilen, biyodegradasyona uğrayabilen, ucuz ve pek çok endüstrinin kullandığı bir polisakkarittir (Sun ve ark. 2014, Man ve ark. 2013). Nişasta α-glikozidik bağlarla bağlı glikoz içerir (Polaina ve MacCabe 2007). Bu glikozidik bağlar yüksek pH'da stabil iken düşük pH'da hidroliz olur (Maarel ve ark. 2002). Nişasta, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki farklı kısımdan oluşur; amiloz- lineer α-1,4 bağlı glukanlar ve amilopektin- lineer α-1,4 bağlı glukanlar ve α-1,6 bağlı glukanlar (Maarel ve ark. 2002, Bertoldo ve Antranikian 2002) (Şekil 2.7). Amiloz α-1,4 glikozidik bağları ile bağlı 6000 glikoz ünitesinden oluşan lineer bir polimerdir. Amilopektin; α-1,4 bağları ile bağlı 10-60 glikoz ünitesi ve α-1,6 bağları ile yan zincirlerine bağlı 15-45 glikoz ünitesinden oluşmaktadır (Souza ve Magalhaes 2010, El-Fallah ve ark. 2012). Şekil 2.7.



Şekil 2.7. Amiloz ve Amilopektinin Yapısı (Souza ve Magalhaes 2010)

Glikoz ünitelerinin sayısı aynı zamanda DP (degree of polymerization) terimi ile de ifade edilmektedir. Amilopektin suda çözünebilirken, amiloz ve nişasta granülleri soğuk suda kendi kendilerine çözünemezler. Amilopektin yapısının en yaygın olarak kabul edilen modeli, yan zincirleri, omurga zincirleri üzerinde kümeler halinde sıralanan

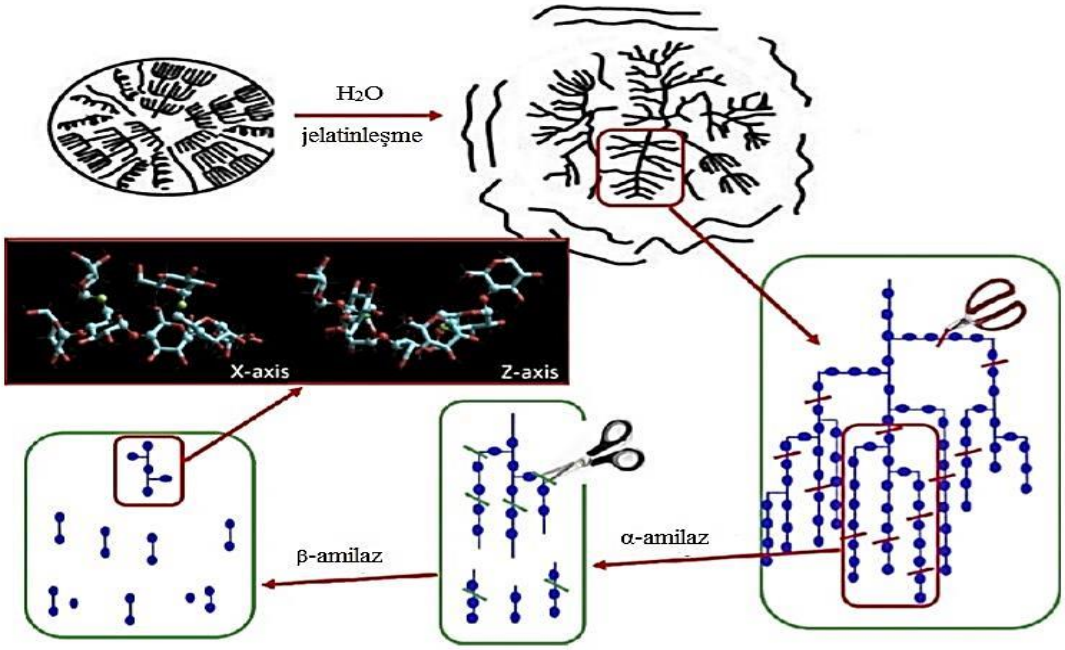
küme modelidir. Son zamanlarda kabul edilen konseptlere göre amiloz genellikle amorf formda bulunurken amilopektin kristal formdadır. Doğal nişasta ise kısmen kristal haldedir (El-Fallal ve ark. 2012).



Şekil 2.8. Nişasta parçalayan enzimler (Polaina ve MacCabe 2007)

Nişastanın gıda ve gıda dışı (farmösötik, kağıt, tutkal, paketleme, biofuel gibi) pek çok endüstriyel uygulamaları mevcuttur. Bu uygulamaların gerçekleştirilebilmesi için asit, alkali, enzim veya hidrotermal (jelatinleşme/erime) işlemlere tabi tutulması gerekir. Nişastanın enzimatik hidrolizi (Şekil 2.8) pek çok biyolojik ve endüstriyel süreç içerir (Man ve ark. 2013).

Nişasta insan beslenmesinde de önemli bir bileşendir ve bu amaç için, kimyasal ve enzimatik olarak işlenerek nişasta hidrolizatları, glikoz şurupları, fruktoz, maltodekstrin türevleri ya da siklodekstrinler gibi ürünler halinde gıda endüstrisinde kullanılır (Souza ve Magalhaes 2010). Ayrıca nişasta, gıdaların yapısal özelliklerine büyük ölçüde katkıda bulunur ve geniş bir kıvam verici, kolloidal sabitleyici, jelleştirme maddesi, hacim arttırıcı madde ve su tutucu bir ajan olarak da kullanılır (Singha ve ark. 2007). Son zamanlarda güncel bir konu olan nişastanın α-amilaz tarafından retrogradasyonu nişastanın yapısını ve ürününü değiştirir. Böylece düşük ve orta moleküler ağırlıkta dekstrinlerin oluşumuna yol açar. Şekil 2.9'da görüldüğü gibi enzimlerin bayatlamayı önleyici etkisi hem nişastanın yapısını hem de dekstrin formasyonunu değiştirmektedir (Xu ve ark. 2014).



Şekil 2.9. Nişastadaki dallanmış limit dektrinler ve enzimle hidrolizi (Xu ve ark. 2014)

2.9. α-Amilazlar

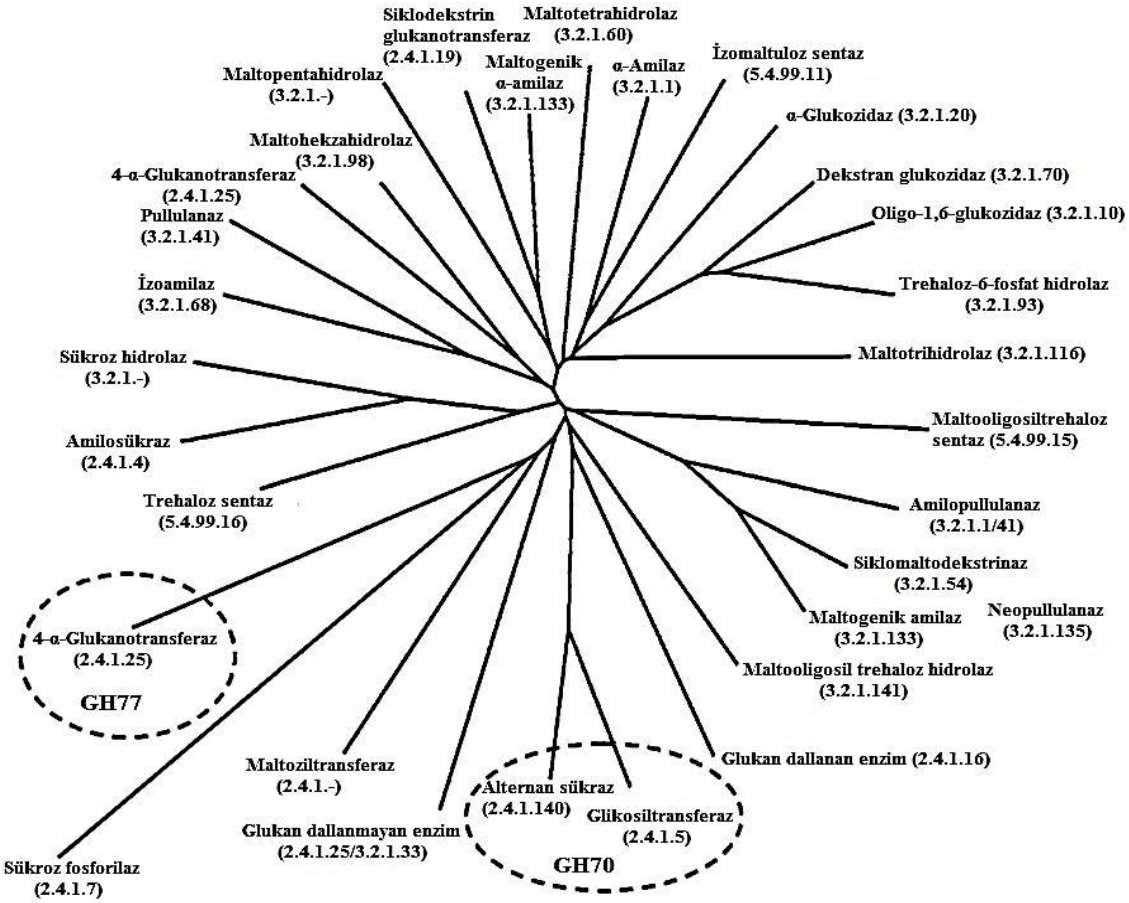
α-Amilaz, (1,4-α-D-glukan glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1) nişastadaki α-1,4 glikozidik bağlarının hidrolizini katalizler (Mariano da Silva ve ark 2014, Lan Tran ve ark 2014, Vengadaramana 2013). Amilazların içerisinde en popüler ve endüstriyel açıdan en önemli olan sınıf α-amilazlardır (Polaina ve MacCabe 2007). α-Amilazların CAZy (Carbohydrate Active enzymes) sitesinde yer alan bilgileri (Şekil 2.10), evrim ağacı (Şekil 2.11) ve korunmuş bölgeler (Şekil 2.12) aşağıda verilmiştir.

EC 3.2.1.1

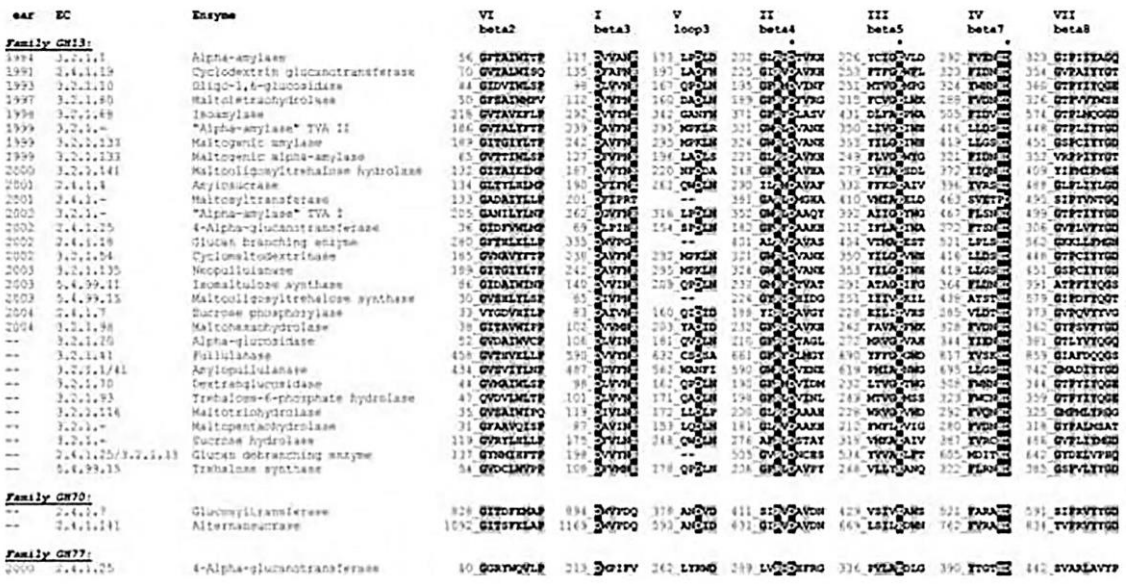
Accepted name:	α-amylase
Reaction:	Endohydrolysis of (1→4)-α-D-glucosidic linkages in polysaccharides containing three or more (1→4)-α-linked D-glucose units
Other name(s):	glycogenase; α amylase, α-amylase; endoamylase; Taka-amylase A; 1,4-α-D-glucan glucanohydrolase
Systematic name:	4-α-D-glucan glucanohydrolase
Comments:	Acts on starch, glycogen and related polysaccharides and oligosaccharides in a random manner; reducing groups are liberated in the α-configuration. The term "α" relates to the initial anomeric configuration of the free sugar group released and not to the configuration of the linkage hydrolysed.
References:	[689, 1555, 2267]

[EC 3.2.1.1 created 1961]

Şekil 2.10. CAZy sitesinde yer alan α-amilaz bilgileri (Erişim, 08.04.2014)



Şekil 2.11. α-Amilaz ailesinin GH-H klanlarına göre evrim ağacı (Polaina ve MacCabe 2007)



Şekil 2.12. α-Amilaz ailesinde korunmuş bölgeler (Polaina ve MacCabe 2007)

Şekil 2.11'deki evrim ağacında GH-H klanlarını GH13, GH70 ve GH77 ailesi oluşturmaktadır ve bunlar α-amilaz ailesi olarak adlandırılmaktadır. Şekli basitleştirmek adına, ağaç; korunmuş dizi bölgelerinin hizalanmasına dayanmaktadır, yani tam amino asit dizilerini yansıtmamaktadır. Şekil 2.12'de görüldüğü gibi her bir enzim için temsili yapı sunulmuştur. En az %50 oranında korunmuş diziler siyah renkte gösterilmiştir, diğerleri ise gri renklidir (Polaina ve MacCabe 2007).

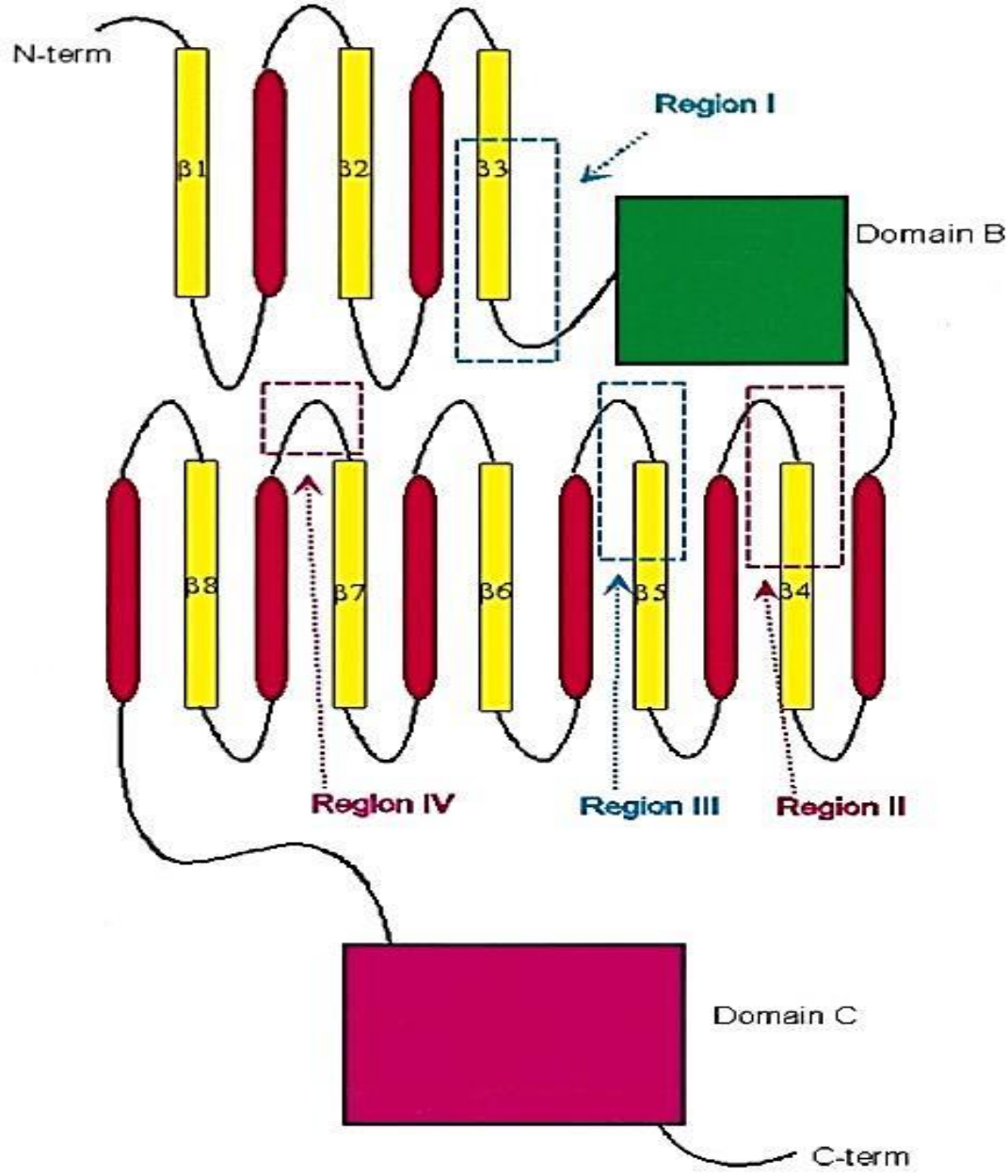
2.10. α-Amilazın Üç Boyutlu Yapısı

X ışını çalışmalarına göre α-amilazlar A, B ve C diye adlandırılan 3 bölgeden oluşmuştur. Merkez $(\beta/\alpha)_8$-barrel (A bölgesi) formunda olup üç aktif Asp231, Glu261 ve Asp328 bölge artıklarını içermektedir (Jeon ve ark. 2014). B ve C bölgeleri ise TIM-barrel bölgesinin çaprazındadır. B bölgesi TIM-barrel bölgesinin üçüncü heliksi ve üçüncü levha arasında bir çıkıntı oluşturur. B bölgesi, oldukça düzensiz, β-zengin yapı ve α-amilazlar arasında çeşitli boyut ve yapıya sahiptir. B bölgesi substrat bağlama bölgesinin büyük bir bölümünü oluşturur (El-Fallal ve ark. 2012) ve α-amilazlar arasında gözlemlenen substrat farklılıkları için önemli olduğu kabul edilir. C bölgesi C-terminal parçasını ve bir Yunan anahtar motifini içeren L-sandviç bölgesini teşkil eder. Memeli α-amilazları birkaç disülfid köprüsü içerirken bakteriyel enzimler genellikle bu durumdan yoksundurlar. Ancak *Alteromonas haloplanctis* α-amilazı 4 disülfid köprüsü içerir ve bu anlamda memeli enzimlerine benzerlik gösterir. Bütün bilinen α-amilazlar A ve B bölgesi arasında konumlanmış kalsiyum iyonları içerir (Nielsen ve Borchert 2000) (Şekil 2.13).



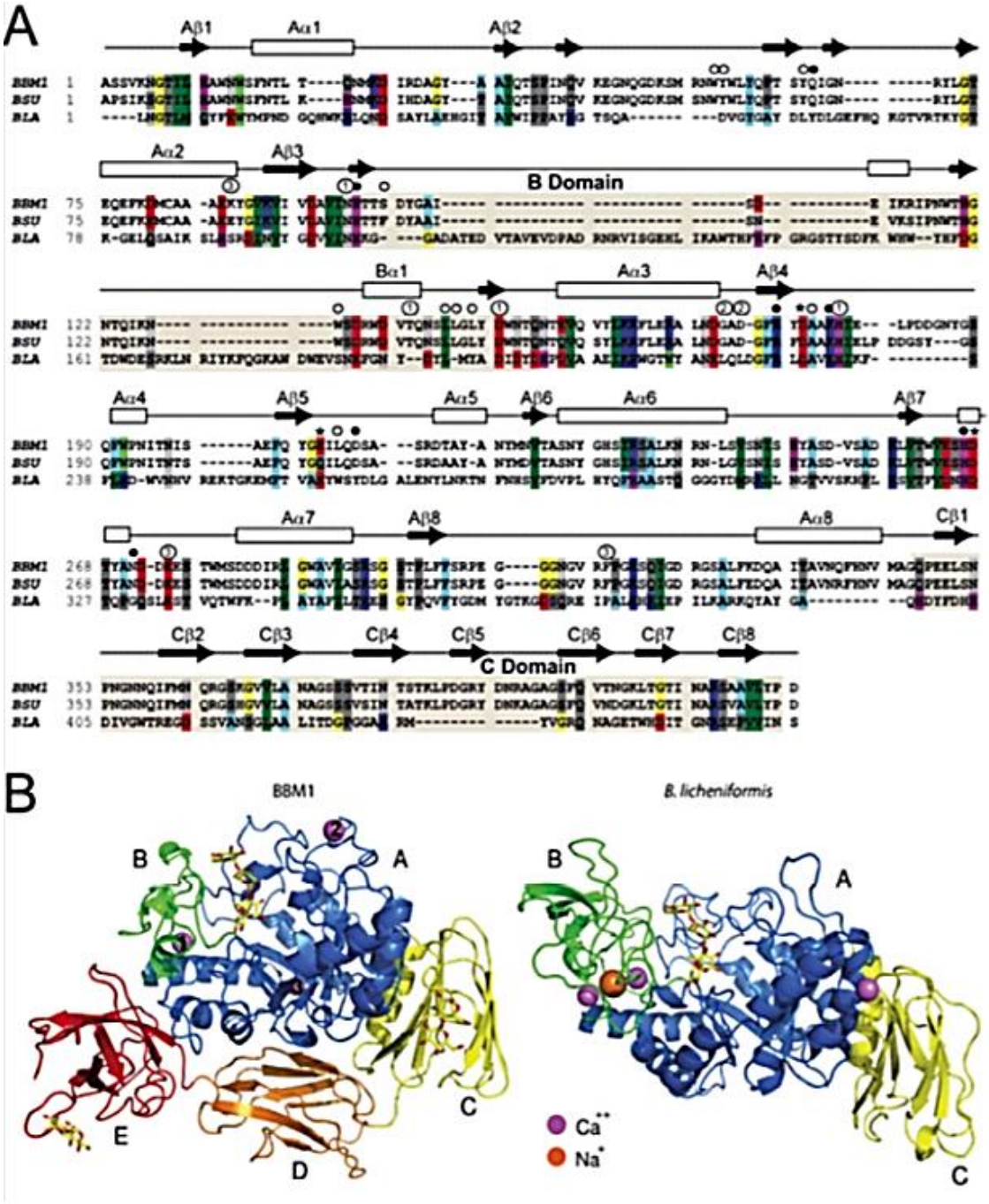
Şekil 2.13. *Bacillus subtilis* α-amilazının üç boyutlu yapısı. A bölgesi yeşil, B bölgesi mor, C bölgesi mavi, aktif bölgeye bağlanmış maltopentoz sarı renk ve Ca iyonları kırmızı küre ile gösterilmiştir (Nielsen ve Borchert 2000)

Şekil 2.14'te görüldüğü gibi 7 α-heliks ve 7 β-iplikleri ile bağlantılı döngüde ve TIM-barrelde bulunan 3, 4, 5 β-ipliklerinde en az dört tane korunmuş kalıp (I-IV numaralandırılmış) bulunmaktadır (Nielsen ve Borchert 2000).



Şekil 2.14. α-Amilazın topolojisi (Nielsen ve Borchert 2000)

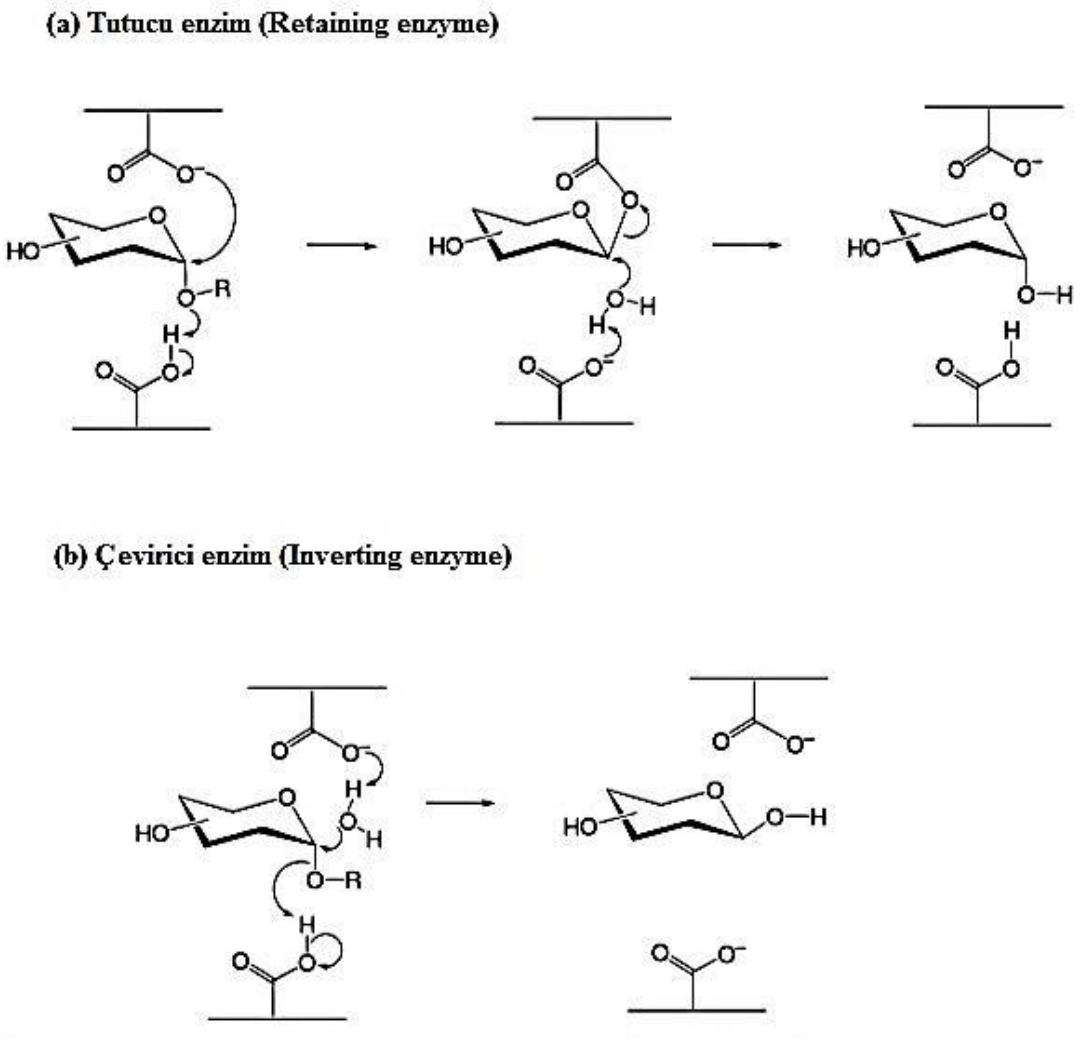
CAZy veritabanında α-amilazlar GH13 ailesinde gruplandırılmıştır. Bu çok büyük grupta α-amilaz sekansı gibi sekans belirlemek için deney sonuçları gerekmektedir. Yaklaşımlardan biri de bilinen bir α-amilaz sekansına, söz konusu protein sekansı ve korunmuş sekans hizalama kalıpları için bakmaktır (Nielsen ve Borchert 2000).



Şekil 2.15. *B. subtilis* (BSU), *B. licheniformis* (BLA) ve *Bacillus* sp. BBM1 α-amilazının dizi ve üç boyutlu yapılarının karşılaştırılması (Munoz ve ark. 2011)

α-Amilazlar arasındaki iyon, substrat gibi ilişkiyi anlamak için homoloji modeli oluşturulmaktadır. Şekil 2.15'te görüldüğü gibi araştırmacılar karakterizasyonunu yaptıkları *Bacillus* sp. BBM1 α-amilazının üç boyutlu yapısı tanımlanmış ve protein databank verilerinde bulunan *B. subtilis* (PDBid: 1BAG) ile karşılaştırmışlardır.

2.11. α-Amilazın Reaksiyon Mekanizması



Şekil 2.16. Tutucu (Retaining) ve Çevirici (Inverting) mekanizmalar (a) Tutucu mekanizma (b) Çevirici mekanizma (Taniguchi ve Honnda 2009).

Enzimlerin pek çoğu amilazların retaining (tutucu) tipinde olup substratların α-konfigürasyonu ürünlerde korunur. Diğer enzimler inverting (çevirici) tipte reaksiyonları kataliz eder, substratlardaki konfigürasyon ürünlere dönüşür. β-amilaz ve glukoamilaz ise sırasıyla β-maltoz ve β-glukoz ürünlerinin oluştuğu sonraki reaksiyonları izler. Her iki enzim tipi asidik katalitik amino asit rezidülerine sahiptir, biri proton verici (genellikle asit) ve diğeri nükleofil (baz) olarak hareket eder. İki reaksiyonun moleküler mekanizmalarını açıklamak için öne sürülen iki teori vardır: Kovalent bağlı ara teorisi ve karbon iyonları ara teorisi. Birinci teoriye göre, katalitik reaksiyonlar substrat ve enzim protein arasında kovalent olarak bağlanmış bir ara bağ

oluşumu ile devam eder. İkinci teoriye göre kovalent bağlar oluşturan reaksiyonlar olmadan karbonyum iyonu ile devam eder. Kovalent olarak bağlanmış ara madde teorisine göre, iki reaksiyonunun mekanizması Şekil 2.16'da gösterilmiştir. Retaining reaksiyonu (Şekil 2.16a)'da, glikosil oksijene proton veren α-bağı ile klivaj edilmiş proton verici (genellikle asit) takılan ve bununla işbirliği içinde nükleofil ile doğrudan karşı tarafta oksijenin yanında β-konfigürasyonunda (birinci Walden inversiyon) kovalent olarak bağlanmış anomerik karbona bir ara ürün oluşturmak üzere saldırır. Bir sonraki adımda protonu giderilmiş proton donörü, sırayla, su molekülündeki hidrojene saldırır. Aktive edilmiş su molekülü α-glukoz (ikinci Walden inversiyonu) oluşturmak üzere karşı tarafta anomerik karbona saldırır. İkinci Walden inversiyonunun bir sonucu olarak, substrat içindeki anomerik konfigürasyon, üründe muhafaza edilir. Retaining enzimde, nükleofile yakın konumlandırılmış inverting enzimin tersine, su molekülü, katalitik bölgedeki proton verici yakınında yer almaktadır. Şekilde belirtildiği gibi katalitik bölgedeki su moleküllerinin bu farklı pozisyonları α-amilaz, β-amilaz ve glukoamilaz gruplarına ait bazı enzim proteinleri için teyit edilmiştir. Inverting reaksiyonda bu artıklardaki su moleküllerini aktive eder (Şekil 2.16b). Aktive olmuş su molekülleri daha sonra β-glikoz oluşturmak için karşı taraftaki anomerik karbona saldırır. Sonuç olarak, substratlardaki α-konfigürasyonu ürünlerde β-konfigürasyonuna dönüştürülür. Amilaz reaksiyonu genellikle sulu bir çözelti içinde gerçekleştiği için, reaksiyona, su molekülü katıldığında pratik olarak geri döndürülemez. Retaining reaksiyonları kataliz eden enzimler transglikosilasyon reaksiyonları gerçekleştirebilir çünkü kovalent ara madde sadece su ile değil aynı zamanda şeker ve alkollerin hidroksil grubu ile de reaksiyon gerçekleştirebilir. Bunun tersine aktive edilmiş su molekülü, substrat ile kovalent bir bağ oluşturur, çünkü faz değiştirici reaksiyonu kataliz eden enzimler, kovalent olarak bağlanmış bir ara ürün oluşturmaz. (Taniguchi ve Honnda 2009)

2.12. α-Amilazın Endüstriyel Uygulamaları

Ekonomik açıdan önemli α-amilazların üretimi için nişastanın oligosakkaritlere dönüşümü şarttır. Bu enzim çoğunlukla kağıt, gıda, farmösötik, şeker endüstrisi, deterjan ve nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılır (Hussain ve ark. 2013, Kumar Sen ve ark. 2014). Biyoteknolojide yeni alanların açılmasıyla α-amilazların uygulama

spekturumu genişlemiş ve klinik, tıp ve analitik kimya gibi alanlara kaymıştır (Mobini-Dehkordi ve Afzal Javan 2012).

Glukoz ve fruktoz endüstrisi: Pek çok endüstri, α-amilazı, glukoz üretimi için kullanır. Bu enzim nişastayı hidroliz ederek maltoz ve glukoza dönüştürür. Bu nedenle glukoz üretimi için nişastaya dayalı endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Konsula and Kyriakides 2004). Bu süreç ayrıca suda çözünür dekstrin ürününü vermektedir. Pek çok nişasta veya arpa içerikli gıda bulunmaktadır. Buna uygun olarak α-amilazın eklenmesiyle bu gıdaların besin değeri geliştirilmektedir (Demirkan ve ark. 2005, Hussain ve ark. 2013)

Fırıncılık endüstrisi: Fırıncılıkta kullanılan α-amilaz, ürünlerin geliştirilmesinde kalite, aroma, tat ve gözenek faktörleri üzerinde önemli rol oynamaktadır. Bu enzim Rusya, Amerika ve Avrupa ülkelerinde ekmekten tuzun uzaklaştırılması ve ekmeğe yumuşaklık kazandırılmasına yardım etmektedir (Gupta ve ark. 2008).

Deterjan endüstrisi: α-Amilaz deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılır ve ağartma etkisiyle deterjan kalitesinin iyileştirilmesinde önemli bir rolü vardır. Enzimin eklenmesi deterjan ve kalıp sabun bileşimi içindeki ağartıcı stabilitesini ve etkinliğini artırır (Hussain ve ark. 2013).

Alkol endüstrisi: Fermente olabilen şekerler α-amilazın yardımıyla nişastanın dönüşümü sonucu üretilebilirler. Tahıl gibi nişastalar (örneğin patates) etil alkolün üretimi için biyolojik ve kimyasal reaksiyonların çoğunda önemli bir role sahip olan büyük bir kimyasalın üretimi için gereklidir (Hussain ve ark. 2013).

Tekstil: Tekstil endüstrisinde nişastanın hidrolizi ve çözündürülmesi için α-amilaz yaygın olarak kullanılmaktadır. α-Amilaz, bir boyutlandırma ajanı olarak da kullanılır. Nişasta giysi yıkanmasından sonra bitmiş ürünlerin sertliğini artırır (Bozic ve ark. 2011). Bu nedenle amilazlar haşılsökme (kumaştaki sertliği giderme) ajanı olarak da kullanılır (Gupta ve ark. 2003). Bu enzimin giysilerden nişasta çıkarılmasında önemli bir rolü vardır (Bozic ve ark. 2011).

Kağıt Endüstrisi: α-Amilaz nişasta ile muamele edilmiş kağıttaki nişastanın modifikasyonu için kullanılır. Bu, hem kağıt kalitesini arttırır hem de kağıdın sertlik ve mukavemetini artırarak mekanik hasarlara karşı koruma sağlar. Kağıdın

boyutlandırılması ve kaplanmasında α-amilaz etkisi ile nişastanın glukoz ve fruktoza dönüşümü ön koşuldur. Böylece α-amilaz kağıt boyutlandırılmasında kullanılabilir (Hussain ve ark. 2013).

Yem Endüstrisi: Yem endüstrisinde α-amilaz kullanımı ile vücut kilo alımı ve yem dönüşüm oranının arttığı belirtilmiştir. Ayrıca karbonhidrat sindirilebilirliği artar, nişasta polimerleri glukoz ve fruktoza hidroliz olur (Sidkey ve ark. 2011)

Tıpta: α-Amilazlar Diabetes mellitus, hiperlipidemi, diş çürümesi gibi bazı hastalıklarda kullanılacak ilaçların dizaynı için hedef olarak kullanılır (Mariano da Silva 2014). Pankreatik hastalıkların teşhisi için, insan serumu ve idrarında α-amilaz aktivitesinin belirlenmesi klinik laboratuarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. (Lan Tran ve ark. 2014).

2.13. α-Amilaz Geninin Klonlanması

Genlerin klonlanması, proteinlerin moleküler düzeydeki çalışmalarında, protein mühendisliği ve proteinlerin yüksek üretimi için yaygın olarak yapılmaktadır. α-Amilazların klonlanması genin dizisi, karakteristik özellikleri, yüksek düzeyde üretimi, ekspresyonu ve enzim mühendisliği için yapılmaktadır (Pandey ve ark. 2000). Farklı fungal ve bakteriyel kaynaklardan α-amilaz geni, uygun vektörler kullanılarak uygun konak organizmalara klonlanmaktadır. Farklı sektörlerin farklı fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip α-amilaz talepleri yeni özelliklere sahip enzimlerin arama ve geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Enzim mühendisliği bu hedefe ulaşmak için umut verici bir teknik olarak bilinmektedir. Enzimlerin işlenmesi uygun gende istenen bazı özellikler olan yüksek termostabilite, geniş bir pH profili, Ca bağımsız, ham nişasta parçalama yeteneği, yüksek nişasta konsantrasyonunda aktivite, proteaz direnci, katabolit represyona duyarsız, yüksek ürün kapasitesi ile entegre olmaktadır. Örneğin Asn172®Arg, His156®Tyr and Ala181®Thr'de oluşturulan mutasyonların *B. licheniformis*'in, α-amilazın termal stabilitesini 5 kat arttırdığı bildirilmiştir (Sivaramakrishnan ve ark. 2006). Çizelge 2.5'te klonlanmış bazı α-amilazlar görülmektedir. Gen klonlamanın genel amacı protein sentezini manipüle etmektir. Bunun yapılmasının birkaç sebebi vardır:

(i) Büyük miktarda protein üretmek: Terapötik proteinlerin büyük miktarda üretimi biyoteknolojinin birinci odağı olmuştur. Potansiyel terapötik değerdeki pek çok

protein biyolojik sistemlerde az miktarda bulunur. Bu doğal sistemlerden proteinleri ekonomik olarak saflaştırmak mümkün değildir. Bunu aşmak için istenilen proteini çok miktarda ve etkili bir şekilde üretmek için proteinin geni, uygun bir taşıyıcı sisteme konur. Bu tür farmösötik maddelerin arasında insan insülini, insan büyüme hormonu, interferon, hepatit B aşısı, doku plazminojen aktivatörü, interlökin-2 ve eritropoietin sayılabilir. Proteinin geni hayvana klonlanır ve transgenik hayvandan proteinli süt elde edilebilir.

(ii)Biyolojik yolları manipüle etmek: Gen klonlamanın ortak amaçlarından biri ürün bitkileri ve çiftlik hayvanları geliştirmektir. Bu, biyolojik yolların değişimini içerir ve iki kategoriden oluşur; ya enzim üretimi bloke edilir ya da genin manipülasyonu yoluyla yabancı enzim üretimi uygulanır. Tarım ve gıdada gen klonlama uygulamalarının çoğu 1. kategoriye girmektedir. İyi bilinen bir örneği (antisens tekniği kullanarak) enzim kodlayan genin ekspresyonunu bloke ederek domates hücre duvarında yapısal polimerlerin inhibisyonudur. Böylece azalmış yumuşama ile domatesin renk ve lezzet dolu gelişimi sağlanmış olur. Öte yandan sistemde olmayan yabancı yeni proteinlerin üretimi için yabancı bir gen bitki ve hayvan içine dahil edilebilir. Pest dirençli bitkilerin geliştirilmesi bakteriyel endotoksin klonlanmasıyla oluşturulmuştur. Benzer stratejiler özel hastalıklara dirençli yapı ile çiftlik hayvanları için de uygulanabilir.

(iii)Geni manipüle ederek protein yapı ve fonksiyonunu değiştirmek: Genin manipülasyonu yoluyla protein yapı ve fonksiyonlarında değişiklik yapılabilir. Örneğin gıda ürünlerinin besin değeri tohumların aminoasit içeriğinin değiştirilmesi ile geliştirilebilir (Wong 2006).

Çizelge 2.5. Klonlanan bazı α-amilazlar (Sivaramakrishnan ve ark. 2006)

Gen Kaynağı	Rekombinant konak	Vektör
Aspergillus kawachii IFO 4308	*Saccharomyces cerevisiae*	pYcDE1
Bacillus amyloliquefaciens	*Escherichia coli*	pETAM (derived from pKK233-2 and pET21d)
Halothermothrix orenii	*Escherichia coli*	pBluescript SK^+
Alteromonas haloplanktis (psychrophile)	*Escherichia coli*	pUC12
Lipomyces starkeyi	*Escherichia coli*	pGEM-T
Lipomyces kononenkoae	*Saccharomyces cerevisiae*	YIp5
Thermococcus hydrothermalis	*Escherichia coli*	pBluescript II KS^-

2.14. Rekombinant Enzim Üretiminin Avantajları

Düşük doğal ekspresyon seviyeleri, birçok proteinin doğal kaynaklarından izole edilmesini ve çalışılmasını zorlaştırmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile birlikte, bu teknik zorluğun üstesinden gelinmektedir. Günümüzde, temel olarak, fonksiyonu bilinen veya bilinmeyen herhangi bir proteini kodlayan gen veya cDNA izole edilebilmekte ve uygun bir ekpresyon sistemine klonlanabilmektedir. Bugün, birçok protein gerek endüstriyel anlamda ve gerekse akademik anlamda olsun rekombinant olarak üretilebilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi protein üretiminde, rekombinant olmayan proteinlere göre 3 önemli avantaja sahiptir;

• Kaynak kullanımı probleminin çözülmesi: Bazı proteinlerin (sitokinler gibi) doğal ortamlarında düşük konsantrasyonlarda üretilmesi, bu proteinlerin büyük miktarlarda üretilme zorluğunu arttırmakta veya imkânsız hale getirmektedir. Uygun ekspresyon sistemlerinin kullanımı ile bu problem aşılmaktadır.

• Kaynak güvenliği probleminin çözülmesi: Birçok protein, doğada tehlikeli veya patojenik türler tarafından üretilirler (yılanlar ve çeşitli mikrobiyal patojenler gibi). Bu durum, ham maddelerin bu organizmalardan elde edilmesini zorlaştırmakta ve elde edilecek son üründe zehirli bileşenlerin var olma ihtimalini artırmaktadır. Patojen ve zehirli olmayan konakçı bir hücrede rekombinant üretim yardımıyla bu zorlukların üstesinden gelinebilmektedir.

• Protein mühendisliği ile, proteinlerin amino asit sırasında hedeflenen değişimler yapılabilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimi ile birlikte, bir proteinin aminoasit sırasında değişiklikler yapılabilmektedir. Önceden belirlenmiş spesifik aminoasitleri kodlayan nükleotit sıralarının kontrollü olarak değiştirilmesini gerektiren bu işlem, bölge-spesifik mutasyon veya protein mühendisliği olarak tanımlanmaktadır. Bu değişimler, ekleme (insertion), çıkarma (deletion) veya yer değiştirme (substitution) şeklinde olabilmektedir. Son zamanlarda, enzim mühendisliği ile birlikte katalitik aktivite ve/veya ısıl ve pH kararlılığını artırmak için oldukça fazla çaba harcanmaktadır (Kolcuoğlu 2009, Walsh 2002).

Tezin amacı: Son yıllarda α-amilazların büyük ölçekli üretiminde mikroorganizmalardan yaygın olarak yararlanılmaktadır. Doğal üretici mikroorganizmaların üretim veriminin düşük olmasına karşın, rekombinant DNA teknikleri kullanılarak bu enzimlerin üretilmeleri mümkün olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6051 kullanılarak α-amilaz kodlayan geni klonlamak, klonlama sonucu elde edilecek rekombinant enzimi saflaştırmak, bu enzimin ekspresyonunu yapmak ve karakterizasyonunu araştırmak amaçlanmıştır.

2.15. Önceki Çalışmalar

Asoodeh ve ark. (2014), İran'daki Dig Rostam adlı sıcak su kaynağından izole ettikleri asidofilik bakteri *Bacillus* sp DR 90'a ait α-amilaz geninin pET28a(+) vektörü aracılığıyla *E. coli* BL21(DE3)'de ekspresyonunu incelemişlerdir. Elde ettikleri N-terminal his-tag içeren rekombinant enzimi, nikel metal affinite kromatografisi ile saflaştırmışlardır. SDS-PAGE'de α-amilazın molekül ağırlığını yaklaşık 76 kDa olarak belirlemişlerdir. Rekombinant enzimin geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktif olduğunu, optimum aktiviteyi pH 4.0 ve 75^{o}C sıcaklıkta elde ettiklerini belirtmişlerdir. Enzim aktivitesinin Ca^{2+} ile artış göstermediğini, SDS, üre ve EDTA ile kararlılık gösterdiğini, saflaştırılan enzimin katı ve sıvı deterjanlar ile yüksek derecede uygunluk gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu özelliklere sahip olması nedeniyle elde ettikleri rekombinant α-amilazın endüstriyel alanda özellikle de gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılabileceğini raporlamışlardır.

Han ve ark. (2014), yeşil alglerden ekstrakte ederek elde ettikleri *Enteromorfa* polisakkaritlerinin yüksek molekül ağırlığı ve düşük vizkozitesi nedeniyle uygulamalarının sınırlı olduğunu belirtmişler ve bu soruna çözüm bulabilmek için *Enteromorfa* polisakkaritlerinin yüzeyinde bakteri taraması yapmışlardır. Tarama sonucunda *Alteromonas macleodii* B7 suşunu bulmuşlar ve kültür ortamında üretip kültür üst sıvısından elde ettikleri protein ürününü doğal jel elektroforezine tabi tutmuşlar, *Enteromorfa* polisakkarit liyazı (EPL) ile tekabül eden bir bant bulmuşlardır. *A. macleodii* ATCC 27126'da putatif α-amilazı kütle spektrometrede doğrulamış ve enzim kimliğini tanımlamışlardır. *A. macleodii* ATCC 27126 α-amilazını (*amy*STU) *E. coli*'ye klonlamış ve rekombinant enzimin karakterizasyonunu yapmışlardır. AmySTU'nun soğuğa adapte bir enzim olduğunu ancak optimum aktivitesinin 40^{o}C

olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin geniş bir pH aralığında stabil olduğunu (pH5.5-10) ve optimum pH'sının 7.5-8.0 olduğunu, en yüksek enzim aktivitesinin %2 NaCI konsantrasyonunda elde edildiğini ve dolayısıyla halotolerans olduğunu belirtmişlerdir.

Qin ve ark. (2014), Çin-Fujian kıyı bölgesinden elde ettikleri deniz bakterisi *Zunongwangia profunda* (MCCC 1A01486)'ya ait soğuk aktif ve tuza dayanıklı α-amilaz genini klonlamışlar ve *E. coli*'de ekspresyonunu incelemişlerdir. Genin 1785 bç uzunluğunda olduğunu ve SDS-PAGE'de tespit edilen molekül ağırlığının 66 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Rekombinant α-amilazın maksimum aktiviteyi 35^{o}C ve pH 7.0'de gösterdiğini ve 0^{o}C'de %39 aktif kaldığını belirtmişlerdir. Enzimin yüksek tuz konsantrasyonuna tolerans gösterdiğini ve en yüksek aktiviteyi 1.5 M NaCl'de gösterdiğini ve 4 M NaCl'de %93 aktif kaldığını tespit etmişlerdir. AmyZ'nin hem yüksek tuz konsantrasyonuna ve hem de düşük sıcaklığa tolerans gösteren nadir α-amilazlardan biri olduğunu belirtmişlerdir.

Roy ve ark. (2013), *Bacillus subtilis* AS01 suşundan α-amilaz genini (amyBS-1) klonlamışlar ve bu genin *E.coli* BL21'de ekspresyonunu incelemişlerdir. 656 aminoasitten oluşan amyBS-1'in molekül ağırlığını ve pI değerini sırasıyla 72 387 Da ve 5.8 olarak tespit etmişlerdir. amyBS-1'in ekstrasellüler enzim salgısı, responce surface optimization (RSO, yüzey optimizasyon tepkisi), kültür şartlarında incelenmiş ve optimize edilmemiş kültür şartlarından 7 kat yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Saflaştırdıkları enzimin optimum aktivitesini 70^{o}C ve pH 6.0 değerlerinde tespit etmişlerdir. Enzimin Km ve Vmax değerlerini 2.7 mg/mL ve 454 U/mL olarak sırasıyla tespit etmişlerdir. Sonuçta elde ettikleri rekombinant enzimin fırıncılıkta kullanılan ticari α-amilazdan daha fazla gelişme gösterdiğini raporlamışlardır.

Tuzlakoğlu Öztürk ve ark. (2013), Türkiye'nin çeşitli yerlerindeki sıcak su kaynaklarından topladıkları 597 bakteriyel izolatın ekstrasellüler α-amilaz üretme kabiliyetini incelemişler ve içlerinden en fazla α-amilaz üreten *Bacillus subtilis* A28 suşunu seçmişlerdir. Bu suşa ait α-amilaz genini klonlamışlar ve ligaz bağımsız metoduyla *E. coli*'de ekspresyonunu incelemişlerdir. Daha sonra rekombinant suştan α-amilazı, Q-Sepharose anion exchange ve Sephacryl S-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Nihai enzim verimini, kültür lizatı ile karşılaştırdıklarında 16.4 kat

artış ile başlangıç aktivitesinin %22.5'i olarak tespit etmişlerdir. Optimum sıcaklık ve pH'yı, 70^{o}C ve 6.0 olarak sırasıyla belirtmişlerdir. Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Ni^{2+} ve Zn^{2+} nin enzim aktivitesini inhibe ettiğini; Na^{+}, Mg^{2+}, Li^{+}, Ba^{2+} nın ise etkilemediğini tespit etmişlerdir.

Afzal-Javan ve Mobini-Dehkordi (2013), İran'da topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis*'e ait α-amilaz kodlayan geni *NotI* ve *AscI* restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerini içeren spesifik primerler ile PCR'da amplifiye etmişler ve daha sonra bu genin dizi analizini yapmışlardır. Saflaştırdıkları PCR ürününü ve p316TDH3 vektörünü aynı restriksiyon enzimleriyle kesip *E. coli*'ye klonlamışlardır. Çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* konak olarak kullanılmıştır. Rekombinant plazmid oluşturulduktan ve *E. coli* kompotent hücrelerine aktarıldıktan sonra koloni seçimi ve doğrulamasını yaparak ekstrakte edilen plazmidi maya hücrelerine aktarmışlardır. Rekombinant maya hücrelerinin minimal ortamda büyümesini sağlayarak ekstrasellüler enzim üretimini sağlamışlardır.

Yang ve ark. (2013), alkalifilik *Alkalimonas amylolytica*'ya ait alkalin α-amilaz genini kodon kullanımı temelinde *E. coli* ve *Pichia pastoris*'te sırasıyla sentezlemişler ve heterolog konakları olan *E. coli* BL21 (DE3) ve *P. pastoris* GS115'te ekspresyonunu incelemişlerdir. *E. coli*'de eksprese olan alkalin α-amilazı AmyA ve *P. pastoris*'te ise AmyB olarak adlandırmışlardır. AmyA ve AmyB'nin spesifik aktivitesini 16.0 ve 16.6 U/mg, pH 9.5 ve 50^{o}C olarak sırasıyla tespit etmişlerdir. Optimum pH ve pH stabiliteleri benzer iken AmyB'nin sıcaklık ve termal stabilitesi AmyA ile karşılaştırıldığında bir miktar daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara dayanarak *P. pastoris*'in alkalin α-amilazın üretimi ve ekspresyonu için tercih edilebileceğini ve bu enzimin katı deterjanlara uygulama potansiyelinin olabileceğini belirtmişlerdir.

Jun Wang ve ark. (2012), *Bacillus subtilis*'e ait amyE geninin *Zymomonas mobilis*'e klonlanması, ekspresyonu ve çözünebilir nişastadan etanol üretimini araştırmışlardır. Araştırmacıların belirttiklerine göre *Z. mobilis* doğada bulunan polisakkaritleri hidroliz edememektedir. Nişasta bol yenilenebilir bir karbon kaynağı ve etanol üretimi için önemli bir substrat olma potansiyeline sahip olduğundan *Z.*

mobilis'te nişasta kullanan sistemler oluşturmak için α-amilazı kodlayan gen *Z. mobilis*'e aktarılmıştır.

Chai ve ark. (2012), çalışmalarında kullandıkları biyolojik materyalleri Malezya'daki iki sıcak su kaynağından izole edip amilolitik aktivitelerini incelemişlerdir. İki *Anoxybacillus* türüne ait α-amilazı kodlayan iki geni *E. coli*'ye klonlamış ve ekpresyonunu incelemişlerdir. Araştırmacıların belirttiklerine göre genler 1518 bç uzunluğunda olup 506 aminoasiti kodlamaktadır ve dizilerin benzerliği %98'dir. Ancak bilinen α-amilazlardan farklıdır. ASKA (*Anoxybacillus* Sungai Klah) ve ADTA (*Anoxybacillus* Dusun Tua) olarak adlandırdıkları rekombinant enzimleri α-CD-Sepharose kolon kullanarak saflaştırmışlardır. Optimum aktiviteyi 60^{o}C ve pH 8.0 olarak tespit etmişlerdir. 60^{o}C'de Ca^{2+} yokluğunda 48 saate kadar aktivitede ihmal edilecek miktarda azalma gözlemişlerdir. Aktivitenin yarılanma ömrünü 65^{o}C'de 48 ve 3 saat olarak ASKA ve ADTA için sırasıyla tespit etmişlerdir. *Anoxybacillus* türüne ait α-amilazların yüksek seviyede maltoz ürettiğini ve bilinen α-amilazlar ile karşılaştırıldığında atipik protein dizisine sahip olduğunu gösteren ilk rapor olduğunu belirtmişlerdir.

Mathur ve Chand (2011), *Bacillus amyloliquefaciens* MTCC 610 suşuna ait α-amilaz (amyE) genini, *E. coli* DH5α'ya klonlamışlar ve bu genin ekspresyonunu incelemişlerdir. Ekspresyon vektörleri olarak pET29b, pET32b, pET43b ve pCS22 kullanmışlardır. Ayrıca rekombinant konakçıda fermantasyon sırasında özgül oksijen alım hızı ve konak hücreye yüklenen metabolitlerin hücre fizyolojisinde oluşturduğu değişimleri incelemişlerdir. Araştırmacıların belirttiklerine göre herhangi bir heterolog gen ürününün klonlanması ve ifadesi her zaman rekombinant hücre fizyolojisinde varyasyonlar ile sonuçlanmaktadır. Çalışmalarında oksijen kullanımının metabolik hız akışını ve yolları etkileyerek hücre büyümesini ve ürün formasyonunu etkileyen önemli bir parametre olduğunu belgelemişlerdir.

Li ve ark (2011), çalışmalarında RoAmy olarak adlandırdıkları putatif α-amilaz genini *Rhizopus oryzae*'den klonlamışlardır. Tespit edilen amino asit dizisinin *Trichoderma viride* α-amilazına %42.8 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. RoAmy genini *Pichia pastoris* GS115'te başarılı bir şekilde eksprese etmişlerdir. Saflaştırdıkları RoAmy'nin molekül ağırlığını SDS-PAGE'de 48 kDa, optimum pH ve sıcaklığı 4-6 ve

60^{o}C olarak sırasıyla tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin Km ve Vmax değerlerini 0.27 mg/ml ve 0.068 mg/dk olarak sırasıyla ve spesifik aktivitesini 1.123 U/mg olarak belirtmişlerdir. Amilaz aktivitesinin 5mM Cu^{2+} ve 5 mM Fe^{2+} ile kuvvetli inhibe olduğunu ancak 5 mM Ca^{2+} nın önemli bir etki göstermediğini tespit etmişlerdir.

Rabbani ve ark. (2011), çalışmalarının amacını *B. subtilis* 168 suşuna ait ve rastgele mutasyona uğratılmış α-amilaz genini izole etmek ve ekspresyonunu sağlamak olarak açıklamışlardır. BS168F: 5'-GTGTCAAGAATGTTTGC-3' ve BS168R: 3'-GTTTTGTTAAAAGATGA-5' primerlerini kullanarak error-prone PCR metodu: 94^{o}C'de 30 sn, 40^{o}C'de 2 dk 30 döngü ve son döngü olarak 72^{o}C'de 2 dk ile α-amilaz genini amplifiye etmişlerdir. Plazmid inşasında konak olarak *E. coli* XL1 blue kullanmışlardır. Amilaz aktivite değerlerini spektrofotometrik prosedürler kullanarak ölçmüşlerdir. Dizi analizi sonuçlarının, doğru ORF ile ilk ATG'den klonlanmış dizi olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir. Ekspresyon vektörü pET-15b'ye genin ligasyonunu yapmışlar ve kesim analizlerini kullanarak doğrulama yapmışlardır. Amilaz aktivitesini mutasyona uğratılmamış tipler ile karşılaştırdıklarında 3 klonun yüksek enzim aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Zhang ve Zeng (2011), Antartika derin deniz psikotolerantı olan ve ekstrasellüler α-amilaz üretme yeteneğine sahip olan *Pseudomonas stutzeri* 7193 suşundan bu enzimin moleküler klonlanması ve ekspresyonunu araştırmışlardır. Araştırmacıların belirttiklerine göre 59 678 Da protein (AmyP), 1665-bç gen (*amyP*) tarafından kodlanmaktadır. Rekombinant *E. coli* TOP10 F0 ve 7193 suşundan AmyP amilazlarını saflaştırmışlardır. Daha sonra yaptıkları biyokimyasal karakterizasyonlarla optimum amilaz aktivitesini pH 9.0, sıcaklığı 40^{o}C olarak tespit etmişlerdir. İnce tabaka kromatografi analizlerinde amilolitik reaksiyon ürünleri maltotetroz, maltotrioz, maltoz ve glukozun nişasta hidrolizinde etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Böylece AmyP enziminin 7193 suşundan ve *amyP*'nin rekombinant *E. coli* suşundan oligosakkaritlerin endüstriyel üretimleri için potansiyel aday olabileceği sonucunu elde etmişlerdir.

Yamaguchi ve ark. (2011), aktif α-amilaz üreten halofilik bakteri *Kocuria varians*'ın kültür ortamında bu enzimin altı farklı formunu salgılayabildiğini gözlemlemişler, bu formları (*K. varians* α-amilaz (KVA)) olarak adlandırarak KVA formlarının karakterizasyonunu ve ilgili genin klonlanmasını araştırmışlardır.

Rekombinant KVA proteinini füzyon protein olarak *E. coli*'de başarılı bir şekilde eksprese etmişler ve ardından affinite kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Gerçekte KVA'nın tuz ve zamana bağlı termal geri dönüşüm gösterdiğini; α-amilazın 85°C'de 3 dk, 2 M NaCl etkisinde denatüre edildiğinde aktivitenin buz üzerinde geri kazanıldığını ifade etmişlerdir.

Gangadharan ve ark. (2010), *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842'ye ait α-amilaz genini amplifiye edip klonlamışlardır ve bu genin *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ekpresyonunu incelemişlerdir. Elde ettikleri rekombinant enzimi iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisini kullanarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin ham nişasta parçalayabilme özelliğini patates, manyok, mısır, buğday ve pirinç gibi çeşitli ham nişastaların hidrolizi ve adsorbsiyon oranı çalışmalarıyla karakterize etmişlerdir. Nişastanın parçalanmasını ve hidroliz oranını elektron mikroskobisi çalışmalarıyla doğrulamışlardır. Enzimin Km ve Vmax değerlerini Lineweaver Burk grafiğiyle belirlemişlerdir. Km değeri 2.76 mg/mL şeklinde düşük bir değer verirken Ki değerini 350 mM şeklinde yüksek bir değer olarak elde etmişlerdir. PCR sonrası elde edilen 1.5 kb DNA parçasının dizi analizi sonuçlarının *Bacillus amyloliquefaciens* strain IH α-amilaz genine %100 benzediğini tespit etmişlerdir.

Reyes-Sosa ve ark. (2010), bir siyanobakteri olan *Nostoc* sp. PCC 7119'a ait sitoplazmik α-amilaz (Amy1) proteinini kodlayan genin (*amy1*) identifikasyonunu, klonlanmasını ve *E. coli* hücrelerinde ekspresyonunu incelemişlerdir. Rekombinant proteinin 56.7 kDa ağırlığında bir monomer olduğunu belirtmişler ve elektroforetik homojenitesine göre affinite kromatografisiyle saflaştırmışlardır. Maksimum aktiviteyi 31°C'de, pH 6.5 ve 7.5 arasında gösteren Ca^{2+} bağımlı α-amilazın substrat özgünlüğünü ve son ürün analizlerini teyit etmişlerdir. Enzimin, literatürdeki diğer α-amilazlar ile karşılaştırıldığında, çözünebilir nişastaya karşı oldukça yüksek bir turnover katsayısı gösterdiğini (3,420±270 s^{-1}) belirtmişlerdir.

Ghollasi ve ark. (2010), İran-Ramsar sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Bacillus megaterium* WHO (BMW) α-amilazını; klonlama, dizi analizi, ekspresyon ve protein mühendisliği tekniklerini kullanarak endüstriyel kullanımı için gerekli olan yüksek termostabilite ve Ca-bağımsız özelliklerini belirleme yollarını araştırmışlardır. Bunun için enzim fonksiyonunu yönlendirmeli mutagenez ile değiştirmeye, böylece

termal ve potansiyel olarak var olan Ca-bağlama sahasının yakınındaki kalıntıların rolünü değerlendirmeye çalışmışlardır. *E. coli* XL1 blue ve *E. coli* BL21'i klonlama ve ekspresyon çalışmalarında konak olarak ve plazmid pET-21a'yı vektör olarak kullanmışlardır.

Lu ve ark. (2010), soğuğa adapte *Pseudoalteromonas arctica* GS230 α-amilaz (*Par*Amy) geninin klonlanması, dizi analizi ve N-terminus His-tag füzyon protein olarak *E. coli*'de ekspresyonunu araştırmışlardır. Ürettikleri rekombinant proteini, DEAE-sefaroz iyon değişim kromatografisi ve Ni-affinite kromatografisi ile saflaştırmışlardır. *Par*Amy'nin moleküler ağırlığını SDS–PAGE elektroforezinde yaklaşık 55 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklık aktivitesini 30°C, maksimum aktivitesini 0°C ve aktivitenin keskin azalışını 40°C olarak belirtmişlerdir. *Par*Amy'nin pH 7.0–8.5 aralığında, 30°C'de 1 saat stabil olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin Km ve Vmax değerlerini 7.28 mg/mL ve 13.07 mg/mL olarak sırasıyla elde etmişlerdir. Bu sonuçlara göre *Par*Amy'nin soğuk-stabil ve alkalitolerant bir enzim olarak deterjan endüstrisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Hostinova ve ark. (2010), *Saccharomycopsis fibuligera* KZ'nin genomik kütüphanesinden putatif ekstrasellüler α-amilaz kodlayan fragmentini maya ekspresyon vektörü olan pVT100L'ye klonlamışlar ve dizi analizini yapmışlardır. Nükleotid dizi analizi, ORF'nin 1485 bç kodlayan 494 aminoasit artıkları ile *S. fibuligera* HUT 7212 α-amilazına (Sfamy) %99 benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. *S. fibuligera* KZ α-amilazı (Sfamy KZ) rekombinant protein olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de eksprese etmişler ve elektroporetik homojenitesine göre saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını 53 kDa, optimum pH ve sıcaklığını 5.0-6.0 ve 40-50°C olarak sırasıyla tespit etmişlerdir.

Liu ve ark. (2010), *Bacillus subtilis* BF768'e ait amyE genini pWB980 vektörüne klonlamışlar ve *B. subtilis* WB600'de ekspresyonunu sağlayarak yüksek aktivitede (723 U/mL) üretilen AmyE salgılanmasını gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant enzimin saflaştırılmasını üç basit adımda gerçekleştirmişler ve saflaştırma katsayısını 1.7 ve verimi ise %74 olarak elde etmişlerdir. Rekombinant AmyE'nin SDS–PAGE elektroforez analizinde, enzimi 48 kDa'lık tek protein bant olarak tespit ederken, Western Blot analizleriyle de antibody kullanarak bu enzimin α-amilaz

olduğunu doğrulamışlardır. Saflaştırdıkları rekombinant AmyE'nin karakterizasyon çalışmalarında enzimin spesifik aktivitesini 36 U/mg, pH 6.0 ve 60°C olarak tespit etmişlerdir.

Yang va ark. (2010), *Thermobifida fusca* NTU22'den termostabil ham nişasta parçalayan α-amilaz kodlayan geni PCR ile amplifiye etmişler, dizi analizi yapmışlar ve pGAPZaA vektörünü kullanarak *Pichia pastoris* X-33 suşuna klonlayarak proteinin ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Rekombinant ekspresyon sonuçlarında 510 U/L ekstrasellüler amilaz ürettiklerini belirtmişlerdir. Saflaştırdıkları amilazı SDS-PAGE elektroforezine tabi tutmuşlar ve 65 kDa'lık tek bir bant elde etmişlerdir. Saflaştırdıkları enzimin optimum pH ve sıcaklığını 7.0 ve 60°C olarak sırasıyla belirtmişlerdir.

Karakaş ve ark. (2010), *Bacillus subtilis* PY22'den α-amilaz kodlayan geni PCR ile amplifiye etmişler, dizi analizini yapmışlar ve pPICZαA vektörü aracılığıyla *Pichia pastoris* KM71H'ye klonlayarak metanol indüksiyonu ile proteinin ekspresyonunu sağlamışlardır. Rekombinant ekspresyon sonucunda ekstrasellüler amilaz üretimini 22 mg/L değeriyle kültür süpernatantından elde etmişlerdir. Enzimi küçük ölçekli üretmek ve rekombinant enzimi saflaştırmak için en çok amilaz üreten klonları seçmişlerdir. Kısmi saflaştırdıkları enzimin pH 7.0 ve 60°C'de 1 saat boyunca aktivitesini %78 oranında koruduğunu tespit etmişlerdir.

Ben Messaoud ve ark. (2010), *Bacillus subtilis* US116 suşuna ait α-amilaz geninin klonlanması, dizi analizi ve bu gen ile homolog olan *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 (BACAAM)'ye ait α-amilazın karşılaştırmasını yapmışlardır. Bu iki amilaz arasındaki farkları anlamak ve aminoasit sekansının enzimatik davranışlar üzerindeki etkisini ortaya çıkarmak amacıyla PCR ile yere özgü mutagenez tekniği uygulamışlar ve elde ettikleri üç mutantı; AMYUS116 (N205H, N217I ve N205H/N217I) incelemişlerdir. Bu üç mutant ile doğal tip enzimin fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini karşılaştırdıklarında amilazların nişastadan maltoheksoz ürettiklerini ve optimum pH ve sıcaklık gibi aynı kinetik parametreleri gösterdikleri ancak termal stabilitelerinin farklı olduğu sonucuna varmışlardır.

Lin-lin ve ark. (2009), *Bacillus cereus*'a ait iki α-amilazın (B905 ve B904) enzimatik özelliklerini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda, enzimlerin aktivitelerini 90-100°C'ye kadar koruduğunu ayrıca enzimlerin termal stabilitelerinin ve

enzimatik aktivitelerinin Ca^{2+} iyonlarına bağlı olmadığını belirtmişlerdir. Protein molekül ağırlıklarının farklı olduğunu ifade ettikleri amy905 ve amy904 genlerini PCR tekniğini kullanarak klonlamışlar ve *E. coli*'de ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra dizi analizi yaptıkları amy904 ve amy905 genlerini 1362 bç ve 1761 bç uzunluğunda ve protein molekül ağırlıklarını da 55 kDa ve 68 kDa olarak sırasıyla tespit etmişlerdir.

Ben Mabrouk ve ark. (2008), *Bacillus* sp. US149 (*ma*US149) suşuna ait olan ve α-amilaz ailesinin bir üyesi olan maltogenik amilazın klonlanması, dizi analizi ve enzimin rekombinant aktivitesinin karakterizasyonunu araştırmışlardır. Nükleotid dizi analizinde 582 protein artıklarını kodlayan 1749 bç'lik ORF saptamışlardır. Rekombinant enzimin (MAUS149) hücre içi olduğunu ve %23 verimle ham hücre ekstraktından saflaştırdıklarını belirtmişlerdir. SDS-PAGE analizlerinde rekombinant enzimin 135 kDa molekül ağırlığında olduğu ve her biri özdeş 67.5 kDa'lık iki alt üniteden oluştuğunu tespit etmişlerdir. Maksimum enzim aktivitesini pH 6.5 ve 40°C'de elde etmişlerdir.

Haki ve ark. (2008), Etiyopya hipertermal kaplıcalarından izole ettikleri *Bacillus* sp. GRE1'den ham nişastayı parçalayabilen Ca^{2+} bağımsız termostabil α-amilaz üretmişler, geni klonlamışlar, dizi analizini yapmışlar ve *Escherichia coli* JM109 hücrelerine transformasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimi jel filtrasyon kromatografisi ile kısmen saflaştırmışlar, saflaştırma katsayısını 33.6 ve verimi %46.5 olarak ifade etmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE analizinde 55 kDa olarak belirtmişlerdir. Enzimin pH 5.0-9.0 ve 80°C'de 45 dk inkübasyon süresinde orijinal aktivitesini %50 koruduğunu tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesinin Cu^{2+}, Zn^{2+} and Fe^{2+} tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiğini belirtmişlerdir. Enzimi kodlayan genin *Bacillus* sp α-amilaz dizilerine atipik homoloji gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Tao ve ark. (2008), bir deniz bakterisi olan *Pseudoalteromonas* sp. MY-1'den α-amilazın moleküler klonlamasını, *E. coli* hücrelerinde ekspresyonunu ve saflaştırılan rekombinant enzimin karakterizasyonunu incelemişlerdir. Belirttiklerine göre pek çok amilaz klonlanmış ve saflaştırılmış olmasına rağmen şimdiye kadar *Pseudoalteromonas* türlerinden Antartika'dan izole edilen *P. haloplanktis* hariç saflaştırma yapılmamıştır. Saflaştırdıkları enzimi, SDS-PAGE analizlerinde tek bir bant halinde ve 73 kDa olarak

tespit etmişlerdir. Karakterizasyon çalışmalarında maksimum aktiviteyi pH 7.0 ve 40°C'de elde etmişlerdir.

Wu ve ark. (2007), ipliksi beyaz küf mantarı *Phanerochaete chrysosporium*' un genomik sekansını ve cDNA kütüphanesini tarayarak α-amilaz kodlayan cDNA dizisini klonlamışlar ve geni *pcamy*1 olarak tasarlamışlardır. Hizalama sonuçlarının bilinen organizmaların α-amilazları ve bazı ipliksi mantarlardan elde edilen ile %43 aminoasit homolojisi gösterdiğini belirtmişlerdir. *pcamy*1 cDNA'yı, *E. coli* BL21(DE3)'de exprese etmişler ve SDS-PAGE analizinde ürünün moleküler ağırlığını 60 kDa olarak belirtmişlerdir. *pcamy*1'in transkripsiyonunu araştırmışlar ve regülasyonun sadece karbon kaynağı gibi besinlerle olmadığı aynı zamanda oksijen gibi çevresel şartlara da bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. *P. chrysosporium*'un α-amilazının klonlanması ve ekspresyonu açısından alanında yapılmış ilk çalışma olduğunu ifade etmişlerdir.

Yang ve Liu (2007), *Thermobifida fusca* NTU22'den maltotrioz üreten α-amilaz kodlayan geni klonlamışlar, dizi analizini yapmışlar ve *E. coli*'de ekspresyonunu incelemişlerdir. Genin 605 aminoasitlik proteini kodlayan 1815 bç'den oluştuğunu belirtmişlerdir. Belirttiklerine göre *tfa* α-amilazının aminoasit dizisi *Thermomonospora curvata* ve *Streptomyces* amilazları ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir. Saflaştırdıkları amilazı, SDS-PAGE elektroforezinde 65 kDa ağırlığında tek bir bant olarak elde etmişler ve enzimin optimum pH ve sıcaklığını 7.0 ve 60°C olarak sırasıyla tespit etmişlerdir.

Wang ve ark. (2007), *Pyrococcus furiosus*'tan ekstrasellüler α-amilaz kodlayan geni (PFA), bu bakterinin genomik DNA'sından PCR yoluyla amplifiye etmişler ve *E. coli* BL21 hücrelerinde yüksek düzeyde ekspresyonunu araştırmışlardır. Rekombinant α-amilazın temelde ''insoluble inclusion bodies'' olarak adlandırılan formlarda ifade edilmesini sağlamışlar ve geliştirilmiş saf katyon metodunu kullanmışlardır. Belirtilen body'leri çözünürleşmesi için Britton–Robinson tamponunda, pH 10.5'te, 90°C'de 3 dk boyunca işlenmesi suretiyle elde etmişlerdir. Çalışmada daha sonra PFA çözdürülüp, seyreltilmiş, Fenil Sefaroz kromatografisiyle saflaştırılmış ve yeni saflaştırma yöntemiyle 58 000 U/g değerinde verim elde edilmiştir.

Horvathova ve ark. (2006), termostabil α-amilazı kodlayan geni hipertermofilik arke *Thermococcus hydrothermalis*'ten *E. coli*'ye klonlamışlardır. İyi bir ekspresyon

sağlamak için dört primer (3 reverse, 1 forward) dizayn etmişlerdir. İlave olarak yaptıkları reklonlamanın amacını pET vektörüne takılan rekombinant α-amilazın sonundaki C-terminalde nasıl bir değişim olduğunu ve varyantların spesifik aktivite sonuçlarının 6-his kuyruğunu etkileyebileceğini doğrulamak olarak açıklamışlardır. Rekombinant α-amilazın biyokimyasal özelliklerini; moleküler ağırlık, optimum sıcaklık ve optimum pH, orijinal α-amilazınki gibi; 53.6 kDa, 85^{o}C ve 5.5 olarak sırasıyla doğrulamışlardır. Spesifik aktiviteye ilişkin eklenen iki artıktan 6-his olan gerçekte etkilenmemiş iken orjinal α-amilazın C-terminusu ile 6-his kuyruğu arasında bulunan uzun peptid eklentisinin, orjinal proteinin spesifik aktivitesi ile kıyaslandığında önemli derecede azalmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir.

Sarıkaya Demirkan ve ark. (2005), *Bacillus amyloliquefaciens*'in doğal ve mutant tiplerinden α-amilazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve ham nişastayı degredasyon kabiliyetlerini karşılaştırmışlar ve doğal tipin α-amilazının klonlanması ve *E. coli*'de ekspresyonunu araştırmışlardır. Dizayn ettikleri primer ile α-amilaz kodlayan geni PCR'da çoğaltmışlar, PCR ürününü restriksiyon enzimlerinden PstI, NcoI ile kesip pKK233-2 vektörüne aktarmışlar, *E. coli* JM109'a transformasyonunu yapmışlardır. DNA dizi analizinin ardından enzimi başka bir ekspresyon vektörü olan pET21'e aktarmışlar, plazmidi pETAM olarak adlandırmışlar ve *E. coli* HB101 hücrelerine transfeksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Doğal ve mutant tip enzimlerin optimum pH ve sıcaklıklarını aynı değerde sırasıyla 6.0 ve 55°C ve SDS-PAGE analizinde molekül ağırlığını 52 kDa olarak elde etmişlerdir.

Grzybowska ve ark. (2004), *Pyrococcus woesei* (DSM 3773)'e ait α-amilaz genini pET21d(+) ve pYTB2 plazmidlerine klonlayarak elde ettikleri pET21d(+)α-amyl ve pYTB2α-amyl vektörleri kullanarak termostabil α-amilazın *Escherichia coli* BL21(DE3) veya BL21(DE3)pLysS hücrelerinde ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Belirttiklerine göre rekombinant enzim maksimum aktiviteyi, pH 5.6 ve 95°C'de göstermiştir. Enzimin yarılanma ömrünü 0.05 M asetat tamponunda(pH 5.6) 90°C ve 110°C'de 11 saat ve 3.5 saat olarak sırasıyla elde etmişler ve 120°C'de 2 saat inkübasyonla enzimin aktivitesinin %24'ünü koruduğunu tespit etmişlerdir. SDS-PAGE analizi ile proteinlerin amilolitik aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Rekombinant α-amilazın nişasta üzerindeki etkisinden sonra oluşan son ürünlerin ince tabaka kromatografisi ile analizlerini yapmışlardır.

Kyong Kang ve ark. (2004), *Lipomyces starkeyi* α-amilazını (LSA) kodlayan geni klonlamışlar ve karakterizasyonunu yapmışlardır. cDNA nükleotit dizi fragmentinin Open Reading Frame (ORF) bölgesinin 1944 bç'den oluştuğunu ve 619 aminoasit kodladığını, SDS-PAGE analizlerinde LSA proteininin yaklaşık 73 kDa olarak tahmin edilen molekül ağırlığının 68 709 kDa olarak hesaplandığını, dolayısıyla bunun 4 kDa His-tag içerdiğini belirtmişlerdir. Enzimin Western blot analizlerini yapmışlar ve anti-amilaz-Ab antikoru kullanmışlardır. Klonladıkları LSA amilazının maksimum aktiviteyi pH 6.0'da ve optimum sıcaklığı 40°C'de gösterdiğini, Cu^{2+} nun enzim aktivitesini inhibe ettiğini, Ca^{2+} ve Mg^{2+} nin enzimin yapısını ve stabilitesini koruduğundan dolayı enzim aktivitesini stimule ettiğini ayrıca 1 mM EGTA'nın aktiviteyi etkilemediğini ancak 1 mM EDTA'nın inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Matsubara ve ark. (2004), *Aspergillus awamori*'den α-amilazlar (Amyl I, Amyl III) ve glukoamilaz (GA I) kodlayan cDNA'ları klonlamışlar ve nükleotit dizilerini belirlemişlerdir. Amyl III dizisinin ham nişasta parçalayan α-amilazının 634 aminoasit kodlayan 1902 bç uzunluğunda ORF'den oluştuğunu ve sinyal peptid sayısının 21 aminoasit olduğunu; Amyl I dizisinin nişasta hidrolizleyemediğini, 499 aminoasit kodlayan 1500 bç uzunluğunda ORF'den oluştuğunu ve sinyal peptid sayısının 21 aminoasit olduğunu; GA I dizisinin 639 aminoasit kodlayan 1920 bç uzunluğunda ORF'den oluştuğunu ve sinyal peptid sayısının 24 aminoasit olduğunu tespit etmişlerdir.

Eksteen ve ark. (2003), *Lipomyces kononenkoae*'nin oldukça yüksek miktarda efektif amilazlar (α-amilaz, glukoamilaz, izoamilaz ve siklomaltodekrin glukanotransferaz aktivitesi) salgıladığını ve ham nişasta parçalayabildiği, bilinen en etkili maya olduğunu belirtmişler ve önceki çalışmalarında LKA1 olarak adlandırdıkları α-amilaz geninin klonlanması, karakterizasyonunu ve *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe*'de ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. İkinci çalışmalarında LKA2 olarak adlandırdıkları ikinci bir α-amilaz geninin klonlanması ve karakterizasyonunu yapmışlar, genin dizi analizlerinde 499 aminoasit kodlayan proteininin (Lka2p) tahmini molekül ağırlığının 55 307 Da olduğunu belirtmişlerdir. Lka2p'nin optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 3.5 ve 60°C olarak elde etmişlerdir. Son derece etkili α-amilaz kodlayan bu her iki genin klonlama karakterizasyon ve

ekspresyonunun *S. cerevisiae*'nin amilolitik suşlarının geliştirilmesi ve nişastanın etkili biyodönüşümüne yönelik çalışmaların geliştirilebileceğini belirtmişlerdir.

Lim ve ark. (2003), hipertermofilik bir bakteri olan *Thermotoga maritima* MSB8'den hücre içi α-amilaz AmyB (TM1650) kodlayan geni klonlamışlar ve *E. coli*'de ekspresyonunu araştırmışlardır. Belirttiklerine göre *amy*B geni 1269 bç uzunluğunda olup 422 aa'ten oluşan bir protein kodlamaktadır. Nişasta nondenatüre PAGE'den sonra SDS-PAGE analizinde enzimin molekül ağırlığını 50 kDa olarak tespit etmişlerdir. AmyB'nin aminoasit dizisinin diğer amilazlarla %12'den az benzerlik gösterdiğini ancak α-amilazlar arasında yüksek derecede korunmuş dört bölge içerdiğini belirtmişlerdir. AmyB α-amilazının maksimum enzim aktivitesini pH 7.0 ve optimum sıcaklığını 70^{o}C olarak elde etmişlerdir. Pek çok diğer organizmaların α-amilazı gibi termostabil *T. maritima* MSB8 α-amilazı olan AmyB'yi *E. coli*'de eksprese etmişler ve 10 mM Ca^{2+} iyonlarının etkisinde enzimin stabilitesinin arttığını rapor etmişlerdir.

Jeang ve ark. (2002), *Cytophaga* sp'den ham nişasta parçalayan α-amilaz (RSDA) genini klonlamışlar ve genin dizi analizini yapmışlardır. Tahmin edilen protein ürününün 519 aminoasit içerdiğini ve üç *Bacillus* türünün α-amilazına yüksek derecede benzerlik gösterdiğini ancak yalnızca bir *Bacillus* türünün α-amilazının nişasta parçalama yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. RSDA'yı *E. coli*'de ekprese etmişler ve *Cytophaga* sp'lerden saflaştırılan enzimler ile benzerlik gösterdiğini tespit etmişledir. SWISS-PROT verileri gen ürünü ile karşılaştırıldığında, RSDA'nın *Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus stearothermophilus* α-amilazları ile sırasıyla %75, 74 ve 67 olarak tespit etmişlerdir. *E. coli*'den elde ettikleri rekombinant enzimin biyokimyasal özelliklerini araştırmışlar ve optimum sıcaklığını 50^{o}C olarak raporlamışlardır.

Özcan ve Altınalan (2001), *Bacillus subtilis* RSKK246 suşunun yaklaşık 65 kDa büyüklüğünde α-amilaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Bu geni izole ederek pUC18 plasmidine klonlamışlar ve *E. coli*'ye transfer etmişlerdir. Yaklaşık 1.7 kbç büyüklüğünde tüm α-amilaz genini içeren DNA fragmentini keserek pUB110 plasmidine yerleştirmişler ve daha sonra çeşitli *B. subtilis* suşlarından RSKK246, RSKK243, RSKK244, YB886 ve ORBAM'a elektroporasyon ile aktarmışlardır. α-Amilaz genini çeşitli plasmidlere klonlamışlar ve kendi promotoru ile eksprese

etmişlerdir. Bu durumun α-amilaz geninin promotor sekansının *E. coli* ve *Bacillus* türlerinde fonksiyonel olduğunu belirtmişlerdir. Klonladıkları enzimin spesifik aktivitesinin doğal enzimin spesifik aktivitesinden daha fazla olduğunu, moleküler ağırlığının tüm türlerde aynı kaldığını ve bu gen ürününün proteolitik enzimlere karşı dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

Kang ve ark. (2001), alkalifilik *Pseudomonas* sp. KFCC10818'den yeni bir α-amilaz kodlayan geni klonlamışlar, genin dizi analizini yapmışlar ve *E. coli*'de ekspresyonunu araştırmışlardır. Genin 1356 bç'den oluştuğunu ve 452 aminoasitten oluşan bir protein kodladığını belirtmişlerdir. Rekombinant α-amilazı saflaştırmışlar ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonunu yapmışlardır. SDS-PAGE analizlerinde enzimin molekül ağırlığını 50 kDa olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin pH 8.0 ve 40^{o}C'de optimum aktiviteyi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Leveque ve ark. (2000), termofilik arkea *Thermococcus hydrothermalis*'ten α-amilaz kodlayan geni klonlamışlar ve *E. coli*'de ekpresyonunu incelemişlerdir. Genin 1374 bç uzunluğunda olduğunu ve 457 aminoasitten oluşan bir protein kodladığını ve molekül ağırlığının 49 236 Da olduğunu belirtmişlerdir. *T. hydrothermalis* rekombinant α-amilazının optimum aktivitesinin 75-85^{o}C ve pH'sının 5.0-5.5 olduğunu tespit etmişlerdir.

Frillingos ve ark. (2000), hipertermofilik arke *Pyrococcus woesei*'ye ait ekstrasellüler α-amilaz genini klonlamışlar ve dizi analizini yapmışlardır. 1.4 kb protein kodlayan dizinin *P. furiosus* türünün α-amilaz geni ile yakın ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Halofilik bakteri için shuttle klonlama vektörü kullanarak *P. woesei* α-amilazını ılımlı halofil *Halomonas elongata* promotorunun kontrolü altında eksprese etmişlerdir. Rekombinant proteinin sıcaklığını 90-100^{o}C, pH'sını 5.5-6.0 ve molekül ağırlığını 53 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Ben Ali ve ark. (1999), Tunus'taki sıcak su kaynaklarının bulunduğu topraktan *Bacillus* sp US100 suşunu izole etmişlerdir. Standart şartlar altında bakterinin α-amilaz, pullulanaz ve amiloglikozidaz aktivitelerini incelemişlerdir. Bu suşun 82^{o}C optimum sıcaklığa sahip termoaktif α-amilazı içinde sakladığını ve %20 (w/v) substrat varlığında 110^{o}C'de 40 dk yarılanma ömrü ve olağanüstü bir termostabilitesinin olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin nişastayı hidrolizi sonucu maltoheksoz ve maltopentoz son

ürünlerin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Çalışmada 3 kb'lık DNA parçasını *E. coli* DH5α hücrelerine aktarıp ekspresyonunu incelemişlerdir. Son ürün analizlerini HPLC ile analiz etmişler ve *Bacillus stearothermophilus*'a %98 benzediğini belirtmişlerdir.

Sumitani ve ark. (1998), *Bacillus* hayvansal tip α-amilaz (BAA) genini klonlamış ve dizi analizi yapmışlardır. Analizler sonucunda BAA'nın N-terminal katalitik bölgesinin üretilen aminoasit dizisinin hayvansal tipe ve diğer bakteriyel amilazlardan ziyade *Streptomyces* α-amilazlarına homolog olduğunu tespit etmişlerdir. C-terminal bölgesinde bazı bakteriyel amilazlarda korunmuş olan 90 aminoasit artıklarının her birinin iki bloğunun tekrar eden dizilerde devam ettiğini bulmuşlardır. Araştırmacıların belirttiklerine göre α-amilazın inhibisyon mekanizması hakkında elde edilen bilgi aynı zamanda bu enzimin hidroliz mekanizmasının da anlaşılmasına yardım edecektir. α-Amilaz inhibitörlerinin substrat analogları ve proteinli inhibitörler olarak 2 sınıfta gruplandırılabileceğini belirtmişlerdir. Bu bilgilerden hareketle birkaç proteinli amilaz inhibitörü izole edip dizayn etmişlerdir. Bunun için *Bacillus* sp 195 kültür üst sıvısından α-amilaz inhibe eden proteinli inhibitör izolasyonu ve karakterizasyonu yapmışlardır. Bu kaynaktan elde edilen amilazın yapısının bakteriyel tipten ziyade hayvansal tip amilaza benzediğini ve proteinli inhibitörlere hassas olduğunu belirtmişlerdir.

Yin ve ark. (1997), zayıf amilolitik aktiviteye sahip *Streptomyces lividans* TK24'ün Southern Blot analizlerinde yüksek sıklıkta ortaya çıkan ve *Streptomyces limousus*'un çok iyi eksprese olan α-amilaz geni (amlSL) ile bağlantılı çok güçlü bir gen içerdiğini tespit etmişlerdir. Bu bağlantılı geni klonlamak için *S. lividans* TK24'ün 3 adet genomik kütüphanesini çok kopyalı plazmid vektörü pIJ699'a aktarmışlardır. İki farklı gen izole etmişlerdir; amlA ve amlB. Subklonlama çalışmalarının amlB'de 3 kb'lık BamHI-NotI fragmanında lokalize olduğunu belirtmişlerdir. amlB'nin, *S. limousus*'un α-amilazı ile %74.7 oranında aminoasit benzerliği gösterdiğini ve sadece %27.2 oranında amlA tarafından kodlanmış amilolitik enzim benzerliği gösterdiğini belirtmişlerdir. İlgili genin, klonlama ve dizileme çalışmalarını, transkripsiyonel analizlerini, protein ve promotor dizisi karşılaştırmalarını yapmışlardır.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, klonlama ve ekspresyon olmak üzere 2 aşamadan oluşmaktadır. Klonlama aşaması İsveç Lund Üniversitesi Moleküler Hücre Biyolojisi C.V.Wachenfeldt laboratuarında, ekspresyon aşaması ise Kars Kafkas Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi laboratuarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Biyolojik Materyal

Çalışmaların ilk aşamasında kullanılan biyolojik materyaller, ticari olarak (Microbiologist inc.) temin edilmiş olup adları aşağıda belirtildiği gibidir:

1. *Bacillus licheniformis* ATCC 12759
2. *Bacillus licheniformis* ATCC 14580
3. *Bacillus circulans* ATCC 4516
4. *Bacillus circulans* ATCC 61
5. *Bacillus subtilis* ATCC 6051

3.2. Kültür Ortamları

3.2.1. TBAB (Tryptose Blood Agar Base)

33 g TBAB, 1 litre distile su içerisinde çözündükten sonra otoklavlandı.

TBAB besiyerinin içeriği;

Tryptose	10 g
Beef extract	3.0 g
Sodyum klorid	5.0 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

3.2.2.LB (Luria Bertani)

25 g LB, 1 litre distile su içerisinde çözündükten sonra otoklavlandı.

LB besiyerinin içeriği;

Tryptone	10 g
Yeast extract	5.0 g
Sodyum klorid	10 g
Distile su	1000 mL

3.2.3. LA (Luria Bertani Agar)

Tryptone	10 g
Yeast extract	5.0 g
Sodyum klorid	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

LA besiyerinin karıştırıcıda çözünmesi sağlandıktan sonra -otoklavlandı.

3.2.4. LB Ampisilin

Tryptone	10 g
Yeast extract	5.0 g
Sodyum klorid	10 g
Distile su	1000 mL
Ampisilin (100 μg/mL)	1000 μL

LB besiyeri hazırlanıp otoklavlandıktan sonra ampisilin katıldı.

3.2.5. LB Kanamisin

Tryptone	10 g
Yeast extract	5.0 g

Sodyum klorid	10 g
Distile su	1000 mL
Kanamisin (50 µg/mL)	1000 µL

LB besiyeri hazırlanıp otoklavlandıktan sonra kanamisin eklendi.

3.2.6. LA Ampisilin

Tryptone	10 g
Yeast extract	5.0 g
Sodyum klorid	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL
Ampisilin (100 µg/mL)	1000 µL

LA besiyeri hazırlanıp otoklavlandı. Yaklaşık 50°C'ye soğuyunca gereken miktarda ampisilin ilave edildi, karıştırılıp petrilere döküldü.

3.2.7. LA Kanamisin

Tryptone	10 g
Yeast extract	5.0 g
Sodyum klorid	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL
Kanamisin (50 µg/mL)	1000 µL

LA besiyeri hazırlanıp otoklavlandı. Yaklaşık 50°C'ye soğuyunca gereken miktarda kanamisin ilave edildi, karıştırılıp petrilere döküldü.

3.2.8. TBAB Nişasta

Tryptose	10 g
Beef extract	3.0 g

Sodyum klorid	5.0 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL
Nişasta	%1

3.2.9. LA Nişasta

Tryptone	10 g
Yeast extract	5.0 g
Sodyum klorid	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL
Nişasta	% 1

3.2.10. SOC (Super Optimal Catabolit Repression) Besiyeri

900 mL distile suya;

20 g Bacto tripton

5.0 g Bacto yeast extract

2 mL 5 M NaCl

2.5 mL 1 M KCl

10 mL 1 M $MgCl_2$

10 mL 1 M $MgSO_4$

20 mL 1 M Glukoz

1 L'ye tamamlanarak otoklavlandı.

3.3. Amilaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Sodyum Fosfat Tamponu

0.1 M pH 7.0 Sodyum Fosfat tamponu hazırlamak için 24.5 mL 0.1 M Na_2HPO_4 ve 25.5 mL 0.1 M NaH_2PO_4 hazırlanarak distile su ile hacim 100 mL'ye tamamlanıp otoklavlandı. Sodyum fosfat tamponu substrat çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

3.3.2. Substrat Çözeltisi

%0.5 oranındaki çözünebilir nişasta 0.1 M pH 7.0 Sodyum Fosfat tamponu içerisinde çözünmesi sağlanarak hazırlandı. Substrat çözeltisi her amilaz aktivite tayininde taze olarak hazırlandı.

3.3.3. DNS'nin Hazırlanması

Cam bir şişede 20 g 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS), 400 mL distile su içerisinde çözünmesi sağlanarak hazırlandı. Başka bir cam şişede 32 g NaOH tartılıp 300 mL distile su içerisinde çözünmesi sağlandı. DNS karıştırıcı üzerinde karışmaya devam ederken üzerine yavaş yavaş NaOH çözeltisi ilave edildi. Karışım bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Üzerine 600 g Na-K tartarat azar azar eklendi. Son olarak çözeltinin hacmi saf su ile 2000 mL'ye tamamlandı. DNS, α-amilaz aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak kullanıldı.

3.4. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. Alkalin Çözeltisi

A: 1000 mL 0.1 M NaOH

Na_2CO_3 20 g

Na-K tartarat 0.2 g

B: 1000 mL distile su

$Cu_2SO_4(H_2O)_5$ 0.5 g

C: 20 mL A çözeltisi + 0.4 mL B çözeltisi karıştırılarak her defasında taze olarak hazırlandı.

D: Folin Ciocalteau Reaktifi (FCR), 1/2 oranında distile su ile seyreltildikten sonra kullanıldı.

E: Protein standart solüsyonu olarak 1 mg/mL oranında distile su ile hazırlanan Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı.

3.5. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.5.1. TE Tamponu (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

1 mM EDTA (pH 8.0)

olacak şekilde istenen hacim için gerekli miktar hesaplanarak daha önce stok olarak hazırlanıp otoklavlanmış çözeltilerden hazırlandı.

3.5.2. SE Tamponu

0.2 M NaCl

1 mM EDTA pH 8.2 olacak şekilde hazırlanıp otoklavlandı.

3.5.3. %10 SDS

SDS 10 g

Distile su 90 mL

Oranında çözünmesi sağlanarak hazırlandı. SDS çeker ocak altında hazırlandı.

3.5.4. Lizozim

4 mg/mL olacak şekilde steril distile su ile hazırlandı. +4°C'de saklandı.

3.5.5. RNaz

10 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 100°C'de 15 dk tutularak DNaz aktivitesi inhibe edildi. -20°C'de saklandı.

3.5.6. $NaClO_4$

1.75 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. $NaClO_4$ çeker ocak altında hazırlandı.

3.5.7. Kloroform-İzoamilalkol

Kloroform ve izoamilalkol 24:1 oranında çeker ocak altında hazırlandı, +4°C'de saklandı.

3.5.8. Çözücü Solüsyon (Resuspend Solution)

0.2 M NaCl

1 mM EDTA (pH 8.0)

Daha önce hazırlanmış stok çözeltilerden alınarak belirtilen oranlarda hazırlandı.

3.6. Agaroz Jel Çözeltileri

3.6.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Agaroz jel %0.8 oranında aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı;

Agaroz	0.8 g
1XTAE tamponu	100 mL
Etidyum Bromid	5 µL

Agaroz ve 1X TAE tamponu belirtilen oranda karıştılarak mikrodalga fırında şeffaflaşana kadar ısıtıldı. 50°C'ye soğuduktan sonra 5 µL EtBr ilave edilip karıştırıldı ve karışım jel kabına döküldü, katılaşması beklendi.

3.6.2. 50X TAE Tamponu

Tris base	242 g
Asetik asit	54.5 g
EDTA	14.6 g
Distile su	1000 mL

3.6.3. 1X TAE Tamponu

50XTAE	100 mL
Distile su	4900 mL

3.7. Protein İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.7.1. TES

100 mM TrisHCL (pH 7.5)

100 mM EDTA

100 mM NaCl ile 50 mL hazırlanmıştır.

3.7.2. Lizozim

10 mg/mL lizozim olacak şekilde hazırlandı.

0.02 g lizozim

50 mM TrisHCl (pH 8.0) ile çözünüp, dH_2O ile 2 mL'ye tamamlandı.

3.7.3. Deterjan Kokteyli

150 µL Tween 20

150 µL TritonX100

Burada kullanılacak deterjanlar non-iyonik olmalıdır.

3.8. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan besiyerlerinden LB ve TBAB Difco'dan, nişasta Analar'dan, besiyerini katılaştırmak için kullanılan agar Bacto'dan, genomik DNA izolasyonunda kullanılan lizozim Fluka'dan, $NaClO_4$ VWR international'dan, DNA izolasyonu ve SDS-PAGE elektroforezi için kullanılan bir deterjan olan SDS Biochemical'dan, tampon hazırlamak için kullanılan EDTA, alkali çözeltisi hazırlamak için kullanılan Na_2CO_3, RNA uzaklaştırmak için kullanılan RNaz, antibiyotik seçiciliği için kullanılan ampisilin ve jeldeki bantları görüntülemek için kullanılan etidyum bromid Sigma'dan; kanamisin Applichem'den, tampon hazırlamak için kullanılan Na_2HPO_4, NaH_2PO_4 ve Tris-HCl Merck'ten, NaOH Acros Organics'ten, DNA çalışmalarında kullanılan dNTP, 10x Pfx buffer, Pfx DNA polimeraz, $MgSO_4$ ve vektör pCR Blunt TOPO Invitrogen'den; restriksiyon enzimleri olarak kullanılan HindIII, SphI, 10x Fast digest green buffer, ligasyon için kullanılan T4 DNA ligaz, 10x T4 DNA ligaz buffer Fermentas'tan, Alkalen fosfataz Thermosientific'ten temin edilmiştir.

3.9. Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj Beckman Coulter J-26 XP, Mikrosantrifüj Eppendorf 5415D ve 5417R, Su banyosu Techne, PCR AB aplied Biosystems 2720 Thermal Cycler, Mikrodalga cihazı Elektro Helios (Browner HC 3354), Santrifuj WIFUG, Bistüri Paragon, Hassas terazi Mettler AE166, Terazi Sartorius, MQ cihazı Synergy, Heat Shock (ısı şoku) cihazı PCH-2 Grant Bio, Çalkalayıcı (Shaker) Kuhner, pH Metre Mettler MP220, Mikropipetler Eppendorf, Elektroforez Biorad, UV Translimünator Spectroline, Görüntüleme cihazı UVP BioDoc, Nanodrop ND-100, Spektrofotometre Shimadzu UV-1800.

3.10. Kullanılan Kitler

Jel saflaştırma kiti ve plazmid miniprep kit Thermoscientific'ten, klonlama kiti Invitrogen'den, cDNA sentez kiti Fermentas'tan, qwest kolorimetrik Western blotlama kiti Sigma'dan, Ni-NTA agarose saflaştırma kiti Qiagen'den temin edildi.

3.11. Kullanılan Moleküler Belirteçler

Marker olarak kullandığımız DNA belirteci Fermentas'tan, SDS-PAGE ve Western blotlamada kullandığımız moleküler belirteçler Sigma'dan temin edilmiştir.

3.12. Lugol Testi

Bu test, bir polisakkarid olan nişastanın bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstrasellüler amilaz tarafından parçalanıp parçalanmadığını ortaya koymak amacıyla yapıldı. Bunun için petri kutularında %1'lik nişastalı agar hazırlandı ve bir günlük katı besiyerlerinde üretilen bakteri kolonisinden alınan bakteri kültüründen ayrı ayrı ekim yapıldı. Her bakteri optimum sıcaklıkta 1 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda agarların üzerine 0.5 g l_2 ve 1g Kl (150 mL) ile hazırlanan çözelti dökülerek reaksiyon 5 dk içinde değerlendirildi. Pozitif reaksiyonlarda koloni etrafında renksiz bir halka oluşur. Negatif durumlarda ise besiyeri mavi-mor renkte görülür.

3.13. Amilaz Aktivite Tayini

600 nm'de OD 0.6 olarak ölçülen bakteriler çalkalayıcıda 37^oC'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 1.5 ml'lik steril ependorflara aktarılarak

10 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvılar enzim aktivite tayini ve protein miktar tayininde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Bakterilerin amilaz aktivite tayini Bernfeld yöntemine göre yapıldı (Bernfeld 1955).

Yönteme ait protokol şu şekildedir:

1. 150 µL süpernatant tüm tüplere konuldu.

2. 200 µL substrat, (%0.5'lik çözünebilir nişasta) körler hariç tüplere eklendi.

3. 30 dk 37^{o}C'de inkübe edildi.

4. 400 µL DNS süre bitiminde tüm tüplere eklenerek reaksiyon durduruldu.

5. 5 dk kaynar su (3.dk'da körlere 200 µL substrat) banyosu yapıldı.

6. 8 mL saf su tüpler soğuyunca eklendi ve tüpler vortekslendi.

7. 489 nm'de absorbans okundu.

Bir enzim ünitesi deney şartları altında 1 µmol nişastayı 30 dk'da maltoza parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.14. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapıldı (Lowry ve ark. 1951). Yönteme ait protokol şu şekildedir:

1. 500 µL saf su kör tüplerine konuldu.

2. 50 µL süpernatant örnek tüplerine konuldu.

3. 450 µL saf su örnek tüplerine eklendi.

4. 5 mL alkalin çözeltisi bütün tüplere eklendi.

5. 15 dk 40^{o}C'de bekletildi.

6. 500 µL FCR (1:1 seyreltilir)

7. 30 dk karanlıkta bekletildi

8. 660 nm'de absorbans okundu.

Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen Bovin Serum Albumin (BSA)'den bir seri standart çözelti hazırlandı. Örneklerin protein içerikleri BSA eğrisi standart olarak kullanılarak hesaplandı.

3.15. Genomik DNA İzolasyonu

Bacillus subtilis'e ait genomik DNA izolasyonu Marmur (1961)'a göre yapıldı. İşlem basamakları şu şekilde sıralanabilir:

1. 50 mL erlende bir gece boyunca üretilerek inoküle edilen hücreler, erlenden steril falkon tüpüne aktarıldı. 6000 rpm hızda 15 dk boyunca santrifüj edildi.

2. Santrüfüjden sonra üst sıvı döküldü. Dibe çökmüş olan pelete daha önce hazırlanmış olan 2.5 mL çözücü solüsyon (resuspend solüsyonu) 0.2 M NaCl + 1 mM EDTA (pH 8.0) ilave edildi. Mikropipet yardımıyla pelet çözdürülmeye çalışıldı.

3. Çözülen peletin üzerine 0.3 mL Lizozim (4 mg/mL) ilave edildi.

4. Hücreler 30 dk 37^oC'de inkübe edildi.

5. İnkübasyondan sonra 0.2 mL %10 SDS eklendi.

6. 45^oC'de 15 dk inkübe edildi.

7. İnkübasyondan sonra hücreler cam tüpe aktarıldı. Cam tüpe aktarılmasının amacı son aşamada DNA'yı görmenin kolaylaşmasını sağlamaktır.

8. Cam tüpe aktarılan hücrelerin üzerine 0.2 mL $NaClO_4$ (1.75 mg/mL) ilave edildi.

9. Ardından hücrelere 5 mL Kloroform:İzoamilalkol (24:1) eklendi.

10. Cam tüpün etrafına parafilm sarılarak 30 dk boyunca rotasyon cihazında (turning machine) boyuna daireler çizecek şekilde karışması sağlandı. Bu karışma işlemi çeker ocak altında yapıldı.

11. Ardından tüp santrifüje kondu. 30 dk II . düzey hızda yani 3900 rpm'de santrifüj edildi.

12. Santrifüjden sonra iki faz oluştuğu görüldü.

13. Solüsyonun üzerine 2.5 mL -20^{o}C'de bekletilmiş soğuk %96 Etanol tüpün cidarlarında daire çizilecek şekilde nazikçe ve yavaşça ilave edildi. Bu aşama DNA'nın elde edilmesi açısından oldukça önemlidir.

14. Böylece üç faz oluştuğu görüldü. DNA orta fazda ip şeklinde bulunmaktaydı.

15. Alevde ucu modifiye edilen cam pastör pipetinin yardımıyla ip şeklindeki DNA pipetin etrafında toplanmaya çalışıldı.

16. Toplanan DNA'ya 1000 µL TE tamponu eklendi.

17. Üzerine 1 µL RNaz (10 mg/mL) ilave edildi.

18. TE tamponuna konan DNA, bir gece +4^{o}C'de bekletildi.

19. Ertesi gün ekstrakte edilen DNA'nın Nanodrop cihazında saflık ve kontsantrasyon kontrolleri yapıldı.

3.16. Agaroz Jel Elektroforezi

Bacillus subtilis'e ait genomik DNA' nın agaroz jel elektroforezinde de kontrolü yapıldı. Bunun için agaroz jel %0.8 oranında hazırlandı. Gerekli miktarda agaroz tartıldı. Üzerine 100 mL 1XTAE tamponu eklenerek mikrodalga fırında çözününceye kadar ısıtıldı. Şeffaf bir görüntü elde edilince soğumaya bırakıldı. Yaklaşık 50^{o}C'ye kadar soguduktan sonra üzerine 5 µL etidyum bromür ilave edilip karışması sağlandı. Homojen bir görüntü elde edilince çözelti, içerisine daha önce jel tarağı yerleştirilmiş jel kabına dikkatlice döküldü. Ardından soğumaya bırakıldı. Jel katılaşana kadar beklendi. Katılaşan jel elektroforez tankına aktarılarak jelin üzerini örtecek kadar tanka 1XTAE tamponu eklendi. Tarak çıkarılarak oluşan kuyulara örnekler yüklendi. *Bacillus subtilis*'e ait genomik DNA'nın molekül ağırlığını tespit edebilmek için birinci kuyucuğa 5 µL DNA standardı eklendi. İkinci kuyucuğa genomik DNA'dan 1 µL ve 6X izleme boyasından 1 µL alınarak elde edilen karışımdan 2 µL eklendi. Genomik DNA yoğun olduğundan keskin bir bant elde etmek amacıyla 1:10 oranında MQ su ile seyreltilmiş genomik DNA'dan 1 µL ve 6X izleme boyasından 1 µL alınarak elde edilen karışımdan üçüncü kuyucuğa 2 µL eklendi. 90 mA/V değerinde akım verilerek örneklerin elektriksel alanda yürütülmesi sağlandı. Örnekler yeterince ilerledikten sonra akım kesildi ve jel, translümünatörde görüntülenerek örnekler incelendi.

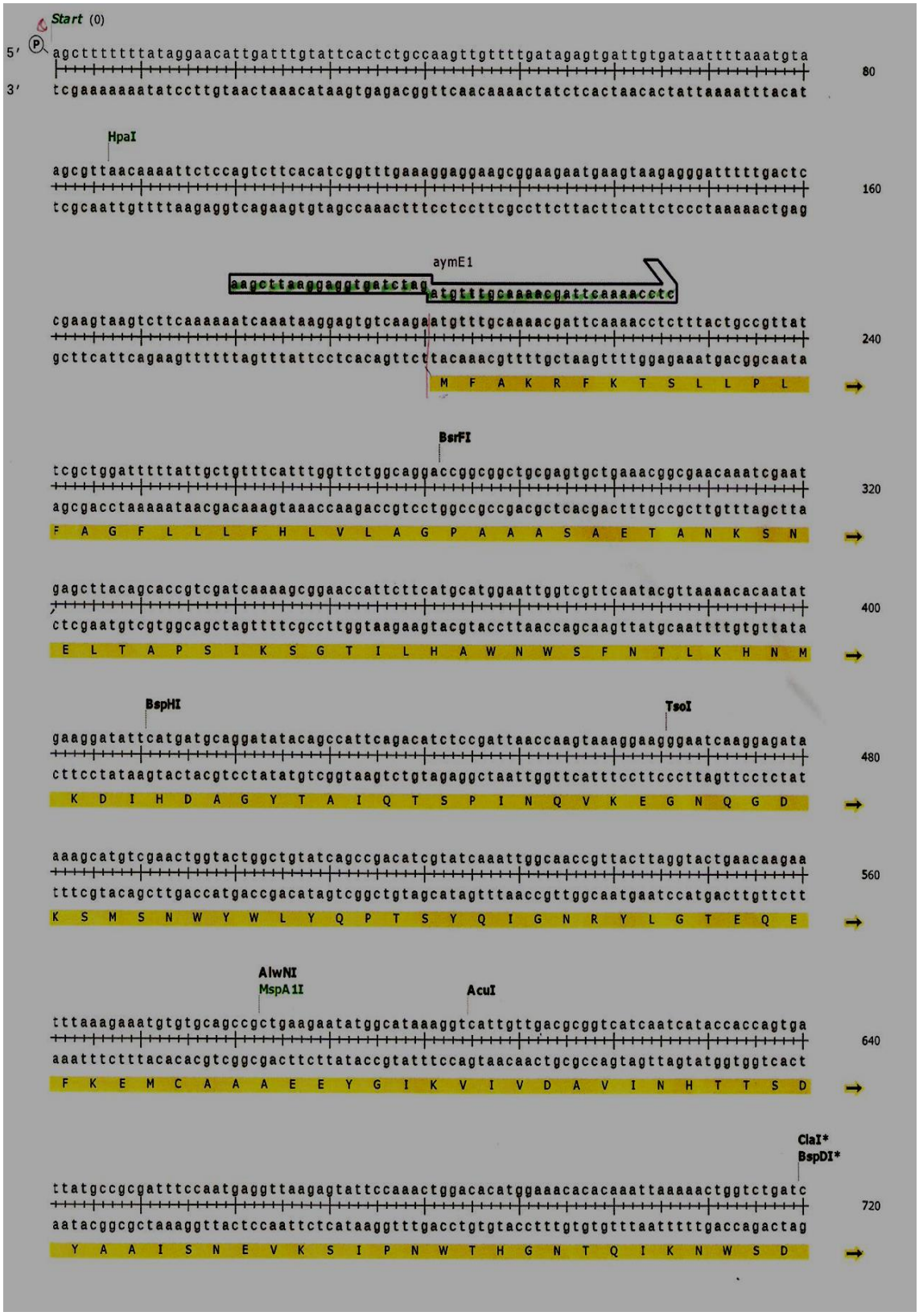
3.17. Primer Dizaynı

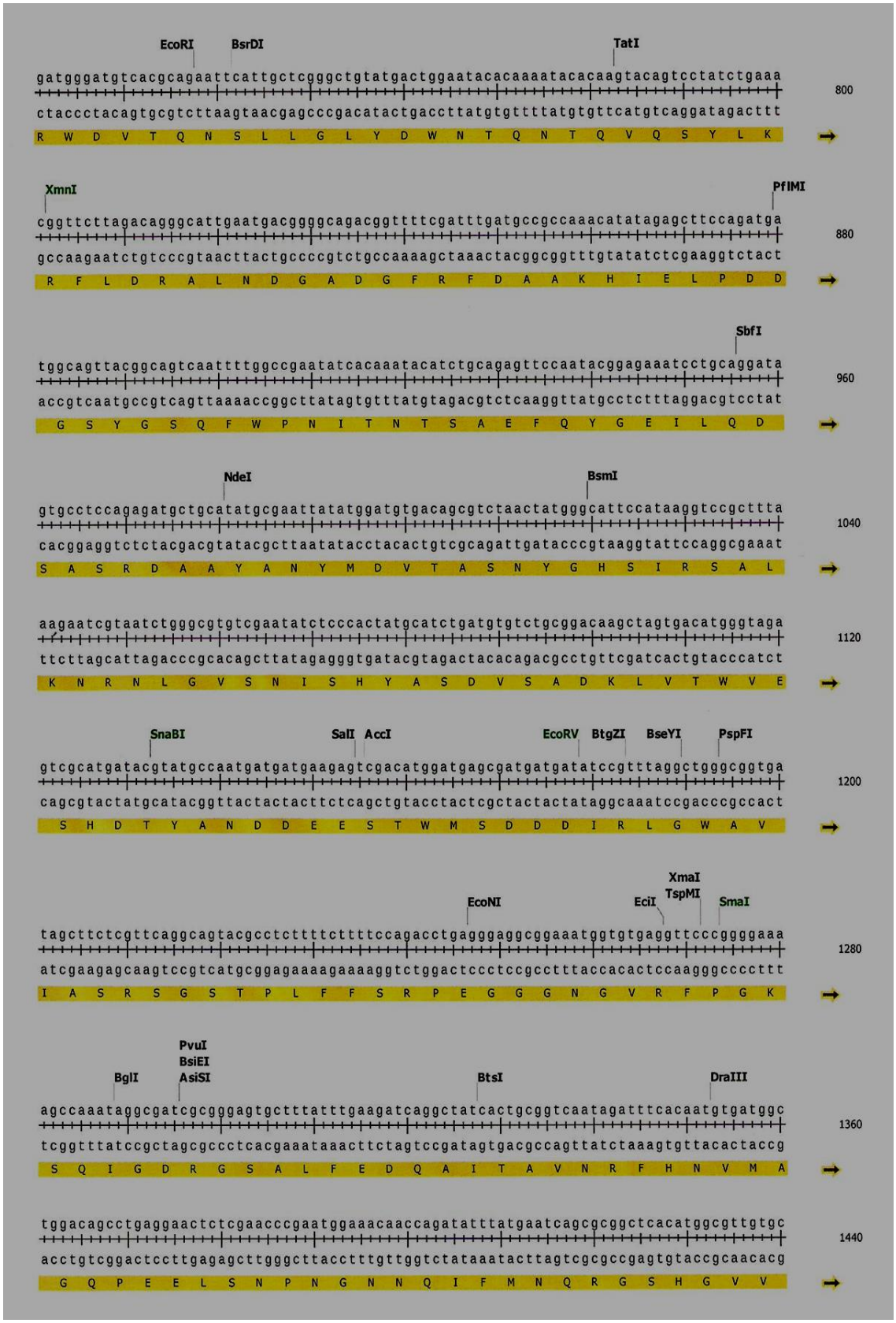
Amilaz üretiminden sorumlu gen bölgesini PCR tekniği ile çok miktarda üretebilmek için primer dizaynı yapıldı. Bunun için GenBank veritabanında depolanmış bulunan *Bacillus subtilis*'e ait α-amilaz gen sekansları hizalandı. Forward (ileri) ve reverse (geri) şeklinde dizayn edilen primerler aşağıda belirtildiği gibidir:

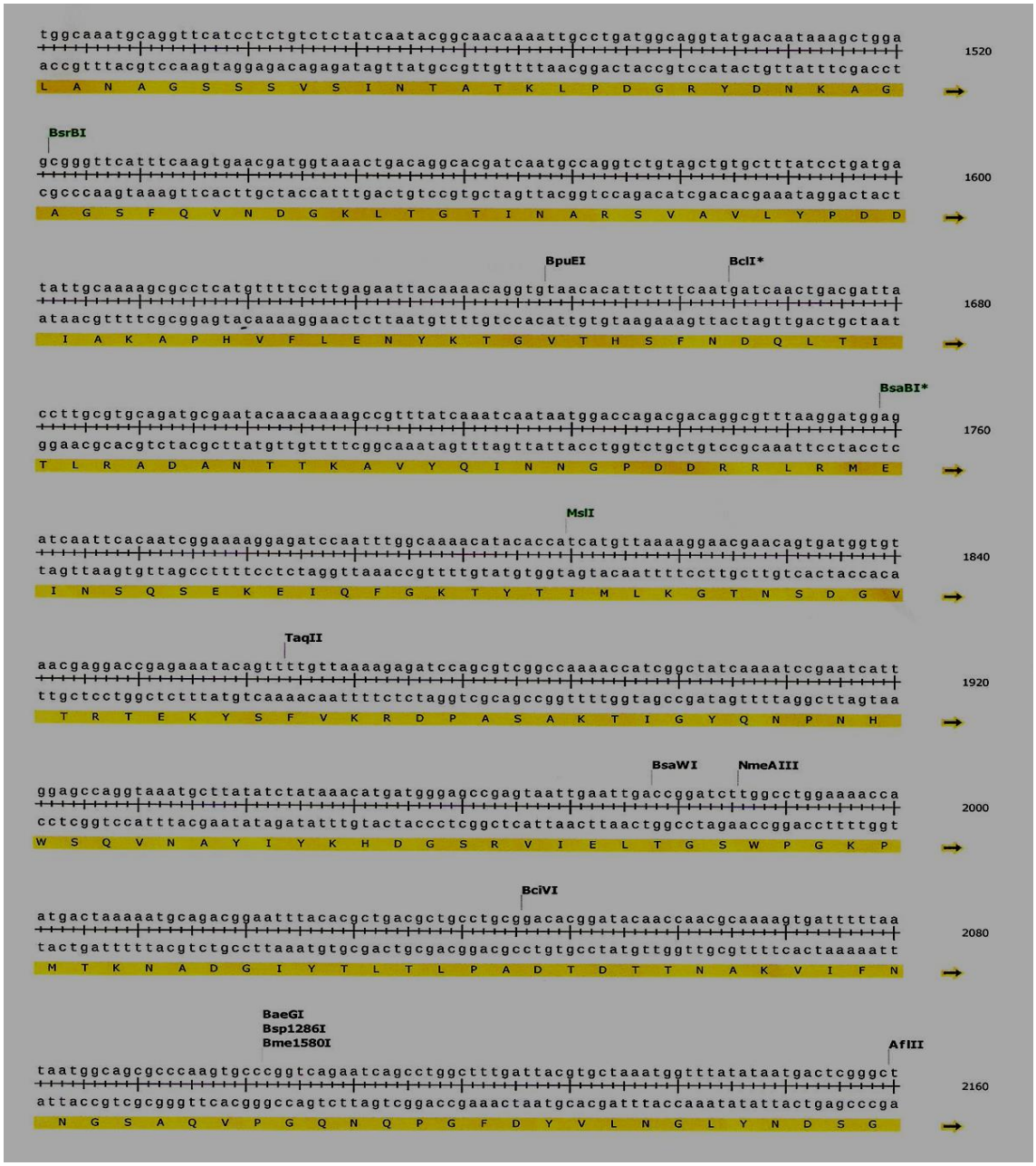


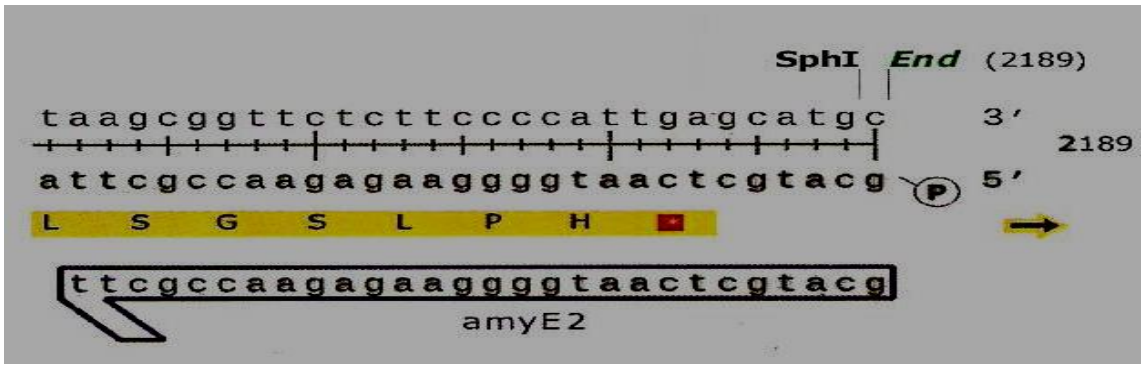
Şekil 3.1. amyE1 ve amyE2 primerleri

Şekil 3.1'de görüldüğü gibi amyE1 primeri, restriksiyon enzimlerinden HindIII'ye ait kesim bölgesini içerirken, amyE2, SphI'e ait kesim bölgesini içermektedir. Şekil 3.2'de ise α-amilaz genine ait restriksiyon enzim haritası verilmiştir.


Start (0)
5′
3′
agctttttttataggaacattgatttgtattcactctgccaagttgttttgatagagtgattgtgataattttaaatgta
tcgaaaaaaatatccttgtaactaaacataagtgagacggttcaacaaaactatctcactaacactattaaaatttacat
80
HpaI
agcgttaacaaaattctccagtcttcacatcggtttgaaaggaggaagcggaagaatgaagtaagagggatttttgactc
tcgcaattgttttaagaggtcagaagtgtagccaaactttcctccttcgccttcttacttcattctccctaaaaactgag
160
aymE1
aagcttaaggaggtgatctag
atgtttgcaaaacgattcaaaacctc
cgaagtaagtcttcaaaaaatcaaataaggagtgtcaagaatgtttgcaaaacgattcaaaacctctttactgccgttat
gcttcattcagaagtttttttagtttattcctcacagttcttacaaacgttttgctaagttttggagaaatgacggcaata
240
M F A K R F K T S L L P L
BsrFI
tcgctggatttttattgctgtttcatttggttctggcaggaccggcggctgcgagtgctgaaacggcgaacaaatcgaat
agcgacctaaaaataacgacaaagtaaaccaagaccgtcctggccgccgacgctcacgactttgccgcttgtttagctta
320
F A G F L L L F H L V L A G P A A A S A E T A N K S N
gagcttacagcaccgtcgatcaaaagcggaaccattcttcatgcatggaattggtcgttcaatacgttaaaacacaatat
ctcgaatgtcgtggcagctagttttcgccttggtaagaagtacgtaccttaaccagcaagttatgcaatttttgtgttata
400
E L T A P S I K S G T I L H A W N W S F N T L K H N M
BspHI
TsoI
gaaggatattcatgatgcaggatatacagccattcagacatctccgattaaccaagtaaaggaagggaatcaaggagata
cttcctataagtactacgtcctatatgtcggtaagtctgtagaggctaattggttcatttccttcccttagttcctctat
480
K D I H D A G Y T A I Q T S P I N Q V K E G N Q G D
aaagcatgtcgaactggtactggctgtatcagccgacatcgtatcaaattggcaaccgttacttaggtactgaacaagaa
tttcgtacagcttgaccatgaccgacatagtcggctgtagcatagtttaaccgttggcaatgaatccatgacttgttctt
560
K S M S N W Y W L Y Q P T S Y Q I G N R Y L G T E Q E
AlwNI
MspA1I
AcuI
tttaaagaaatgtgtgcagccgctgaagaatatggcataaaggtcattgttgacgcggtcatcaatcataccaccagtga
aaatttctttacacacgtcggcgacttcttataccgtatttccagtaacaactgcgccagtagttagtatggtggtcact
640
F K E M C A A A E E Y G I K V I V D A V I N H T T S D
ClaI*
BspDI*
ttatgccgcgatttccaatgaggttaagagtattccaaactggacacatggaaacacacaaattaaaaactggtctgatc
aatacggcgctaaaggttactccaattctcataaggtttgacctgtgtacctttgtgtgtttaatttttgaccagactag
720
Y A A I S N E V K S I P N W T H G N T Q I K N W S D


EcoRI
BsrDI
TatI
gatgggatgtcacgcagaattcattgctcgggctgtatgactggaatacacaaaatacacaagtacagtcctatctgaaa
ctaccctacagtgcgtcttaagtaacgagcccgacatactgaccttatgtgttttatgtgttcatgtcaggatagacttt
R W D V T Q N S L L G L Y D W N T Q N T Q V Q S Y L K
800
XmnI
PflMI
cggttcttagacagggcattgaatgacggggcagacggttttcgatttgatgccgccaaacatatagagcttccagatga
gccaagaatctgtcccgtaacttactgccccgtctgccaaaagctaaactacggcggtttgtatatctcgaaggtctact
R F L D R A L N D G A D G F R F D A A K H I E L P D D
880
SbfI
tggcagttacggcagtcaattttggccgaatatcacaaatacatctgcagagttccaatacggagaaatcctgcaggata
accgtcaatgccgtcagttaaaaccggcttatagtgtttatgtagacgtctcaaggttatgcctctttaggacgtcctat
G S Y G S Q F W P N I T N T S A E F Q Y G E I L Q D
960
NdeI
BsmI
gtgcctccagagatgctgcatatgcgaattatatggatgtgacagcgtctaactatgggcattccataaggtccgcttta
cacggaggtctctacgacgtatacgcttaatatacctacactgtcgcagattgatacccgtaaggtattccaggcgaaat
S A S R D A A Y A N Y M D V T A S N Y G H S I R S A L
1040
aagaatcgtaatctgggcgtgtcgaatatctcccactatgcatctgatgtgtctgcggacaagctagtgacatgggtaga
ttcttagcattagacccgcacagcttatagagggtgatacgtagactacacagacgcctgttcgatcactgtacccatct
K N R N L G V S N I S H Y A S D V S A D K L V T W V E
1120
SnaBI
SalI
AccI
EcoRV
BtgZI
BseYI
PspFI
gtcgcatgatacgtatgccaatgatgatgaagagtcgacatggatgagcgatgatgatatccgtttaggctgggcggtga
cagcgtactatgcatacggttactactacttctcagctgtacctactcgctactactataggcaaatccgacccgccact
S H D T Y A N D D E E S T W M S D D D I R L G W A V
1200
XmaI
TspMI
EcoNI
EciI
SmaI
tagcttctcgttcaggcagtacgcctcttttctttccagacctgagggaggcggaaatggtgtgaggttcccgggggaaa
atcgaagagcaagtccgtcatgcggagaaaagaaaaggtctggactccctccgcctttaccacactccaagggccccttt
I A S R S G S T P L F F S R P E G G G N G V R F P G K
1280
PvuI
BsiEI
AsiSI
BglI
BtsI
DraIII
agccaaataggcgatcgcgggagtgctttatttgaagatcaggctatcactgcggtcaatagatttcacaatgtgatggc
tcggtttatccgctagcgccctcacgaaataaacttctagtccgatagtgacgccagttatctaaagtgttacactaccg
S Q I G D R G S A L F E D Q A I T A V N R F H N V M A
1360
tggacagcctgaggaactctcgaacccgaatggaaacaaccagatatttatgaatcagcgcggctcacatggcgttgtgc
acctgtcggactccttgagagcttgggcttacctttgttggtctataaatacttagtcgcgccgagtgtaccgcaacacg
G Q P E E L S N P N G N N Q I F M N Q R G S H G V V
1440





Şekil 3.2. Primer dizaynı için kullanılan α-amilaz genine ait restriksiyon enzim haritası

HindIII enziminin kesim bölgesi;

5'...A↓A G C T T...3'

3'...T T C G A↑A...5

SphI enziminin kesim bölgesi ise;

5'...G C A T G↓C...3'

3'...C↑G T A C G...5' şeklindedir.

Forward primer amyE1, reverse primer amyE2 olarak adlandırıldı. Tasarlanan primerler ‘‘eurofins’’ firmasına satın alınmak üzere sipariş edildi. Sipariş sonucu elimize ulaşan primerler, sentez raporunda (Ek-1) belirtildiği gibi sulandırıldı. Primerleri sulandırmak için, otoklavlanmış TE tamponu kullanıldı. TE tamponunda bulunan EDTA’nın metal şelatlama özelliğinden dolayı primerlerin kullanım süresinin uzaması amaçlandığından TE tamponu kullanıldı. Bunun için amyE1 forward 235 µL ve amyE2 reverse 238 µL TE tamponu ile sulandırılıp primerlerin çözünmesi sağlandı. Daha sonra kullanılmak üzere -20^{o}C’ ye bırakıldı.

3.18. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA’daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. PCR; DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir. Primerlerin Tm değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır.

Tm= 2(A+T) ºC+ 4(G+C) ºC

PCR reaksiyonu için primerler ve genomik DNA seyreltilerek hazırlandı;

Forward primer 1:10 oranında 10 µL primer ve 90 µL MQ su
Reverse primer 1:10 oranında 10 µL primer ve 90 µL MQ su
Genomik DNA 1:100 oran 1 µL DNA ve 99 µL MQ su

3.18.1. PCR Reaksiyonu

PCR reaksiyonunu hazırlamak için gerekli olan steril şartlar sağlandıktan sonra, aşağıda gösterildiği gibi kullanılacak bileşenlerin oranları ve miktarları dikkatlice hesaplanarak ve en son polimeraz enzimi eklenecek şekilde PCR reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyon buz üzerinde gerçekleştirilip daha önce programlanmış PCR cihazına aktarıldı.

Reaksiyon Bileşenleri	**Miktar**
10X Pfx amplifikasyon tamponu	5 µL
50 mM $MgSO_4$	1 µL
10 mM dNTP	1.5 µL
İleri primer	2 µL
Geri primer	2 µL
Genomik DNA	5 µL
Pfx DNA polimeraz	0.5 µL
Steril MQ su	33 µL
Toplam hacim	50 µL

3.18.2. PCR Programlama

Amilaz geninin amplifikasyonu için hazırlanan Termal döngü programı çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Amilaz geninin amplifikasyonu için hazırlanan program

Termal döngü programı	Sıcaklık (^oC)	Zaman	Döngü sayısı
Denatürasyon	94	4 dk	1
Denatürasyon	94	15 sn	29
Primer bağlanma	56	30 sn	29
Uzama	68	2.15 sn	29
Uzama	72	7 dk	1
Final	4	< 24 saat	1

3.19. PCR Ürününün Jelden Saflaştırılması

PCR ürününün varlığı, agaroz jelde kontrol edildikten sonra geniş dişli tarak kullanılarak yeni bir agaroz jel hazırlandı. Jelden çok miktarda PCR ürünü elde etmek amacıyla 6X izleme boyasından 5 µL, PCR ürününden ise 45 µL eklenerek oluşan karışım kısa spin yapılıp agaroz jele yüklendi. Agaroz jelin birinci ve nispeten küçük kuyucuğuna DNA standartı yüklendi. DNA standartı ve PCR ürününün birbirine karışma ihtimalini önlemek için bir kuyucuk boş bırakılarak bir sonraki ve geniş olan kuyucuğa PCR ürünü yüklendi. 90 mA/V değerinde akım verildi. Örnekler agaroz jelde yeterince ilerledikten sonra akım kesildi. Jel, translüminatör altında görüntülendi. Ürünün uzun süre UV ışığına maruz kalmaması ve dolayısıyla mutasyonların oluşmaması için hızlı bir şekilde steril bistüri yardımıyla ürün jelden kesildi. Jelden kesilen ürünler önceden ağırlıkları tespit edilip kaydedilen steril ependorf tüplere aktarıldı. Bundan sonra jel saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırma adımları uygulandı.

Jelden saflaştırma adımları:

1. Ağırlıkları önceden tespit edilen ependorflar tekrar tartıldı. Sonuçtan ependorfların boş ağırlığı çıkarılarak her bir jelin ağırlığı tespit edildi.

2. Ağırlığı tespit edilen jele 1:1 oranında ‘‘Binding Buffer’’ eklendi.

3. 50-60^{o}C’de ısı şoku cihazında 10 dk inkübe edildi. Arada bir ependorflar alt üst edilerek jelin çözünmesine yardımcı olundu.

4. Süre sonunda çözünen her bir jel solüsyonundan 800 µL alınarak GeneJET saflaştırma kolununa aktarıldı. 12 000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.

5. 700 µL ‘‘Wash Buffer’’ kolona eklendi. Tekrar 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.

6. Etanol artığının DNA’dan tamamiyle ayrılması için kolon son kez boş olarak 1 dk santrifüj edildi. DNA örneğinde kalan Etanol enzimatik reaksiyonların inhibisyonuna neden olabilir.

7. Kolon 1.5 mL’lik steril ependorf tüpüne aktarıldı. 50 µL ‘‘Elution Buffer’’ kolonun tam merkezine denk gelecek şekilde eklendi. 1dk santrifüj edildi.

8. Kolon atıldı. Alttaki Ependorf tüpünde biriken PCR ürününün Nanodrop cihazında saflığı kontrol edildikten sonra ürün, -20^{o}C’de saklandı.

3.20. Klonlama Vektörünün Seçimi

Amilaz üretiminden sorumlu gen bölgesini taşıyacak vektör olarak *E. coli*'ye ait bir plazmid olan pDG148 seçildi. Bu vektör, ampisilin ve kanamisin direnç genlerine sahip olup 8274 bç uzunluğundadır. Vektörün belirtilen antibiyotik direnç genlerine sahip olması, seçiciliği açısından avantaj sağlar. Vektör olarak seçilen pDG148 plazmidinin LA ampisilin ortamına ekimi yapılıp bir gece beklendi. Ertesi gün üreyen plazmidten öze ile tek bir koloni alındı ve LB ampisilin ortamında 12-16 saat üremesi sağlandı. Ardından steril falkon tüplerine aktarılarak 8000 rpm'de 20^{o}C'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı. Dibe çöken pelete plazmid miniprep adımları uygulandı.

3.20.1. Klonlama Vektörü pDG148'in Saflaştırılması

1. Peletin üzerine 250 µL ''Resuspension Solution'' eklendi. Bu solüsyonun hazırlık aşamasında ''RNase A'' solüsyonu önceden eklenmiş olmalıdır. RNase A içeren Resuspension Solution pelete eklendikten sonra mikropipet yardımıyla pelet tamamiyle çözdürülmeye çalışıldı. Çözünen pelet mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

2. Üzerine 250 µL ''Lysis Solution'' eklendi. Nazikçe berrak bir görüntü oluşuncaya kadar 4-6 kez kendi etrafında çevrilerek alt üst edildi.

3. Üzerine 350 µL ''Neutralization Solution'' nazikçe eklendi ve hızlı bir şekilde 4-6 kez alt üst edildi.

4. Oluşan karışım 12 000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

5. Süpernatant GeneJET kolonuna mikropipet yardımıyla aktarıldı. Aktarma esnasında pipet ucunun dipteki çökeltiye temas etmemesine dikkat edildi.

6. 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Örnek toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.

7. 500 µL ''Wash Solution'' eklendi. 30-60 sn santrifüj edildi. Dipteki sıvı atıldı.

8. Tekrar 500 µL ''Wash Solution'' eklendi ve 7. adım tekrar edildi.

9. Wash Solution artığından tamamen kurtulmak için tekrar 1 dk santrifüj edildi.

10. GeneJET kolon 1.5 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Kolonun tam merkezine denk gelecek şekilde 50 µL ''Elution Buffer'' eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk beklendi. Ardından 12 000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.

11. Mikrosantrifüj tüpünde biriken saf plazmid DNA, Nanodrop cihazında saflık kontrolü yapıldıktan sonra -20^{o}C'de saklandı.

3.20.2. Klonlama Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi

pDG148 vektörünün kesiminde HindIII ve SphI restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Vektörün kesimi için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları aşağıda belirtilmiştir.

Reaksiyon Bileşenleri	**Miktar**
FDX 10 tampon	4 µL
DNA	8 µL
Hind III	2 µL
Sph I	2 µL
Steril distile su	24 µL
Toplam hacim	40 µL

Plazmidin restriksiyon enzimleriyle kesiminden önce plazmid konsantrasyonu ve genomik DNA konsantrasyonları gözönünde bulunduruldu.

- **Plazmid konsantrasyonu : 228 ng/µL**
- **Genomik DNA konsantrasyonu : 487 ng/µL**

Bundan sonra şu işlemler uygulandı:

1. Reaksiyonun gerçekleştirildiği mikrosantrifüj tüpüne kısa spin uygulandı.
2. Tüp 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
3. 80°C'de 10 dk inkübe edildi.
4. Toplam hacim 40 µL olduğu için 2 µL alkalen fosfataz eklendi.
5. Tüp tekrar 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyondan sonra 75^{o}C'de 5 dk inkübe edildi.
7. Jel ekstraksiyon kiti kullanılarak kesilen plazmid saflaştırılmaya çalışıldı.

3.20.3. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pDG148'in Jelde Görüntülenmesi

Restriksiyon enzimleriyle kesilen plazmidin kesim durumunu kontrol etmek amacıyla örnekler agaroz jelde yürütüldü.

3.21. pCR Blunt II TOPO Klonlama

Amilaz üretiminden sorumlu gen bölgesini klonlamak için pCR-Blunt klonlama kiti kullanıldı. Bunun için uygulanan protokol kitte belirtildiği gibi şu şekildedir:

Reaksiyon Bileşenleri	**Miktar**
Taze PCR ürünü	0.5 µL
pCR-Blunt TOPO	0.5 µL
Özel tuz solüsyonu	0.5 µL
Steril distile su	1.5 µL
Toplam hacim	3 µL

Bundan sonraki işlem basamakları;

1. Reaksiyon mikrosantrifüj tüpünde nazikçe karıştırılarak 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. (22-23^{o}C)

2. Ardından reaksiyon karışımı buz üzerine konuldu. Bu aşamada istenirse -20^{o}C'de bir gece bekletilebilir.

3. Toplam hacmi 3 µL olan TOPO klon reaksiyonunun üzerine 9 µL steril distile su ilave edildi.

4. Daha önce hazırlanmış olan TOP10 kompotent *E. coli* hücresinden 50 µL mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine dikkatli bir şekilde ve sarsmadan 3 µL seyreltilmiş TOPO klon hücresi ilave edildi.

5. Reaksiyon karışımı 5dk (30 dk'da olur) buz üzerinde bekletildi.

6. Ardından 42^{o}C'de 45 sn ısı şoku cihazında bekletildi.

7. Süre bitiminde tüp hızlı bir şekilde tekrar buz üzerine konuldu.

8. Reaksiyon karışımının üzerine 500 µL SOC besiyeri ilave edildi.

9. Tüpün ağzı sıkıca kapatıldı, 37^{o}C'de 200 rpm hızda 1 saat süreyle horizontal bir şekilde çalkalayıcının üzerine tutturuldu.

10. Süre sonunda reaksiyon karışımından farklı oranlarda beş besiyerine ekim yapıldı.

- **TOPO klon reaksiyon karışımının besiyerlerine ekim tekniği şu şekildedir:**

1. besiyeri 1:100 µL hücre
2. besiyeri 1:10 µL hücre
3. besiyeri 100 µL hücre
4. besiyeri 200 µL hücre
5. besiyeri geriye kalan bütün hücreler
6. besiyeri negatif kontrol için kompotent *E. coli* hücresi

Hücreler bir gece üremeye bırakıldı. Bu arada yeni besiyerleri hazırlandı. Amilaz genini aktarmaya çalıştığımız pCR-Blunt plazmidi, kanamisin antibiyotik direnç genine sahiptir. Bu nedenle yalnızca amilaz genini taşıyan klonların üremesi için sıvı LB ve katı LA besiyerlerine 50 µg/mL olarak hazırlanmış olan stok kanamisin uygun oranda eklenerek seçici besiyerleri hazırlandı. Ertesi gün besiyerlerinde bakteri kolonilerinin üreme durumları kontrol edildi. Kolonilerin ürediği tespit edildi. Üreyen bu klonlara **''pCR-TOPO-amyE''** adı verildi. 12 koloni seçildi. Tek düşen koloniler steril pipet ucu yardımıyla dikkatlice seçilip aynı pipet ucuyla sıvı besiyeri olarak LB kanamisin ve katı besiyeri olarak LA kanamisin besiyerlerine ekim yapıldı ve koloniler üremeye bırakıldı. 12 saat sonra bakteri kültürlerinin üreme durumu kontrol edildi. Üreyen kültürlere plazmid miniprep adımları uygulanarak saflaştırıldı. Ardından nanodrop cihazında saflık ve konsantrasyon durumları kontrol edildi.

3.21.1. pCR TOPO-amyE Klonunun Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi

pCR-TOPO-amyE klonunun restriksiyon enzimleriyle kesimi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve miktarları aşağıda gösterilmiştir. Reaksiyon 37^{o}C' de 1 saat bekletildikten sonra agaroz jele yükleme yapıldı.

Reaksiyon Bileşenleri	**Miktar**
Green 10X Fastdigest tampon	1 µL
Plasmid	2 µL
HindIII	0.5 µL
SphI	0.5 µL
Steril distile su	6 µL
Toplam	10 µL

3.21.2. pCR TOPO-amyE Klonlarının EcoRI ile Kesimi

pCR TOPO-amyE klonlarının EcoRI ile kesimi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve miktarları aşağıda gösterilmiştir. Reaksiyon 37^{o}C' de 1 saat bekletildikten sonra agaroz jele yükleme yapıldı.

Reaksiyon Bileşenleri	**Miktar**
Green 10XFastdigest tampon	1 μL
Plasmid	1 μL
EcoRI	1 μL
Steril distile su	7 μL
Toplam	10 μL

3.21.3. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pCR TOPO-amyE Klonunun Jelden Kesimi

Bunun için gerekli reaksiyon bileşenleri ve miktarları aşağıda gösterilmiştir.

Reaksiyon Bileşenleri	**Miktar**
PCR-TOPO-amyE (7. ve 8.klon)	20 μL
Green 10XFastdigest tampon	10 μL
Hind III	2 μL
Sph I	2 μL
Steril distile su	66 μL
Toplam	100 μL

Reaksiyon 37^{o}C' de 1 saat bekletildikten sonra agaroz jele yükleme yapıldı. Reaksiyonun içinde, green 10X Fastdigest tampon bulunduğundan jele yükleme yapmadan önce 6X izleme boyası eklenmesine gerek yoktur.

Jele yüklenen pCR TOPO-amyE 7. ve 8. klonlar büyük dişli tarak kullanılarak oluşturulan geniş kuyucuklara yüklendi. Küçük kuyucuğa ise DNA standartı yüklendi. Örnekler yeterince ilerledikten sonra akım kesildi. Ardından translimünatör altında örnekler görüntülendi. Steril bistüri yardımıyla örnekler jelden kesilerek daha önce ağırlıkları bilinen steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak jel ekstraksiyon kiti yardımıyla saflaştırma yapıldı.

3.22. pDG148-amyE Ligasyonu

pDG148-amyE ligasyonu yapmadan önce bazı hesaplamalar yapılması gerekmektedir. Bu hesaplamalarda gözönünde bulundurulması gerekenler öncelikle klonlama vektörünün büyüklüğü, bu vektörün konsantrasyonu ve ilgilendiğimiz gen bölgesi olan amyE'nin büyüklüğü konularıdır. Ligasyon için hesaplanan plazmid ve gen büyüklüğü değerleri aşağıda belirtildiği gibidir:

Ligasyon Birimleri	**Değer**
pDG148 büyüklüğü	8274 bç
pDG148 konsantrasyonu	22 ng/µL
amyE büyüklüğü	1980 bç

Ligasyon hesaplamaları Ek-2'de gösterildiği gibi yapıldı. Bu hesaplamalara göre hazırlanan reaksiyon 16^{o}C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün aşağıda belirtilen oranlarda LA+ampisilin besiyerine ekim yapıldı.

1. 1:10 µL
2. 1:100 µL
3. 100 µL
4. 200 µL
5. Bütün hücreler
6. Kontrol için kompotent *E. coli* hücreleri

Besiyerleri 37^{o}C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün kontrol için kullanılan besiyerinde üreme olmadığı diğer besiyerlerinde ise üreme olduğu tespit edildi. Üremenin gerçekleştiği besiyerlerinden 8 klon seçildi. Tek düşen koloniler steril pipet ucu yardımıyla dikkatlice seçilip aynı pipet ucuyla sıvı besiyeri olarak LB ampisilin ve katı besiyeri olarak LA ampisilin besiyerlerine ekim yapıldı ve koloniler üremeye bırakıldı. 12 saat sonra bakteri kültürlerinin üreme durumu kontrol edildi. Üreyen kültürlere plazmid miniprep adımları uygulanarak saflaştırıldı. Nanodrop cihazında saflık ve konsantrasyon durumları kontrol edildi.

3.23. amyE Geninin Ekspresyonu

3.23.1. RNA İzolasyonu

Çalışmanın ilk aşamasında toz halindaki *Bacillus subtilis* ATCC 6051 TBAB besiyerine ekildi ve 37°C'de inkübe edildi. Büyütülen hücre kültürleri 7000 rpm'de 10 dk santrüfüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre çökeltisinde TRI reagent (Sigma) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

TRI solüsyonu ile total RNA izolasyonu (Tri Reagent)

1. Hücreler 7000 rpm'de 10 dk santrüfüjlenerek pelet haline getirildi.

2. Süpernatant uzaklaştırıldı.

3. Peletin üzerine 1mL TRI eklendi ve karışım sürekli pipetlenerek homojenat elde edildi.

4. Homojenat 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.

5. Daha sonra, TRI'nin her 1 mL'si için homojenata 200 µL kloroform eklendi.

6. Örneklerin ağzı sıkıca kapatıldı ve 15 sn güçlü bir şekilde çalkalandı.

7. Çalkalanan karışım 10 dk oda sıcaklığında bırakıldı.

8. 4°C'de ve 13 000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.

9. Renksiz olan üst sıvı faz dikkatlice orta faza dokunmadan alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı.

10. Ayrılan üst faza 4. aşamada kullanılan TRI'nin her mL'si için 0.5 mL izopropanol ilave edildi.

11. Elde edilen numuneler oda sıcaklığında 5-10 dk bekletildi.

12. Örnek 4°C'de ve 13 000 rpm'de 8 dk santrifüj edildi. RNA çökeltisinin tüpün dip kısmında jelimsi ya da beyaz bir pelet halinde oluştuğu gözlendi.

13. Süpernatant uzaklaştırıldı ve RNA peleti 4. aşamada kullanılan TRI'nin her mL'si için en az 1 mL, %75'lik etanol ilave edilip vortekslenerek yıkandı.

14. Yıkanan örnek, 4°C'de ve 8500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

15. Etanol uzaklaştırıldı ve pelet çeker ocakta 15-20 dk kurutuldu.

16. RNA, 80 µL ddH_2O ile çözüldü.

17. Elde edilen total RNA sırasıyla spektrofotometrik olarak ölçüldü ve %0.8'lik agaroz jelde analiz edildi (Sigma (T9424) teknik bülten).

3.23.2. cDNA'nın Eldesi

RT reaksiyonu için Fermentas Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (#1622) kullanıldı. Tüm basamaklar kit prosedürüne göre yapılmıştır.

İlk olarak RNA izolasyonundan elde edilen RNA örneğinden reaksiyona 5µg girecek şekilde 0.5'lik PCR tüpleri buz içine alındı ve 1µL oligo dT18 eklenerek son hacim steril distile su ile 12 µL'ye tamamlandı. Reaksiyon tüpü 70°C'de 5 dk tutulduktan sonra buza bırakıldı. Buz içerisinde reaksiyon tüpüne sırasıyla; 4µL 5x Reaksiyon tamponu, 1µL Ribolock Ribonukleaz inhibitör ve 2 µL 10 mM dNTP mix eklendi ve 37ºC'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1µL M-MuLV revers transkriptaz enzimi eklendi. Hazırlanan karışımın olduğu tüp önce 42ºC'de 60 dk bekletildi. İnkübasyon sonunda enzimi inhibe etmek için reaksiyon tüpü 70ºC'de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyon tüpü buza alındı. Reaksiyon çalışmalarda kullanılmak üzere -20ºC'de muhafaza edildi.

3.23.3. RT-PCR ve Jelden Saflaştırma

RT-PCR sonucu elde edilen ürün ya da ürünlerin agaroz jelde oluşturduğu bantlaşmalara ait büyüklükler uygun marker'lar (genellikle λ DNA EcoRI/HindIII) kullanılarak tespit edildi. Beklenen büyüklüğe uygun olan bant jelden kesilerek alındı ve QIAquick Gel Extraction Kit ve protokolü kullanılarak saflaştırılması kit kullanım kılavuzuna göre gerçekleştirildi.

3.23.4. amyE Geni cDNA'sının Ligasyonu ve Transformasyon

Bu işlem için öncelikle ekspresyon plazmitinin seçilmesi gereklidir. Ekspresyon plazmiti olarak pET16b vektörü kullanıldı.

Bu vektörün kullanılabilmesi için ilk olarak vektör üzerinde, amilazın vektör ile birleşebilmesi için gerekli yapışkan uçların uygun restriksiyon enzimleri ile oluşturulması gerekmektedir. Vektör üzerinde yapışkan uçlar oluşturan enzimlerin BamHI ve NdeI olduğu belirlendi. Amilaz üzerine bu enzimlere ait kesim bölgeleri eklenerek uygun primerler tasarlandı. Primer bilgileri aşağıda belirtildiği gibidir.

F-NdeI:

5’-GCG**CA TATG**ATGTTTGCAAAACGATTCAAAACCTC-3’

R-BamHI:

5’-CGC**GGAT CC**GCATGCTCAATGGGGAAGAGAACCGCTT-3’

3.23.4.1. Ligasyon

Öncelikli olarak reaksiyona girecek insert oranı ng cinsinden hesaplandı. Bunun için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{\text{Vektör}(50ng)x\text{İnsert}(kb)}{0.3(kb)\text{vektör}} x \frac{\text{İnsert}(mol)}{\text{Plazmid}(mol)} = \text{kullanılması gereken insert miktarı}(ng)$$

Kullanılması gereken insert miktarı yukarıdaki formülle hesaplandıktan sonra ligasyon reaksiyonu kuruldu. pET-16b’nin ligasyonu için hazırlanan reaksiyon bileşenleri ve miktarları aşağıda belirtildiği gibidir.

Reaksiyon Bileşenleri	**Miktar**
2X Rapid Ligation Buffer	5 µL
pET-16b (50ng/µL)	1 µL
İnsert	X µL
T4 DNA Ligase (5u/µL)	1 µL
Deiyonize su	10 µL

Reaksiyon, 16 °C’de 24 saat inkübe edildi.

3.23.4.2. Transformasyon

Klasik transformasyon yöntemi kullanıldı. Buna göre:

1. Hücreler -80ºC’den alındı ve buzda 5 dk bekletildi.

2. Ligasyon sonunda elde edilen ürün, hazırlanan kompetent hücrenin üzerine eklendi ve kuru buzda 30 dk bekletildi.

3. Süre sonunda örnekler buzdan alındı ve 42ºC'ye ayarlanan ısı bloğuna bırakıldı.

4. Isı bloğundan alınan örnekler buzda 3 dk bekletildi.

5. Sürenin bitiminde örneklerin üzerine 500 µL LB eklendi ve 37ºC'de 35dk inkübe edildi.

6. Bekleme süresinde ekim yapılacak petrilere 40 µl X-Gal eklendi.

7. Süre bittikten sonra 10 000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.

8. Tüp içerisinde süpernatanttan 50 µL kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı.

9. Pelet 50 µL içerisinde çözüldü, sonra LB-agar-ampisilin-XGal tabağının yüzeyine dağıtıldı ve bir gece 37ºC'de inkübe edildi.

Klasik transformasyon yöntemiyle gerçekleştirilen transformasyon sonrasında oluşan mavi beyaz kolonilerden beyaz renkli olan kolonilerden 10-20 adet koloni seçilerek numaralandırıldı. Aseptik koşullar altında öze yardımıyla alınarak, önceden hazırlanmış olan 40 µL X-Gal içeren LB Agar Ampisilin (100 µg/µL) petrilerine çizgi ekimleri yapılarak master plate oluşturuldu. Bu işlemi takiben, özede kalan artık ile 10 mL'lik 100 µg/µL ampisilinli LB medium besiyerine ekim yapıldı. X-Gal içeren LB Agar ampisilin tabakları ve LB Medium 37°C'de bir gece inkübe edildi.

Tasarlanan primerler kullanılarak amilaz üretildi ve pET16b vektörü içerisine yerleştirilerek, transforme edildi. Oluşan pozitif kolonilerden protein izolasyonu yapıldı.

3.23.5. Protein İzolasyonu ve Saflaştırma

3.23.5.1. Protein İzolasyonu

1. Pozitif kolonilerden, 10 mL sıvı, LB ampisilin besiyerine transfer edildi. Besiyerleri 16 saat inkübasyona bırakıldı. 16 saat sonunda 0.1 M IPTG (izopropil-beta-D-thiogalaktopiranosit)'den 100 µL eklendi ve 1. 2. ve 3. saatler sonunda örnekler alındı.

2. Hücreler 6 000 rpm'de 15 dk peletlendi ve 1 mL TES (100 mM TrisHCl (pH 7.5), 100 mM EDTA ve 100 mM NaCl ile 50 mL hazırlandı) tamponu eklenerek yıkandı.

3. Hücreler yıkamadan sonra 6 000 rpm'de 15 dk yeniden peletlendi ve 180 µL TES ile çözüldü.

4. Üzerlerine 2 µL 10 mg/mL lizozim (0.02 g lizozim ve 50 mM TrisHCl (pH 8) ile çözülüp, dH_2O ile 2 mL'ye tamamlanır) ve 10 µL deterjan kokteyli (150 µL Tween 20 ile 150 µL TritonX100 Not: Burada kullanılacak deterjanlar non-iyonik olmalıdır) eklendi ve 20 dk buzda inkübe edildi.

5. Süre sonunda 50 µL 50 mM TrisHCL (pH 8.0), 0.8 µL Endonükleaz (Sigma kat.no:E-1014) ve 1.5 µL 1 M $MgCl_2$ eklendi ve 20 dk oda ısısında bekletildi.

6. Karışım -86˚C'de 20-25 dk bekletilerek, tekrar oda ısısına alındı ve çözündü. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

7. 14 000 rpm'de 15 dk (+4˚C) santrüfüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve saflaştırma işlemine geçildi.

3.23.5.2. Saflaştırma

Saflaştırma için, Ni-NTA agarose saflaştırma boncuğu kullanıldı. Bunlar;

- Ni-NTA agarose (QIAGEN Kat.no: 30230): Histidin affinitesi gösteren boncuklardır ve pET16b içinde 6X His'lere affinite duymaktadır.

Saflaştırma Uygulama Adımları:

1. Ni-NTA agarose (kit içindekilerden) 120 µL alındı ve 3 000 rpm'de 5 dk (+4˚C) santrifüj edildi.

2. Ni-NTA agarose kitte belirtildiği gibi 500 µL Buffer C (8 M üre 100 mM NaH_2PO_4 ve 10 mM Tris HCl ile pH 6.3 olacak şekilde 1000 mL'ye tamamlanır) içerisinde yıkandı.

3. 3 dk karıştırıcı tabla üzerinde karıştırıldıktan sonra 3 000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.

4. Boncukların üzerine protein süpernatantları eklendi ve gece boyunca +4˚C'de karıştırıcı tabla üzerinde de karıştırıldı.

5. Gece boyu karıştırılan örnekler 3 000 rpm'de 5 dk (+4˚C) santrifüj edildi.

6. Pelet 500 µL Buffer C (Ni-NTA için) ile yıkandı, 3 dk karıştırıcı tabla üzerinde karıştırıldıktan sonra 3 000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 5 defa tekrarlandı.

7. Son santrifüj ile birlikte süpernatant atıldıktan sonra 100 µL Laemmli buffer (250 µL 0.5 M Tris HCl (pH 6.8), 200 µL %20 SDS, 200 µL Gliserol, 100 µL β-merkaptoetanol, az miktarda Bromofenolblue eklendi ve dH_2O ile 1 mL'ye tamamlanır) eklendi ve 10 dk kaynatıldı.

8. Süre sonunda karışımdan 10 µL SDS-PAGE jeline yüklendi.

3.23.6. SDS-PAGE Analizi ve Western Blotlama

3.23.6.1.SDS-PAGE

Bio-RAD firmasına ait jel sistemi kullanıldı. Burada iki farklı tampon kullanıldı:

- Koşturma tamponu (Running buffer): 3.3 mL %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 1.5 M Tris HCl (pH 6.8), 0.1 mL %10 SDS, 4.1 mL dH_2O, 5 µL TEMED ve 50 µL amonyom persülfat ile hazırlandı (%10 olacak şekilde hazırlandı).
- Ayırma tamponu (Stacking buffer): 1.7 mL %30 Bis-akrilamid, 2.5 mL 0.5 M Tris HCl (pH 6.8), 0.1 mL %10 SDS, 5.7 mL dH_2O, 10 µL TEMED ve 50 µL amonyom persülfat ile hazırlandı (%10 olacak şekilde hazırlandı).

Tamponlar kullanılarak hazırlanmış olan jele, örneklerden 10 µL yüklendi ve 80V'da 2 saat yürütüldü. Marker olarak Kaleidoscope prestained standards (Bio-RAD, Kat.no:161-0324) kullanıldı. Bu markerin özelliği renkli olmasıdır.

3.23.6.2.Western Blot Analizi

Proteinlerin membrana aktarılması

- SDS-PAGE'ye yüklenen jeller boyanmadan kullanıldı. Jel önce yıkama tamponu (3 g TrisHCl, 14.4 g glisin, 200 mL metanol, dH_2O ile 1000 mL'ye tamamlandı) içinde 30 dk bekletildi.
- Süre sonunda jelin alanı hesaplandı ve blotlama aleti için uygulanan mA değeri hesaplandı. Şöyleki;

Alan x 0,8 = ?mA formülüne göre uygulayacağımız mA değeri;

6 (en) x 8 (boy) x 0.8 = 24 mA olarak bulundu.

İki farklı jel olduğu için toplam 48 mA'da 90 dk blotlandı.

Western blot analizinde Proteo qwest kolorimetrik Western blotlama kiti kullanıldı (Sigma kat.no: PQ0101).

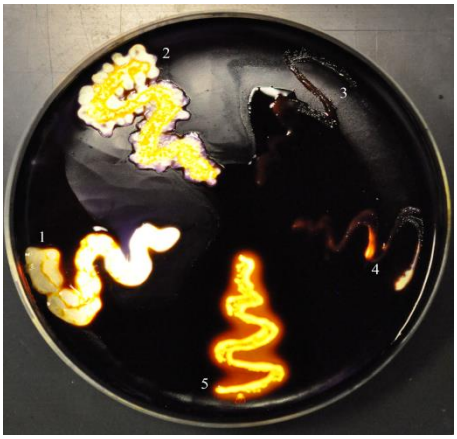
- 90 dk'lık blotlama süresi sonunda membranlar TBST (kit içinde toz halinde bulunmakta, 500 mL dH_2O ile hazırlanmaktadır) ile 1 dk yıkandı ve TBST ortamdan uzaklaştırıldı.
- Membranların üzerine Western blocker solüsyonu (kit içinde) döküldü 30 dk karıştırıcı tabla üzerinde bloklandı. Ni-NTA kullanılarak saflaştırılan membran için anti-Histidin antikoru (Mouse monoklonal antibody Anti-His_6 (Roche, Kat.no: 135508) 1:1000 dilüsyonda western blocker solüsyonu içine eklendi ve 30 dk bekletildi.
- Membranlar süre sonunda TBST tamponunda 1 dk yıkandı ve TBST uzaklaştırılıp, ikinci bloklamaya geçildi.
- Membranların üzerine ikinci defa Western blocker solüsyonu döküldü ancak bu sefer bekletilmeden iki membran içinde ikincil antikor (Anti-mouse IgG (Sigma, Kat.no: A5225) 1:1000 dilüsyonda eklendi ve 30 dk karıştırıcı tabla üzerinde inkübe edildi.
- Süre sonunda membranlar 5 defa 5 dk TBST tamponunda, karıştırıcı tabla üzerinde yıkandı.
- Son TBST uzaklaştırılıp, membranlar ikinci bir plastik boyama tankına aktarıldı ve üzerlerine 4-kloro-1-naptol (60 µL %30'luk H_2O_2, 20 mL metanol, 0.06 g, 4-kloro-1-naptol ve dH_2O ile 100 mL'ye tamamlandı) eklenerek 15 dk bekletildi. Bantlaşmalar belirginleşince tampondan alındı, dH_2O ile yıkanarak, kurutuldu. Kurutulan membranlar UV fotometrede (UV ışık kullanılmadan) resim haline getirildi.

4 .ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Lugol Testi



Şekil 4.1 TBAB + %1 Nişasta



Şekil 4.2. LA + %1 Nişasta

Şekilde 4.1 ve 4.2'de görülen ve 1'den 5'e kadar numaralandırılan bakteriler sırasıyla şunlardır:

1. *Bacillus licheniformis* ATCC 12759

2. *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

3. *Bacillus circulans* ATCC 4516

4. *Bacillus circulans* ATCC 61

5. *Bacillus subtilis* ATCC 6051

Lugol testi hem TBAB hem de LA besiyerlerinde yapıldı. Her iki besiyerinde de %1 nişasta kullanıldı. Nişastanın kullanılmasının amacı bu substratın ekstrasellüler amilaz enzimi tarafından parçalanıp parçalanmadığını ortaya koymaktı. Sonuçta hem TBAB ve hem de LA besiyerinde *Bacillus subtilis* ATCC 6051'in etrafında oluşturduğu zonun diğer bakterilere oranla daha fazla olduğu tespit edildi.

4.2. Amilaz Aktivite Tayini

Aktivite tayinleri sonucunda en yüksek amilaz aktivitesi *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6051'de sırasıyla tespit edildi. Ancak tüm genom haritasının mevcut olması sebebiyle çalışmaların bundan sonraki aşamaları için

Bacillus subtilis ATCC 6051 ile devam edilmesine karar verildi. Bakterilerin spesifik enzim aktiviteleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Bakterilerin Spesifik Aktiviteleri

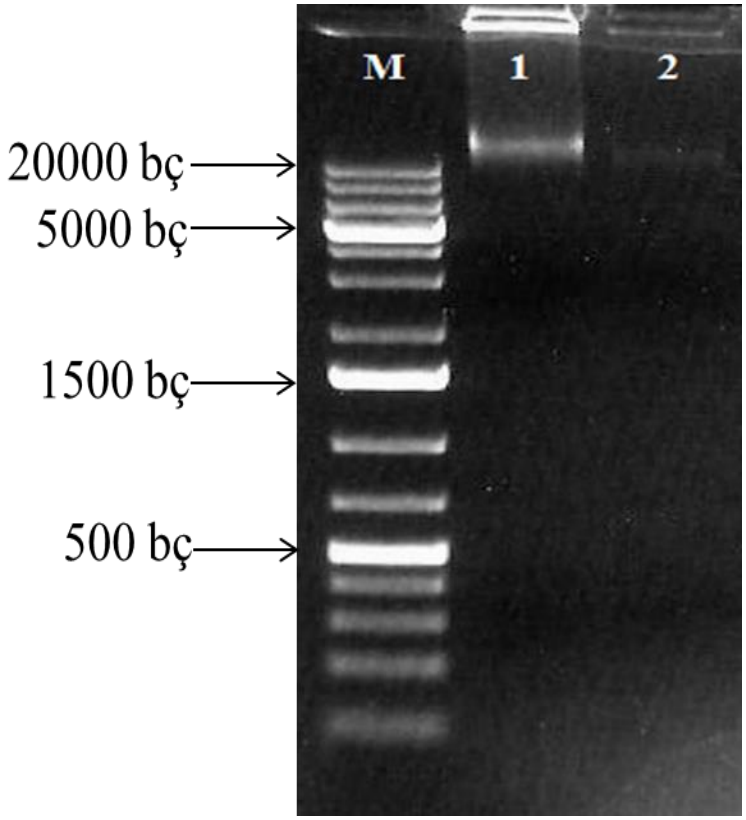
Bakteriler	**Spesifik Aktivite (U/mg)**
Bacillus licheniformis ATCC 12759	902
Bacillus licheniformis ATCC 14580	298
Bacillus circulans ATCC 4516	57
Bacillus circulans ATCC 61	423
Bacillus subtilis ATCC 6051	488

4.3. İzole Edilen Genomik DNA'nın Saflık ve Konsantrasyon Kontrolü

İzole edilen *Bacillus subtilis*'e ait genomik DNA'nın saflık ve konsantrasyon kontrolleri nanodrop cihazında yapıldı. Bunun için kör olarak milli Q su kullanıldı. DNA'nın saflığının hesaplanmasında A_{260}/A_{280} formülü uygulandı. Hesaplama sonucunda elde edilen oran 1.8 ve üstü ise DNA'nın saf olduğuna karar verilir. Yapılan ölçümle Ek-3'te gösterildiği gibi genomik DNA'nın saflığının 1.91 ve konsantrasyonunun da 487.4 ng/µL olduğu tespit edildi. Böylece DNA'nın saf olarak elde edildiği anlaşıldı.

4.4. Agaroz Jel Elektroforez

Bacillus subtilis'e ait genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezinde de saflık kontrolü yapıldı. Agaroz jelde yürütülen örneklerin yeterince ilerlemesi sağlandıktan sonra akım kesildi ve jel translimünatörde görüntülendi. Örneklerin tek bant olarak elde edilmesi saf olduklarının göstergesidir. Elde edilen bantlar Ek-4'te belirtilen DNA belirteci ile karşılaştırıldı.

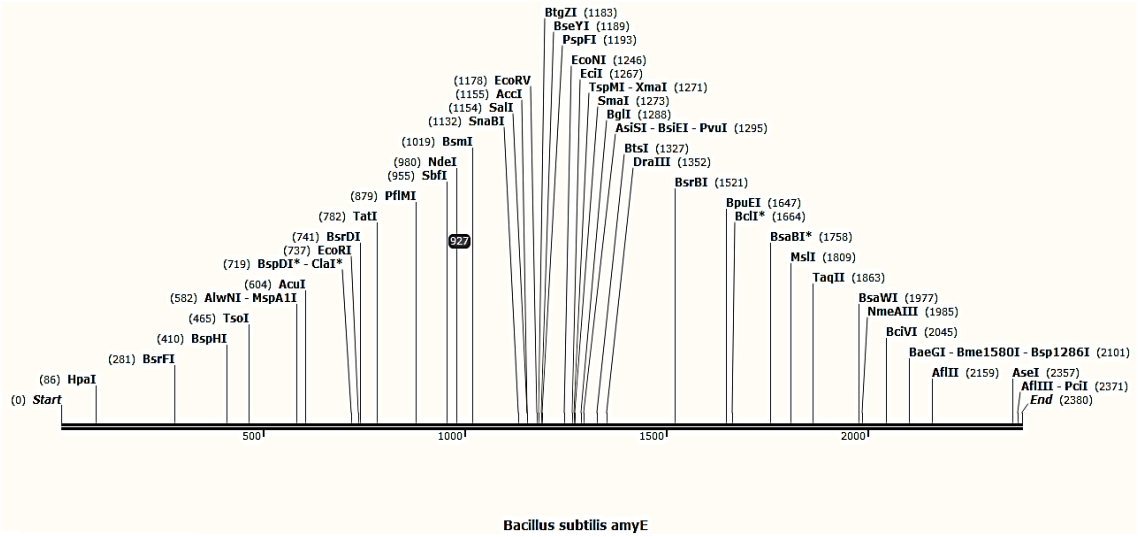


Şekil 4.3. *Bacillus subtilis* genomik DNA'sı. **M.** Marker (GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder) **1.** İzole edilen *Bacillus subtilis* genomik DNA'sı **2.** Dilue edilmiş (1:10) *Bacillus subtilis* genomik DNA'sı

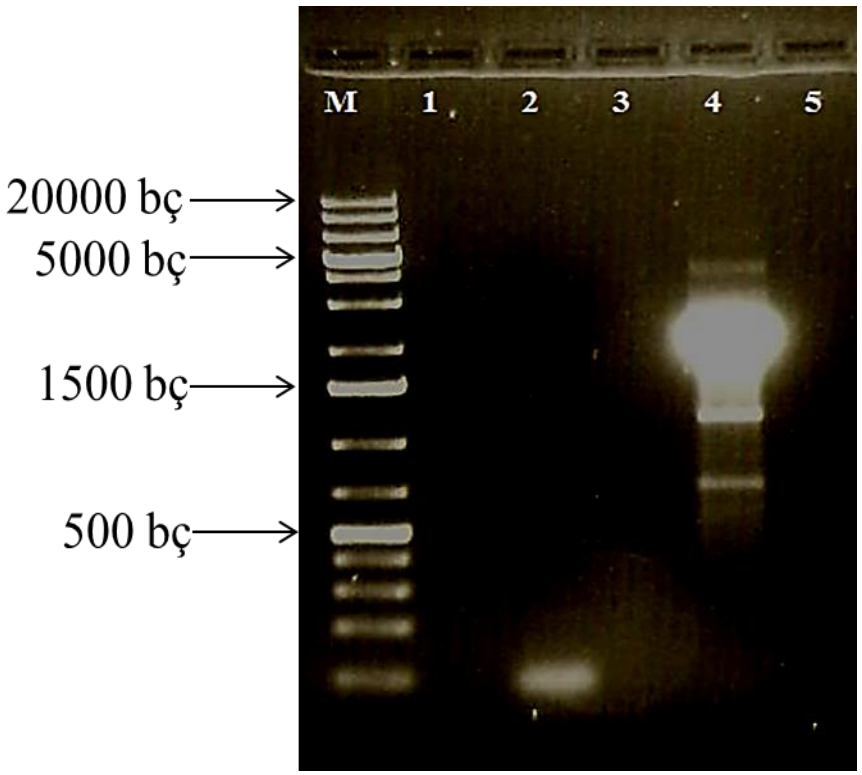
Agaroz jel elektroforezi sonucuna göre genomik DNA ile DNA standartı karşılaştırıldığında (Ek-4) *Bacillus subtilis*'e ait genomik DNA'nın 20 000 bç'den büyük olduğu anlaşıldı (Şekil 4.3).

4.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Amilaz üretiminden sorumlu gen bölgesini çok miktarda üretebilmek için PCR yapıldı. *Bacillus subtilis*'e ait genomik DNA üzerinde alfa amilaz üretiminden sorumlu olan ve büyüklüğü *Bacillus* sp'ler arasında 1.5–1.9 kb arasında değişiklik gösteren amyE gen bölgesi (Şekil 4.4) uygun primerler yardımıyla PCR'da çoğaltıldı (Şekil 4.5).



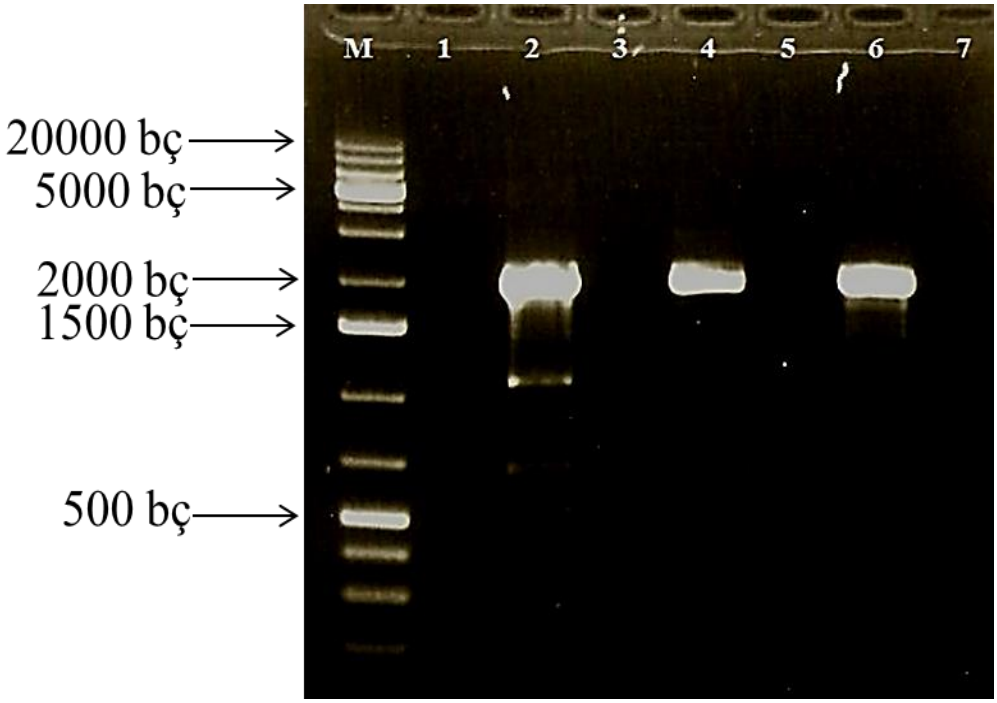
Şekil 4.4. *Bacillus subtilis* amyE gen bölgesi



Şekil 4.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi. M.Marker, 2.PCR negatif kontrol, 4. PCR ürünü (1, 3 ve 5 boş kuyucuklar)

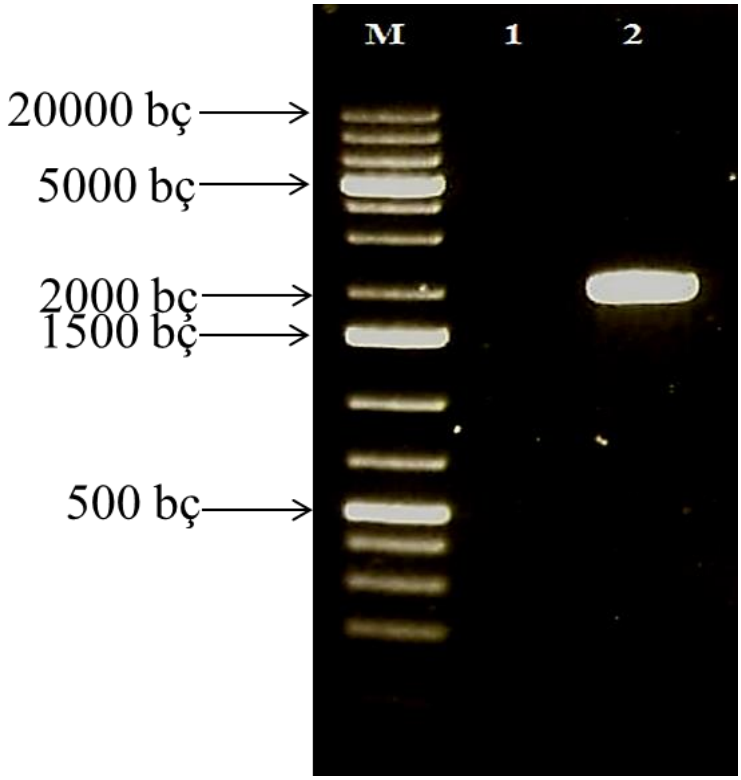
4.6. PCR Optimizasyonu

İstenilen gen bölgesini çok miktarda üretmek amacıyla yapılan PCR sonucu elde edilen PCR ürünü agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Ancak elektroforez sonucu PCR ürününde nonspesifik bağlanmaların meydana geldiği görüldü. Bu durumun olası sebeplerinden birinin ‘‘Primer annealing’’ aşamasında uygulanmış olan sıcaklık derecesinden kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. Bu nedenle PCR optimizasyonu yapılmasına karar verildi. Bunun için ‘‘Primer annealing’’ aşamasında uygulanmış olan sıcaklık derecesi farklı aralıklarda uygulanarak 53-56-59^{o}C olacak şekilde üç farklı sıcaklık derecesi seçildi. Üç aynı markalı PCR cihazı aynı anda programlanıp çalışma başlatıldı. Optimizasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri %0.8’lik agaroz jelde yürütüldü.



Şekil 4.6. PCR optimizasyonu **M**. Marker, **1**. 53^{o}C negatif kontrol, **2**. 53^{o}C PCR ürünü, **3**. 56^{o}C negatif kontrol, **4.** 56^{o}C PCR ürünü, **5.** 59^{o}C negatif kontrol, **6.** 59^{o}C PCR ürünü

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi PCR ürünü DNA standartı ile kıyaslandığında beklendiği gibi yaklaşık 2000 bç büyüklüğündedir. PCR ürününde nonspesifik bağlanmaların olmaması ve tek bir bant elde edilmesi nedeniyle PCR programlamanın primer aşamasındaki sıcaklık derecesi 56^{o}C olarak seçildi. Çalışmaya bu sıcaklık derecesi ile devam edildi (Şekil 4.7).



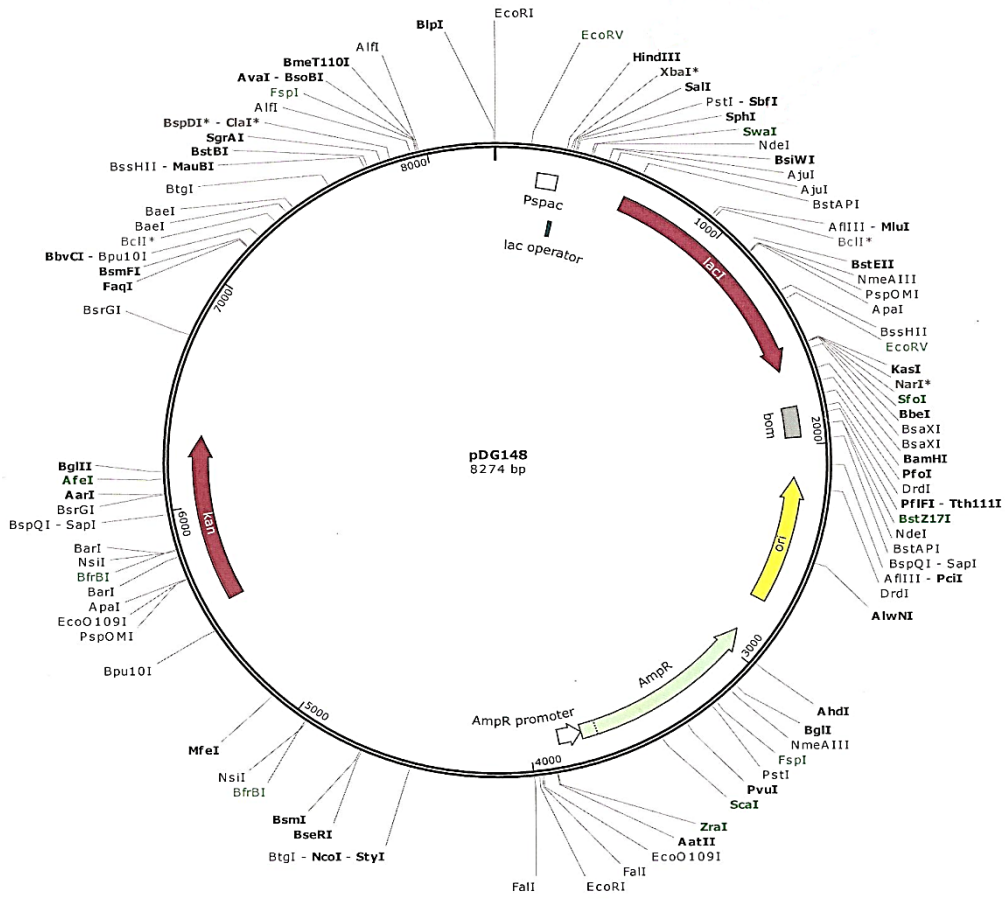
Şekil 4.7. PCR ürünü. **M**. Marker, **1.** PCR negatif kontrol, **2.** PCR ürünü (56^{o}C)

4.7. PCR Ürününün Jelden Saflaştırılması

Jele yüklenen PCR ürününün daha fazla UV ışığına maruz kalıp mutasyonların oluşma ihtimalini önlemek amacıyla görüntüleme işlemi, PCR ürünü jelden kesildikten sonra yapıldı. PCR ürününün jelden kesilmiş hali Ek-5'te gösterilmiştir. Jelden kesilip steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılan ürüne, saflaştırma adımları uygulandı. Jelden saflaştırma ile elde edilen PCR ürününün nanodrop cihazında saflık ve konsantrasyon kontrolleri yapıldı. Ek-6'da gösterildiği gibi ürünün saflığı için kullanılan formül olan A_{260}/A_{280} değerinin 1.89 olduğu ve konsantrasyonunun 158 ng/µL olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar ürünün saf olduğunun göstergesidir. Bu şekilde saf olarak elde edilen ve yaklaşık 2000 bç büyüklüğündeki PCR ürünü daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20 ^{o}C'de saklandı.

4.8. Klonlama Vektörünün Seçimi

Amilaz üretiminden sorumlu gen bölgesini taşıyacak vektör olarak *E. coli*'ye ait bir plazmid olan pDG148 seçildi. Vektör plazmid 8274 bç uzunluğundadır. Bu vektör hem *Bacillus subtilis'*te ve hem de *E. coli'*de replike olabilme özelliğine sahiptir. Bu vektörün bir avantajı da hem ampisilin hem de kanamisin direnç genlerine sahip olmasıdır. Vektör *E. coli'*ye klonlamada kullanılacaksa ampisilin direnç geni, *Bacillus subtilis'*e klonlamada kullanılacaksa kanamisin direnç geninden faydalanılır. Vektörün belirtilen antibiyotik direnç genlerine sahip olması, seçiciliği açısından avantaj sağlar. Vektörün MCS (Multiple Cloning Site) bölgesinde bulunan HindIII, SalI ve SphI restriksiyon enzimleri, Pspac promotorunun kontolü altında ilgili genin bu bölgeye klonlanmasına izin vermektedir (Şekil 4.8).

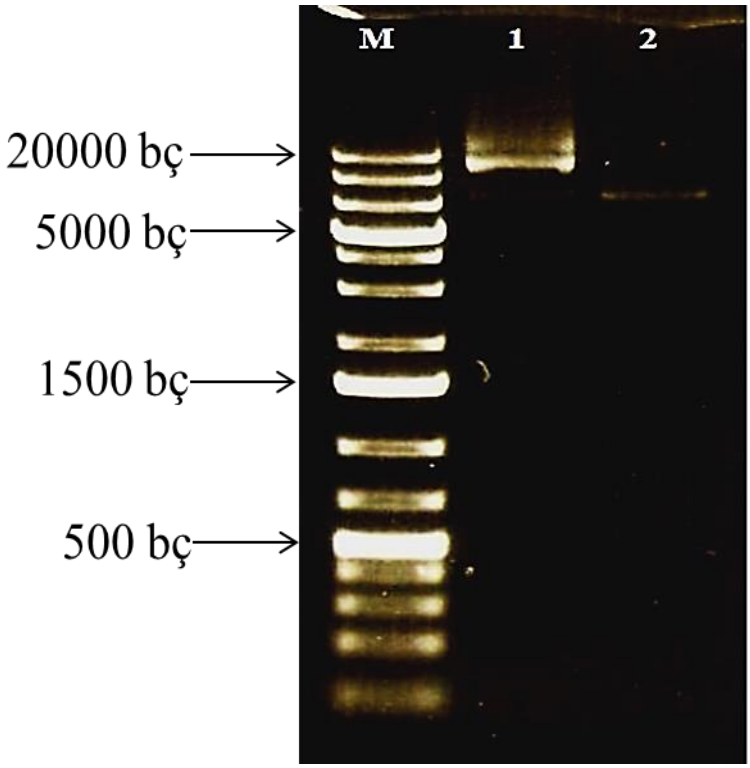


Şekil 4.8. pDG148 klonlama vektörü

4.9. Plazmid pDG148'in Saflığının Kontrolü

Vektör olarak seçilen pDG148 plazmidinin üremesi sağlanıp plazmid miniprep adımlarının uygulanmasının ardından saflık ve konsantrasyon kontrolleri için nanodrop cihazından yararlanıldı. Ek-7'de gösterildiği gibi plazmidin A_{260}/A_{280} değerinin 1.85 olduğu ve konsantrasyonunun 228 ng/µL olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar plazmidin saf olarak elde edildiğinin göstergesidir.

4.10. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pDG148'in Agaroz Jelde Görüntülenmesi

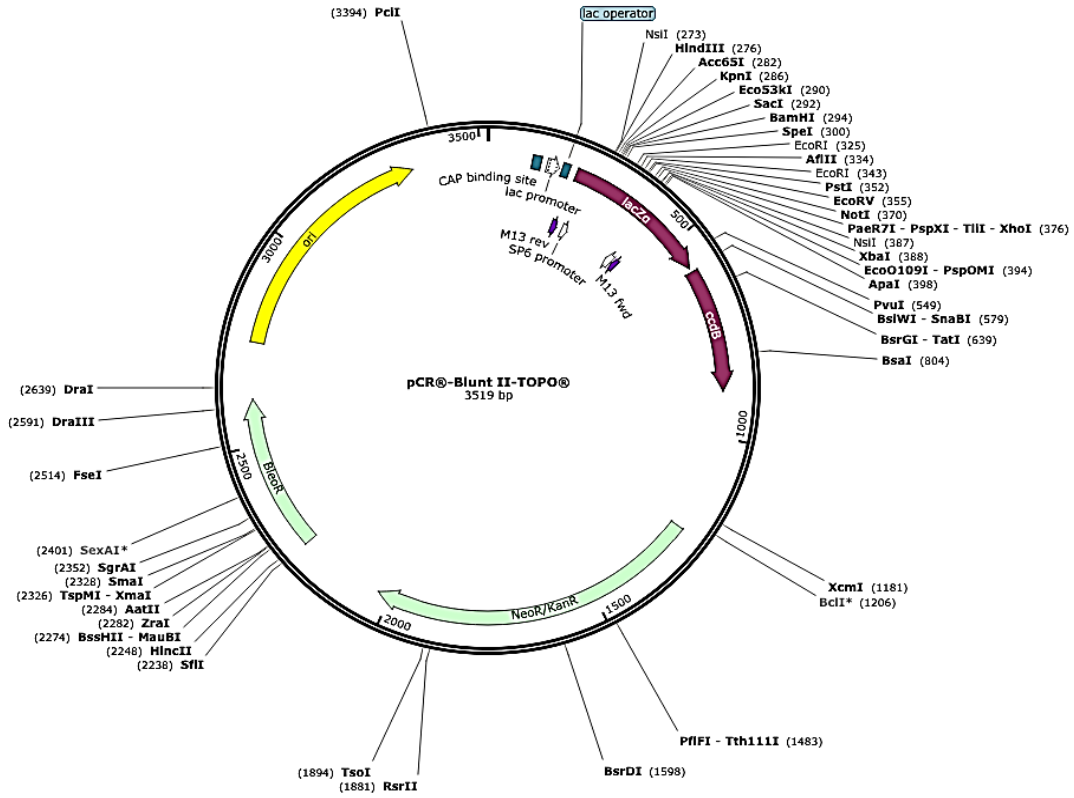


Şekil 4.9. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pDG148'in Agaroz Jel Görüntüsü. Marker **1.** Restriksiyon enzimleriyle kesilen pDG148, **2.** Negatif kontrol (restriksiyon enzimi uygulanmayan)

Saf olarak elde edilen pDG148 plazmidi restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi. Vektörün MCS (Multiple Cloning Site) bölgesine klonlanacak gen parçasının yerleşimini sağlamak için bu bölgedeki özel tanıma dizilerine sahip olan HindIII ve SphI restriksiyon enzimleri kullanılarak vektör kesildi ve açık hale getirildi. Vektöre restriksiyon enzimleri uygulandıktan sonra kesim durumunu kontrol etmek amacıyla agaroz jel elektroforez yapıldı. Şekil 4.9'da 1 no'lu kuyucuk enzim uygulanmış ve 2 no'lu kuyucuk enzim uygulanmamış vektörün durumunu göstermektedir.

4.11. pCR Blunt II TOPO Klonlama

pCR-TOPO plazmiti, yapısındaki topoizomeraz aktivitesi ile ligaz ilişkili vektör sistemlerine göre önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu sistemde sadece vektör ve PCR ile çoğaltılan gene gereksinim duyulmakta ve vektöre genin yerleştirilmesi işlemi 5 dakikada tamamlanmaktadır. Ayrıca ligazların nükleazlarla kontamine olarak gen ve vektör de çentikler oluşturması ve sonrasında rekombinasyon sayısının azaltılması, topoizomeraz kullanımı ile önlenebilmektedir (Kuk ve Erensoy 2008).

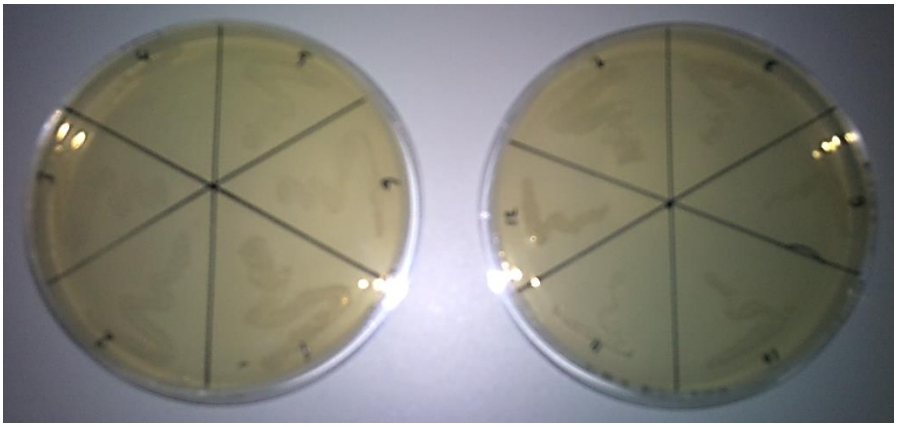


Şekil 4.10. pCR-Blunt II TOPO

Klonlama çalışmalarında amaca yönelik bir plazmitin seçimi önem taşımaktadır. Bugün gelişen teknoloji ile birlikte birçok özelliği bir arada bulunduran plazmit, araştırmacıların hizmetine sunulmuş durumdadır (Kuk ve Erensoy 2008). pCR-Blunt TOPO da bu özel plazmitlerden biridir (Şekil 4.10). Bu plazmitin polilinker bölgesinde lacZ ve *ccd*B geni bulunmaktadır (Bernard ve ark. 1994). Polilinker bölgeye sokulan DNA, lacZ geninin bozulmasına sebep olarak beyaz bakteri kolonilerinin oluşmasını ve

dolayısıyla rekombinant DNA'yı taşıyan hücrelerin kolaylıkla tanınmasını sağlamaktadır (Sambrook ve ark 1989). *ccd*B geni, F plazmidinin *ccd* (control of cell death) lokusunda bulunur. Bu lokus *ccd*A ve *ccd*B adlı iki gen içerir ve bu genler sırasıyla 72 ve 101 aminoasitten oluşan proteinleri kodlar (Karoui ve ark 1983).

Şekil 4.11'de görülen pCR TOPO-amyE klonlarının elde edilme tekniği bölüm 3.21'de anlatılmıştır.



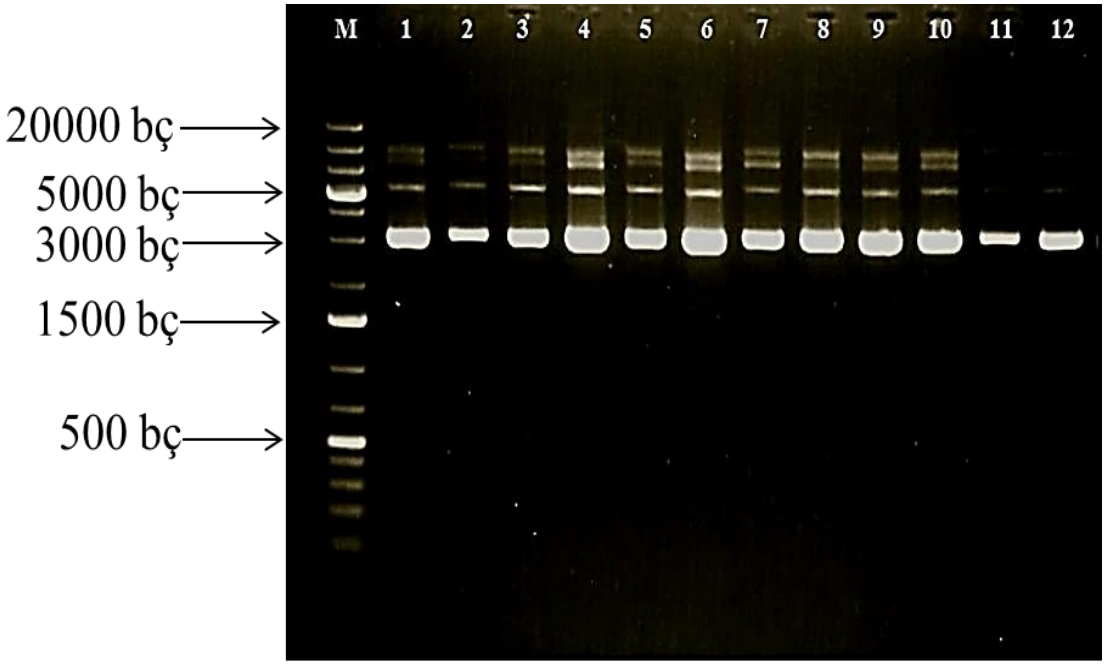
Şekil 4.11. pCR TOPO-amyE klonları

Çizelge 4.2. pCR TOPO-amyE klonlarının saflık ve konsantrasyon sonuçları

Örnek	**ng/µL**	**A260**	**260/230**	**260/280**	**Konsantrasyon**
Klon 1	261.5	5.231	2.32	1.80	50
Klon 2	35.5	0.710	1.81	1.85	50
Klon 3	224.6	4.492	2.24	1.91	50
Klon 4	403.0	8.060	2.24	1.91	50
Klon 5	201.3	4.025	2.07	1.89	50
Klon 6	394.7	7.894	2.24	1.91	50
Klon 7	289.1	5.782	2.23	1.91	50
Klon 8	319.3	6.385	2.23	1.91	50
Klon 9	305.0	6.100	2.24	1.91	50
Klon 10	391.8	7.835	2.23	1.90	50
Klon 11	32.9	0.658	1.94	1.87	50
Klon 12	220.2	4.403	2.20	1.92	50

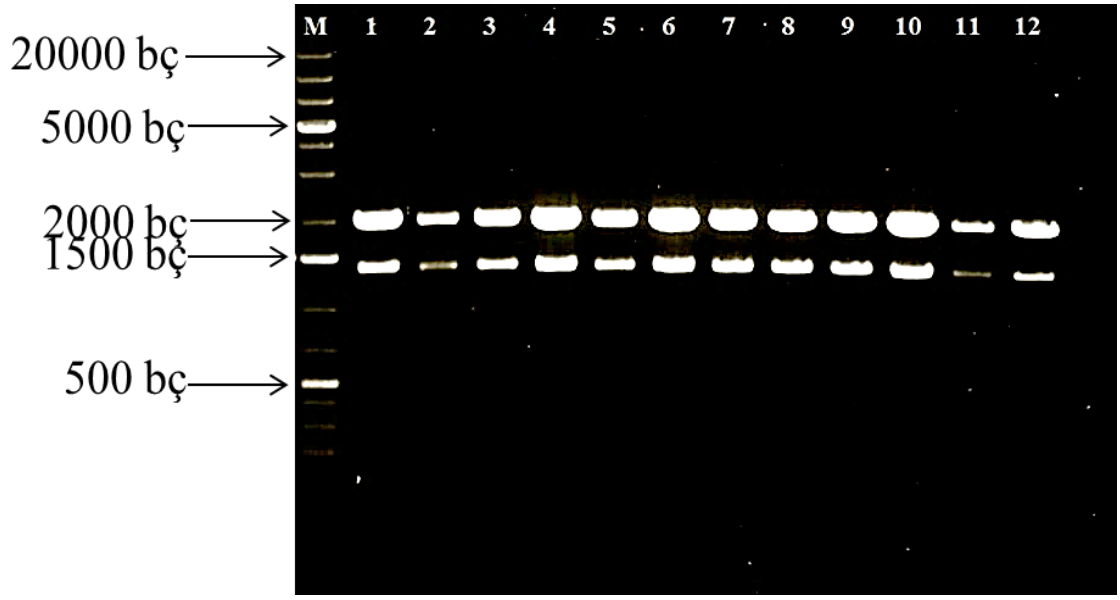
Nanodrop cihazında, seçtiğimiz 12 klonun saflık ve konsantrasyon durumları kontrol edildi (Çizelge 4.2). 12 klondan 2 klon seçildi. Seçilen 7. ve 8. klonlar Eurofins firmasının protokolüne göre 50-100ng/µL olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Her bir klon için bir forward ve bir reverse olmak üzere toplam 4 tüp hazırlandı. Klonlara kod verilerek etiketlendi. Klonlar dizi analizine gönderilmeden önce kontrol amacıyla agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Dizi analizi için Eurofins firmasına gönderildi.

4.12. pCR TOPO-amyE Klonlarının Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi



Şekil 4.12. Restriksiyon enzimi uygulanmamış pCR TOPO-amyE klonları. **M.** Marker **1-12.** pCR-TOPO-amyE klonlarının HindIII ve SphI ile kesilmeden önceki durumu.

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi seçilen 12 klonun HindIII ve SphI restriksiyon enzimleriyle kesilmeden önceki durumu yani negatif kontroller agaroz jelde görüntülendi. Şekilde en kalın olarak görüntülenen bant 3519 bç büyüklüğündeki pCR-Blunt TOPO vektörüne aittir.



Şekil 4.13. pCR-TOPO-amyE klonlarının HindIII ve SphI ile kesimi

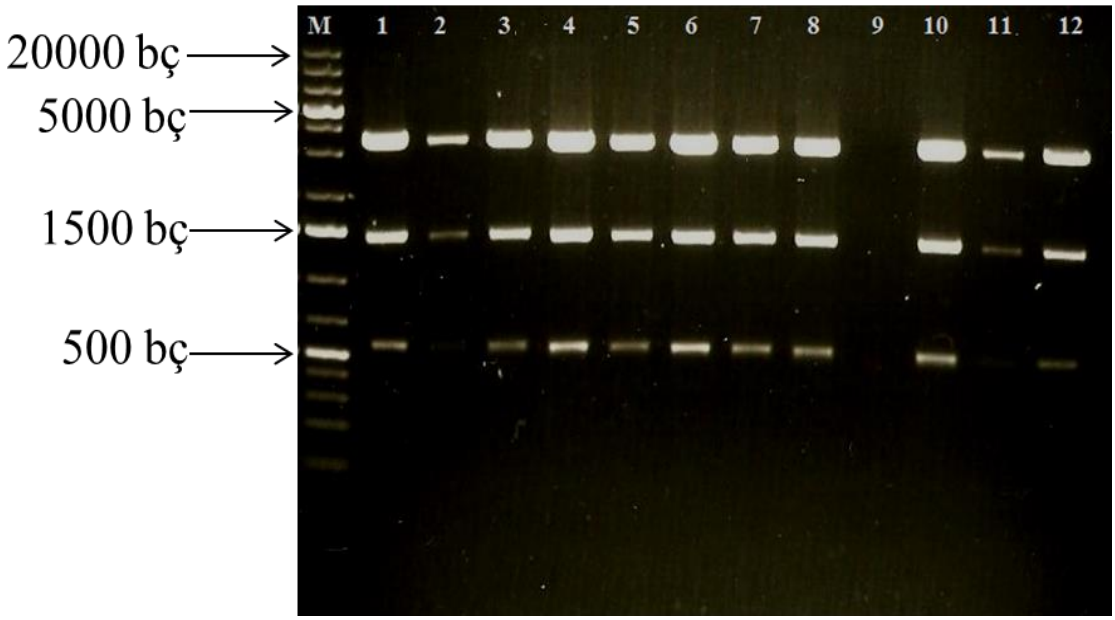
pCR TOPO-amyE klonları, HindIII ve SphI restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Şekil 4.13 incelendiğinde en üstte görülen ve Marker ile kıyaslandığında yaklaşık 2000 bç hizasına denk gelen bant pCR-TOPO-amyE klonunun kesilen büyük fragmentini göstermektedir. Klonlanan genin bu fragmentte olduğu tahmin edildi. İkinci sırada Marker ile kıyaslandığında yaklaşık 1500 bç hizasının biraz altında kalan bant ise küçük fragmenti göstermektedir.

4.13. pCR TOPO-amyE Klonlarının EcoRI ile Kesimi

Şekil 4.13'te klonladığımız genin jelde görülen 2 fragmentten hangisinde olduğu ve klonlamanın başarılı olduğu konusunda oluşabilecek şüphelerin önüne geçmek amacıyla EcoRI restriksiyon enziminin bu vektördeki yerleşiminden faydalanılabileceği düşünüldü. Bu amaçla 12 klonun EcoRI ile kesilip agaroz jelde yürütülmesine karar verildi. Ek-8'de pCR TOPO vektörünün 201 ve 476 baz çiftleri arası lineer halde görülmektedir. Klonlamanın daha kısa sürede ve başarılı olabilmesi için kullanılan bu özel vektörde pCR ürününün yerleşim bölgesinin her iki tarafında EcoRI restriksiyon enziminin özel tanıma dizileri bulunmaktadır. EcoRI enziminin özel tanıma dizisi;

5'...G↓AATTC...3'

3'...CTTAA↑G...5'



Şekil 4.14 Klonların EcoRI ile kontrolü. **M.**Marker, **1-12.** pCR-TOPO-amyE klonları (9. boş kuyucuk)

12 klon EcoRI ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütüldü. Jelde 3 bant oluşması bekleniyordu. Şekil 4.14 bu beklentiyi doğrular niteliktedir. En üstte yer alan ve yaklaşık 3500 bç büyüklüğüne sahip olan bant pCR TOPO vektörüne aittir. Geriye kalan iki bant ise PCR ürünü olan klonladığımız gene aittir.

4.14. Restriksiyon Enzimleriyle Kesilen pCR TOPO-amyE Klonlarının Jelden Kesimi

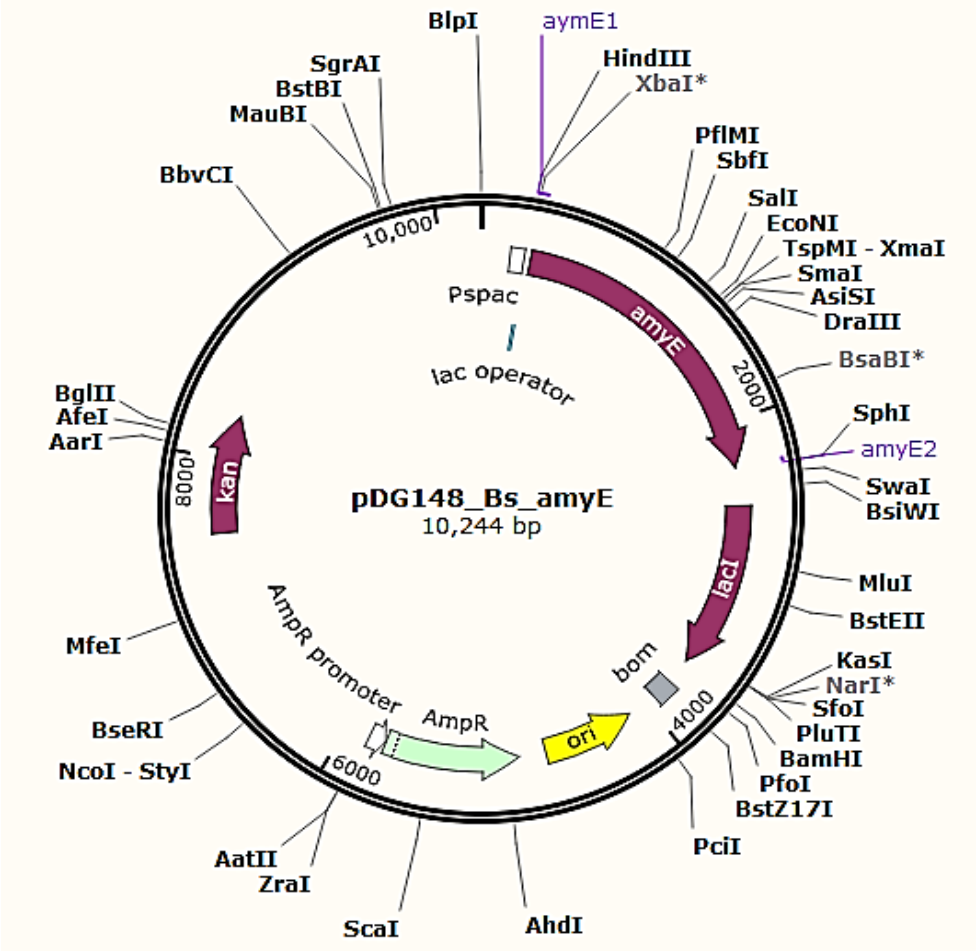
pCR TOPO-amyE klonundan amyE genini çıkarmak için geniş kuyucuklu agaroz jel yapıldı. Örnekler yeterince ilerledikten sonra UV altında görüntülenerek Marker'a göre yaklaşık 2000 bç büyüklüğünde olan bantlar (Ek-9) steril bistürü yardımıyla kesilerek önceden ağırlıkları bilinen steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Jelden saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra konsantrasyon ve saflık kontrolü için nanodrop cihazında ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucunda Şekil 4.15'de görüldüğü gibi klon 7 için A_{260}/A_{280} değerinin 1.90 olduğu ve konsantrasyonunun 28 ng/µL, klon 8 için A_{260}/A_{280} değerinin 1.87 olduğu ve konsantrasyonunun 33 ng/µL olduğu tespit edildi.

Sample ID	ng/uL	A260	260/230	260/280	Const.
7 digested clon	28,23	0,565	0,10	1,90	50
8 digested clon	33,48	0,670	0,89	1,87	50

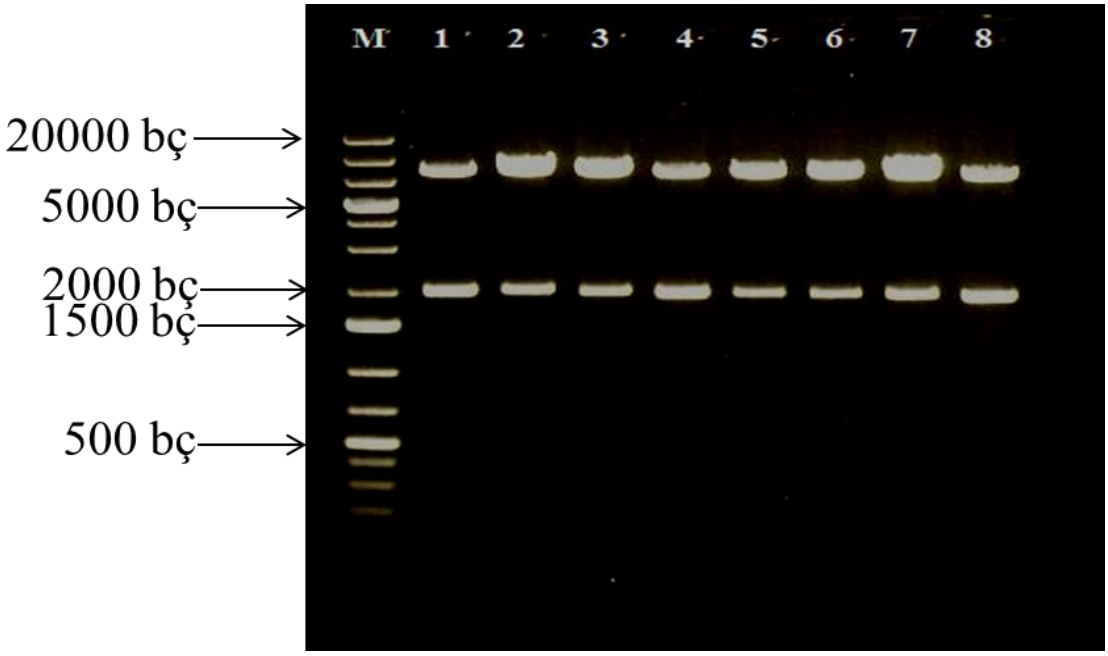
Şekil 4.15. 7. ve 8. klonlara ait saflık ve konsantrasyon değerleri

4.15. pDG148-amyE Ligasyonu

Şekil 4.16'da klonlanan amyE genini taşıyan pDG148-Bs-amyE ligasyonu şematize edilmiştir. Elde edilen klona ligasyonu doğrulamak üzere agaroz jel elektroforez yapıldı.



Şekil 4.16. pDG148-Bs-amyE



Şekil 4.17. pDG148-Bs-amyE klonlarının agaroz jelde görünümü. **M.** Marker, **1-8.** pDG148-amyE klonları

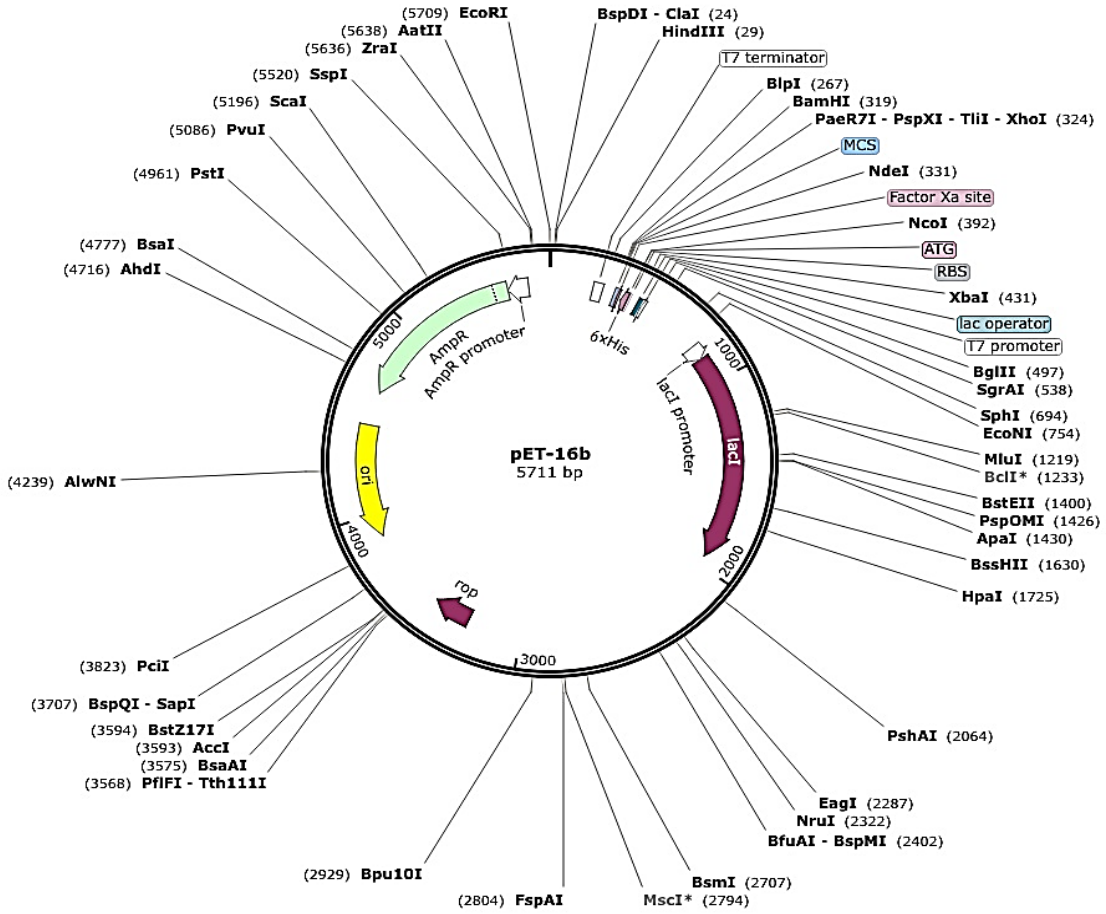
Ligasyonu doğrulamak üzere yapılan agaroz jelde beklendiği gibi 2 bant oluştuğu görüldü. Bunlardan yaklaşık 8000 bç büyüklüğe sahip olan bant pDG148 vektörüne aittir. Diğer bant ise yaklaşık 2000 bç büyüklüğe sahip olan ve amilaz üretiminden sorumlu olan amyE genine aittir (Şekil 4.17).

4.16. Ekpresyon Vektörünün Seçimi

4.16.1. Amilazın Ekspresyon Plazmitine Aktarılması

Ekspresyon plazmiti olarak pET16b vektörü kullanıldı (Şekil 4.18). pET-16b vektör sistemi, *Bacillus subtilis*'ten polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile elde edilen amilaz genini klonlamak için kullanılmıştır. pET vektörleri rekombinant proteinlerin *E. coli*`ye klonlanması, ekspresyonu ve saflaştırılması için geliştirilmiş çok etkili bir sistemdir (Studier ve ark. 1990). pET vektör sistemi lac baskılayıcı proteini kodlayan lacI ve yalnızca T7 RNA polimeraz enzimine spesifik olan T7 promoter bölgesini içerir. T7 RNA polimeraz viral bir enzim olup bakterilerde bulunmaz. pET vektör sisteminde lac operatörünün baskılanmadığı durumda, klonlanan genin transkripsiyonu hızlı bir şekilde olmaktadır. Laktoz ya da laktoz analoğu hücre içine girdiği zaman T7 RNA polimeraz transkripsiyonu aktif hale gelir ve böylelikle bol miktarda ilgilenilen gen

transkripsiyonu olur. pET-16b ekspresyon vektörü His Tag bölgesi içermektedir. Böylece Ni-NTA kolon kullanılarak protein saflaştırması yapılabilmektedir (Erdoğan 2012).



Şekil 4.18. pET-16b ekspresyon vektörü

4.17. Biyoinformatik Karakterizasyon

Doğruluğu ispatlanmış klonlama işlemindeki gen bütünlüğünü belirlemek ve DNA dizilerini gözlemlemek için izole edilen uygun konsantrasyondaki örnek, dizi analizine gönderilmiştir. DNA dizilemesi BLAST programı kullanılarak NCBI dataları ile karşılaştırılmıştır. Eurofins firmasına gönderilen klonların dizi analizi sonuçları 3038122 numarasıyla kabul edilmiş ve dizilenmiştir.

4.17.1. Dizi Analizi Sonuçları

Nanodrop cihazında seçilen 12 klonun saflık ve konsantrasyon durumları kontrol edildikten sonra 2 klon seçildi. Seçilen 7. ve 8. klonlar Eurofins firmasının protokolüne göre 50-100ng/µL olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Her bir klon için bir forward ve bir reverse olmak üzere toplam 4 tüp hazırlandı. Klonlara kod verilerek etiketlendi. Klonlar dizi analizine gönderilmeden önce kontrol amacıyla agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Dizi analizi için Eurofins firmasına gönderildi. Klonlanması gerçekleştirilen, amilaz üretiminden sorumlu amyE genine ait dizi analizi sonuçları 4.19'da belirtilmiştir.

Template	Primer	Status	LeftClip	RightClip	Length
amyE#7	M13 rev	(-29) final result	18 -	978	960
amyE#7	M13 uni	(-21) final result	13 -	942	929
amyE#8	M13 rev	(-29) final result	16 -	809	793
amyE#8	M13 uni	(-21) final result	10 -	940	930

>amyE#7_M13uni-21 -- 13..942 of sequence

>ATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATC
TGCAGAATTCGCCCTTAAGCTTAAGGAGGTGATCTAGATGTTTGCAAAACGATTCAAAA
CCTCTTTACTGCCGTTATTCGCTGGATTTTTATTGCTGTTTCATTTGGTTCTGGCAGGA
CCGGCGGCTGCGAGTGCTGAAACGGCGAACAAATCGAATGAGCTTACAGCACCGTCGAT
CAAAAGCGGAACCATTCTTCATGCATGGAATTGGTCGTTCAATACGTTAAAACACAATA
TGAAGGATATTCATGATGCAGGATATACAGCCATTCAGACATCTCCGATTAACCAAGTA
AAGGAAGGGAATCAAGGAGATAAAAGCATGTCGAACTGGTACTGGCTGTATCAGCCGAC
ATCGTATCAAATTGGCAACCGTTACTTAGGTACTGAACAAGAATTTAAAGAAATGTGTG
CAGCCGCTGAAGAATATGGCATAAAGGTCATTGTTGACGCGGTCATCAATCATACCACC
AGTGATTATGCCGCGATTTCCAATGAGGTTAAGAGTATTCCAAACTGGACACATGGAAA
CACACAAATTAAAAACTGGTCTGATCGATGGGATGTCACGCAGAATTCATTGCTCGGGC
TGTATGACTGGAATACACAAAATACACAAGTACAGTCCTATCTGAAACGGTTCTTAGAC
AGGGCATTGAATGACGGGGCAGACGGTTTTCGATTTGATGCCGCCAAACATATAGAGCT

TCCAGATGATGGCAGTTACGGCAGTCAATTTTGGCCGAATATCACAAATACATCTGCAG
AGTTCCAATACGGAGAAATCCTGCAGGATAGTGCCTCCAGAGATGCTGCATATGCGAAT
TATATGGATGTGACAGCGTCTAACTATGGGCATTCCATAAGGTCCG

>amyE#8_M13rev-29 -- 16..809 of sequence

>GTGACCTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTA
GTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGCATGCTCAATGGGGAAGAGAACCGC
TTAAGCCCGAGTCATTATATAAACCATTTAGCACGTAATCAAAGCCAGGCTGATTCTGA
CCGGGCACTTGGGCGCTGCCATTATTAAAAATCACTTTTGCGTTGGTTGTATCCGTGTC
CGCAGGCAGCGTCAGCGTGTAAATTCCGTCTGCATTTTTAGTCATTGGTTTTCCAGGCC
AAGATCCGGTCAATTCAATTACTCGGCTCCCATCATGTTTATAGATATAAGCATTTACC
TGGCTCCAATGATTCGGATTTTGATAGCCGATGGTTTTGGCCGACGCTGGATCTCTTTT
AACAAAACTGTATTTCTCGGTCCTCGTTACACCATCACTGTTCGTTCCTTTTAACATGA
TGGTGTATGTTTTGCCAAATGGATCTCCTTTTCCGATTGTGAATTGATCTCCATCCTTA
AACGCCGTCTCTGGTCCATTATTGATTTGATAAACGGCTTTTGTTGTATTCGCATCTGC
ACGCAAGGTAATCGTCAGTTGATCATTGAAAGAATGTGTTACACCTGTTTTGTAATTCT
CAAGGAAAACATGAGGCGCTTTTGCAATATCATCAGGATAAAGCACAGCTACAGACCTG
GCATTGATCGTGCCTGTCAGTTTACCATCGTTCACTTGAAATGAACCCGCTCCAGCTTT
ATTGTCATACCTGCCATCACGCAATTCT

>amyE#8_M13uni-21 -- 10..940 of sequence

>TATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATAT
CTGCAGAATTCGCCCTTAAGCTTAAGGAGGTGATCTAGATGTTTGCAAAACGATTCAAA
ACCTCTTTACTGCCGTTATTCGCTGGATTTTTATTGCTGTTTCATTTGGTTCTGGCAGG
ACCGGCGGCTGCGAGTGCTGAAACGGCGAACAAATCGAATGAGCTTACAGCACCGTCGA
TCAAAAGCGGAACCATTCTTCATGCATGGAATTGGTCGTTCAATACGTTAAAACACAAT
ATGAAGGATATTCATGATGCAGGATATACAGCCATTCAGACATCTCCGATTAACCAAGT
AAAGGAAGGGAATCAAGGAGATAAAAGCATGTCGAACTGGTACTGGCTGTATCAGCCGA
CATCGTATCAAATTGGCAACCGTTACTTAGGTACTGAACAAGAATTTAAAGAAATGTGT
GCAGCCGCTGAAGAATATGGCATAAAGGTCATTGTTGACGCGGTCATCAATCATACCAC
CAGTGATTATGCCGCGATTTCCAATGAGGTTAAGAGTATTCCAAACTGGACACATGGAA
ACACACAAATTAAAAACTGGTCTGATCGATGGGATGTCACGCAGAATTCATTGCTCGGG

CTGTATGACTGGAATACACAAAATACACAAGTACAGTCCTATCTGAAACGGTTCTTAGA
CAGGGCATTGAATGACGGGGCAGACGGTTTTCGATTTGATGCCGCCAAACATATAGAGC
TTCCAGATGATGGCAGTTACGGCAGTCAATTTTGGCCGAATATCACAAATACATCTGCA
GAGTTCCAATACGGAGAAATCCTGCAGGATAGTGCCTCCAGAGATGCTGCATATGCGAA
TTATATGGATGTGACAGCGTCTAACTATGGGCATTCCATAACGTCCG

Şekil 4.19. amyE Dizi Analizi Sonuçları

Yukarıda dizi analizi sonucu elde edilen diziler, NCBI veri tabanı kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

Bacillus subtilis strain AS01a alpha amylase gene, complete cds

Sequence ID: gb|KC113313.1| Length: 1980 Number of Matches: 1

Range 1: 1115 to 1980 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1587 bits(859)	0.0	864/866(99%)	1/866(0%)	Plus/Minus

```
Query  97    TCAATGGGGAAGAGAACCGCTTAAGCCCGAGTCATTATATAAACCATTTAGCACGTAATC  156
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1980  TCAATGGGGAAGAGAACCGCTTAAGCCCGAGTCATTATATAAACCATTTAGCACGTAATC  1921

Query  157   AAAGCCAGGCTGATTCTGACCGGGCACTTGGGCGCTGCCATTATTAAAAATCACTTTTGC  216
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1920  AAAGCCAGGCTGATTCTGACCGGGCACTTGGGCGCTGCCATTATTAAAAATCACTTTTGC  1861

Query  217   GTTGGTTGTATCCGTGTCCGCAGGCAGCGTCAGCGTGTAAATTCCGTCTGCATTTTTAGT  276
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1860  GTTGGTTGTATCCGTGTCCGCAGGCAGCGTCAGCGTGTAAATTCCGTCTGCATTTTTAGT  1801

Query  277   CATTGGTTTTCCAGGCCAAGATCCGGTCAATTCAATTACTCGGCTCCCATCATGTTTATA  336
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1800  CATTGGTTTTCCAGGCCAAGATCCGGTCAATTCAATTACTCGGCTCCCATCATGTTTATA  1741

Query  337   GATATAAGCATTTACCTGGCTCCAATGATTCGGATTTTGATAGCCGATGGTTTTGGCCGA  396
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1740  GATATAAGCATTTACCTGGCTCCAATGATTCGGATTTTGATAGCCGATGGTTTTGGCCGA  1681

Query  397   CGCTGGATCTCTTTTAACAAAACTGTATTTCTCGGTCCTCGTTACACCATCACTGTTCGT  456
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1680  CGCTGGATCTCTTTTAACAAAACTGTATTTCTCGGTCCTCGTTACACCATCACTGTTCGT  1621

Query  457   TCCTTTTAACATGATGGTGTATGTTTTGCCAAATGGATCTCCTTTTCCGATTGTGAATTG  516
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1620  TCCTTTTAACATGATGGTGTATGTTTTGCCAAATGGATCTCCTTTTCCGATTGTGAATTG  1561

Query  517   ATCTCCATCCTTAAACGCCGTCTCTGGTCCATTATTGATTTGATAAACGGCTTTTGTTGT  576
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1560  ATCTCCATCCTTAAACGCCGTCTCTGGTCCATTATTGATTTGATAAACGGCTTTTGTTGT  1501

Query  577   ATTCGCATCTGCACGCAAGGTAATCGTCAGTTGATCATTGAAAGAATGTGTTACACCTGT  636
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1500  ATTCGCATCTGCACGCAAGGTAATCGTCAGTTGATCATTGAAAGAATGTGTTACACCTGT  1441

Query  637   TTTGTAATTCTCAAGGAAAACATGAGGCGCTTTTGCAATATCATCAGGATAAAGCACAGC  696
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1440  TTTGTAATTCTCAAGGAAAACATGAGGCGCTTTTGCAATATCATCAGGATAAAGCACAGC  1381

Query  697   TACAGACCTGGCATTGATCGTGCCTGTCAGTTTACCATCGTTCACTTGAAATGAACCCGC  756
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1380  TACAGACCTGGCATTGATCGTGCCTGTCAGTTTACCATCGTTCACTTGAAATGAACCCGC  1321
```

Bacillus subtilis strain AS01a alpha amylase gene, complete cds

Sequence ID: gb|KC113313.1| Length: 1980 Number of Matches: 1

Range 1: 1286 to 1980 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1279 bits(692)	0.0	694/695(99%)	0/695(0%)	Plus/Minus

```
Query  98    TCAATGGGGAAGAGAACCGCTTAAGCCCGAGTCATTATATAAACCATTTAGCACGTAATC  157
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1980  TCAATGGGGAAGAGAACCGCTTAAGCCCGAGTCATTATATAAACCATTTAGCACGTAATC  1921

Query  158   AAAGCCAGGCTGATTCTGACCGGGCACTTGGGCGCTGCCATTATTAAAAATCACTTTTGC  217
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1920  AAAGCCAGGCTGATTCTGACCGGGCACTTGGGCGCTGCCATTATTAAAAATCACTTTTGC  1861

Query  218   GTTGGTTGTATCCGTGTCCGCAGGCAGCGTCAGCGTGTAAATTCCGTCTGCATTTTTAGT  277
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1860  GTTGGTTGTATCCGTGTCCGCAGGCAGCGTCAGCGTGTAAATTCCGTCTGCATTTTTAGT  1801

Query  278   CATTGGTTTTCCAGGCCAAGATCCGGTCAATTCAATTACTCGGCTCCCATCATGTTTATA  337
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1800  CATTGGTTTTCCAGGCCAAGATCCGGTCAATTCAATTACTCGGCTCCCATCATGTTTATA  1741

Query  338   GATATAAGCATTTACCTGGCTCCAATGATTCGGATTTTGATAGCCGATGGTTTTGGCCGA  397
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1740  GATATAAGCATTTACCTGGCTCCAATGATTCGGATTTTGATAGCCGATGGTTTTGGCCGA  1681

Query  398   CGCTGGATCTCTTTTAACAAAACTGTATTTCTCGGTCCTCGTTACACCATCACTGTTCGT  457
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1680  CGCTGGATCTCTTTTAACAAAACTGTATTTCTCGGTCCTCGTTACACCATCACTGTTCGT  1621

Query  458   TCCTTTTAACATGATGGTGTATGTTTTGCCAAATGGATCTCCTTTTCCGATTGTGAATTG  517
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1620  TCCTTTTAACATGATGGTGTATGTTTTGCCAAATGGATCTCCTTTTCCGATTGTGAATTG  1561

Query  518   ATCTCCATCCTTAAACGCCGTCTCTGGTCCATTATTGATTTGATAAACGGCTTTTGTTGT  577
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1560  ATCTCCATCCTTAAACGCCGTCTCTGGTCCATTATTGATTTGATAAACGGCTTTTGTTGT  1501

Query  578   ATTCGCATCTGCACGCAAGGTAATCGTCAGTTGATCATTGAAAGAATGTGTTACACCTGT  637
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1500  ATTCGCATCTGCACGCAAGGTAATCGTCAGTTGATCATTGAAAGAATGTGTTACACCTGT  1441

Query  638   TTTGTAATTCTCAAGGAAAACATGAGGCGCTTTTGCAATATCATCAGGATAAAGCACAGC  697
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1440  TTTGTAATTCTCAAGGAAAACATGAGGCGCTTTTGCAATATCATCAGGATAAAGCACAGC  1381

Query  698   TACAGACCTGGCATTGATCGTGCCTGTCAGTTTACCATCGTTCACTTGAAATGAACCCGC  757
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1380  TACAGACCTGGCATTGATCGTGCCTGTCAGTTTACCATCGTTCACTTGAAATGAACCCGC  1321
```

Şekil 4.20. Klonlanan amyE geninin *Bacillus subtilis* sp'ye benzerliği

4.17.2. amyE Geninin Tahmini Protein Dizisi

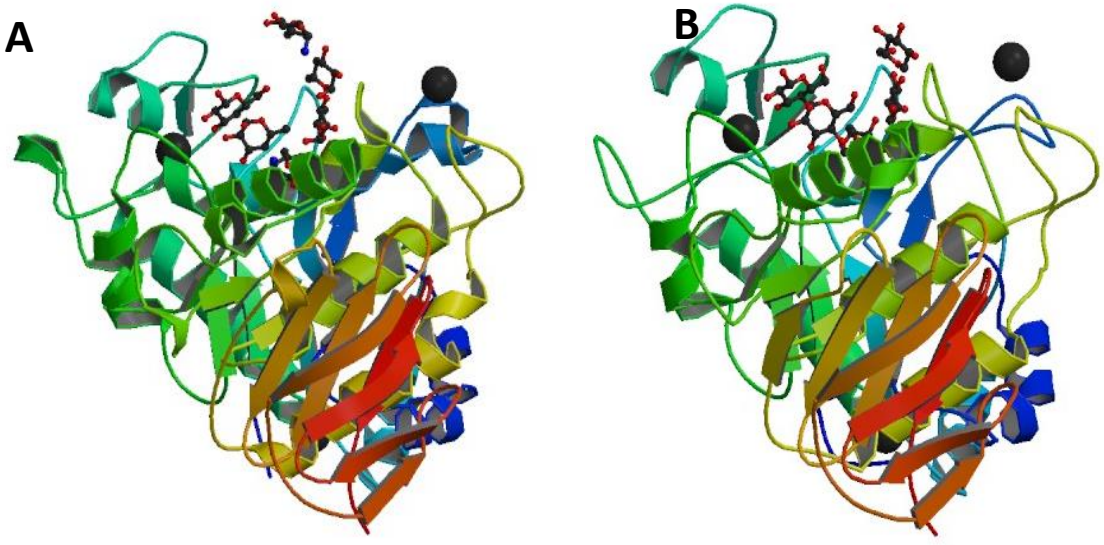
amyE geninin ifade ettiği proteinin tahmini amino asit dizisi Genetool programı kullanılarak elde edilmiştir. Şekil 4.21'de görüldüğü üzere dizinin yaklaşık 659 aminoasit dizisinden oluştuğu tespit edilmiştir.

>MFAKRFKTSLLPLFAGFLLLFHLVLAGPAAASAETANKSNELTAPSIKSGTILHAWNW
SFNTLKHNMKDIHDAGYTAIQTSPINQVKEGNQGDKSMSNWYWLYQPTSYQIGNRYLGT
EQEFKEMCAAAEEYGIKVIVDAVINHTTSDYAAISNEVKSIPNWTHGNTQIKNWSDRWD
VTQNSLLGLYDWNTQNTQVQSYLKRFLDRALNDGADGFRFDAAKHIELPDDGSYGSQFW
PNITNTSAEFQYGEILQDSASRDAAYANYMDVTASNYGHSIRSALKNRNLGVSNISHYA
SDVSADKLVTWVESHDTYANDDEESTWMSDDDIRLGWAVIASRSGSTPLFFSRPEGGGN
GVRFPGKSQIGDRGSALFEDQAITAVNRFHNVMAGQPEELSNPNGNNQIFMNQRGSHGV
VLANAGSSSVSINTATKLPDGRYDNKAGAGSFQVNDGKLTGTINARSVAVLYPDDIAKA
PHVFLENYKTGVTHSFNDQLTITLRADANTTKAVYQINNGPETAFKDGDQFTIGKGDPF
GKTYTIMLKGTNSDGVTRTEKYSFVKRDPASAKTIGYQNPNHWSQVNAYIYKHDGSRVI
ELTGSWPGKPMTKNADGIYTLTLPADTDTTNAKVIFNNGSAQVPGQNQPGFDYVLNGLY
NDSGLSGSLPH

Şekil 4.21. amyE geninin tahmini protein dizisi

4.17.3. amyE Geninin Tahmini Üç Boyutlu Yapı Analizi

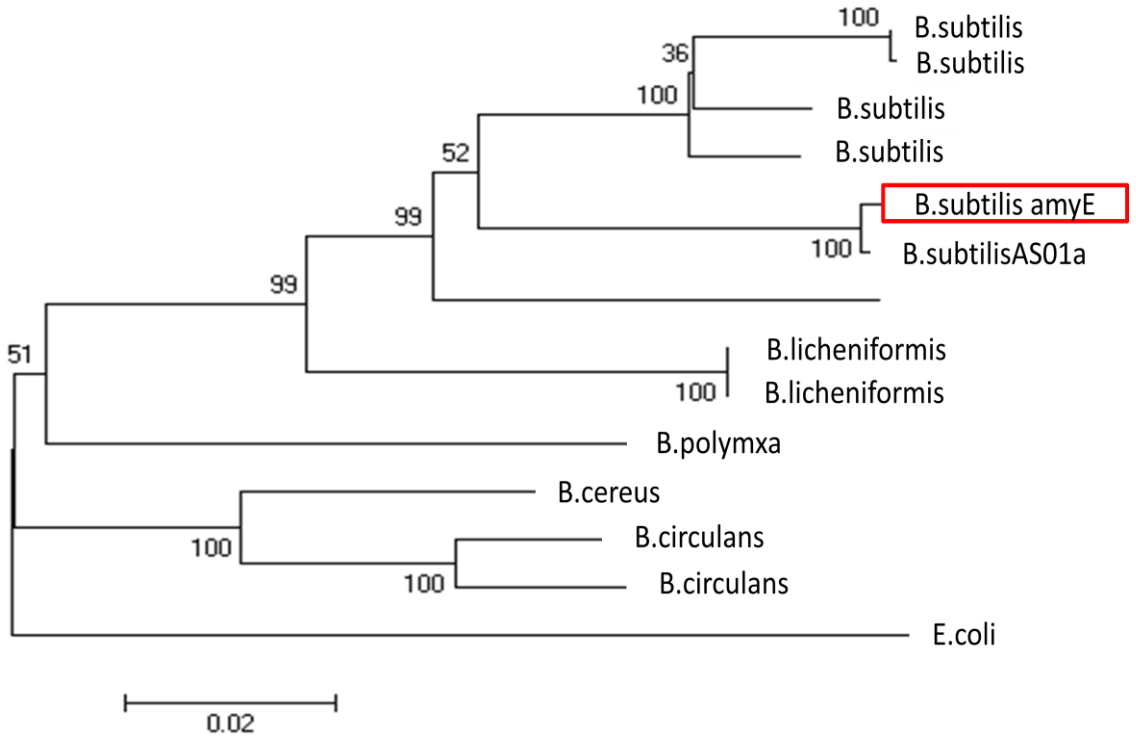
Amilaz üretiminden sorumlu amyE geninin ifade ettiği proteinin tahmini üç boyutlu yapısı, daha önce kristal yapısı tanımlanmış amilaz ile SWISS-MODEL programı kullanılarak karşılaştırılmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. amyE Geninin Tahmini Üç Boyutlu Yapı Analizi **A-** Kristal yapısı tanımlanmış amilaz (PDB:1UA7), **B-** Klonlanmış amyE geni kullanılarak elde edilen amilazın tahmini üç boyutlu yapısı

4.17.4. Filogenetik Analizler

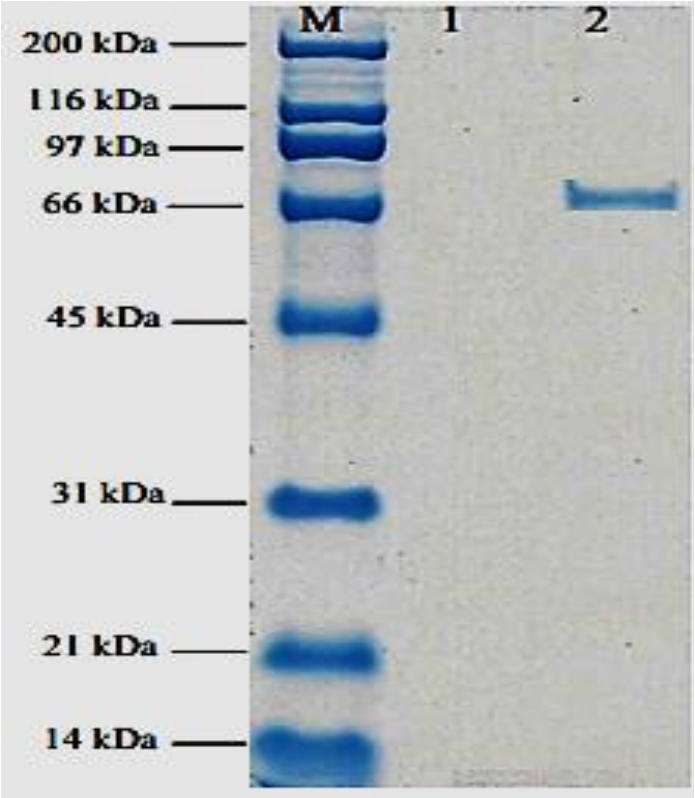
Filogenetik analiz için öncelikle amyE proteinini ClustalW programı (EBI web server) kullanılarak dikey hizalanmıştır. Elde edilen hizalama içinde eksilme ve eklenmelerden ötürü iyi hizalanmamış bölgeleri belirlemek ve silerek ayıklamak için internet tabanlı Gblocks Version 0.91b programı ile tekrar düzenlenmiştir. Elde edilen son dikey hizalama kullanılarak MEGA4 programı yardımıyla NJ algoritmasına dayalı olarak filogenetik ağaç analizleri yapılmış ve görüntülenmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulmasında 1000 tekrarlı Seç Bağla (Bootstrap) testi oluşturulan konsensüs ağacın güvenilirliklerinin sınanmasında kullanılmıştır. Ağaç analizinde de görüldüğü gibi; çalışma organizmamız olan *Bacillus subtilis* (kırmızı ile işaretli), *Bacillus subtilis* AS01a türüne benzerlik göstermiş ve diğer *Bacillus subtilis*'ler ile aynı kökende yer aldığı görülmüştür (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. amyE protein dizisini içeren *Bacillus* türlerine ait filogenetik ağaç analizi (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighboor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA4 programları kullanılmıştır). **Dış Grup**: amyE proteinine sahip *E. coli* kullanılmıştır.

4.18. Amilazın Rekombinant Proteininin Ekspresyonu

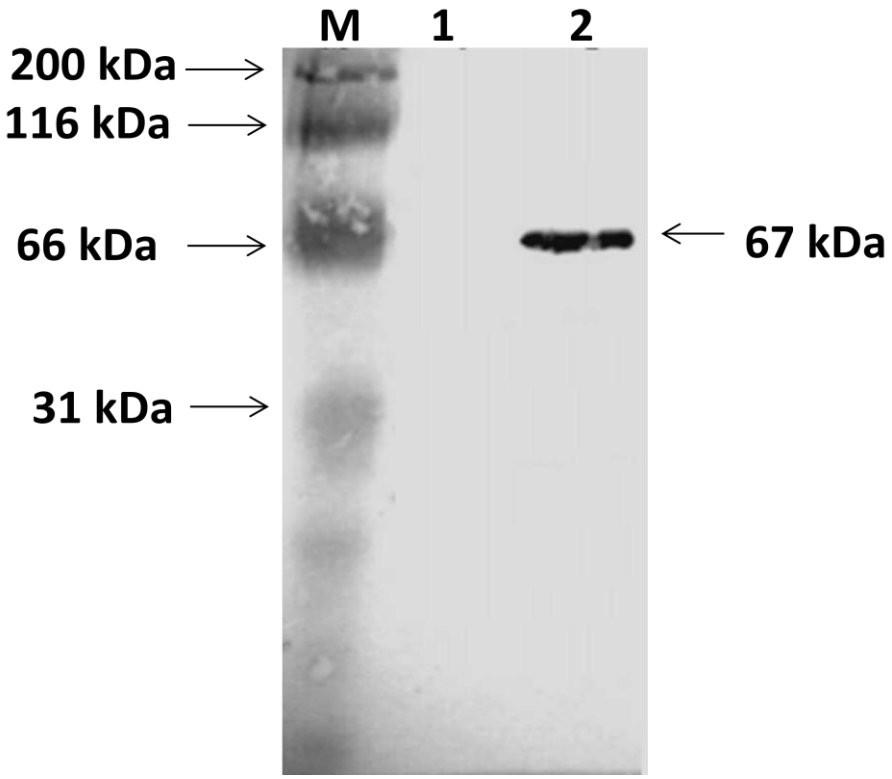
Protein ekspresyonu için His takısı bulunan pET16b vektörü (6xHis) kullanılmıştır. amyE bu vektöre yerleştirilmiş, klonlanmış ve protein izolasyonu yapılmıştır. İki farklı koloniden gelen protein izolatları His affinitesi gösteren Ni-NTA agaroz ile saflaştırılmıştır. Şekil 4.30'da görüldüğü gibi Ni-NTA ile saflaştırılan proteinler SDS jel elektroforezi yöntemi ile görünür hale getirilmiştir.



Şekil 4.24. Ni-NTA ile saflaştırılmış proteinlerin SDS jel görüntüsü. M: Marker (SDS PAGE moleküler ağırlık standartları broad range. 1. İndüklenmemiş örneklerin SDS PAGE analizi. 2. indüklenmiş amilaz proteininin SDS görüntüsü

4.19. SDS-PAGE Sonucunun Western Blot Analizi ile Doğrulanması

Şekil 4.25'te anti-His antikoru ile yapılan western blot analizi sonucunda saflaştırılan proteinin amilaz olduğu teyit edilmiştir. Böylece expresyonun başarılı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.25. Amilaz rekombinant proteininin Western blot analizi ile desteklenmesi. Anti-histidin kullanılarak yapılan analiz sonucunun görüntüsü M: SDS-PAGE moleküler ağırlık standartları broad range. 1. İndüklenmemiş protein. 2. İndüklenmiş amilaz proteininin SDS görüntüsü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son zamanlarda, endüstriyel mikrobiyal ürünlerde olduğu gibi deneysel olarak doğal varyantların seçimi, çeşitli mutajenler ile muamele edilme, çevresel şartlar, fermentor, yarı katı ortam gibi iyileştirmelerle enzim üretiminde yüksek verimler elde edilmiştir. Bunun yanısıra moleküler düzeydeki bilgi birikimi ve endüstriyel organizmalar üzerindeki manipülasyonlar ile enzim üretimi 200-500 kat artmıştır (Okafor 2007). Enzimler gıda, yem, tarım, kağıt, deri ve tekstil endüstrileri gibi çok sayıda yeni uygulamada kullanılmaktadır ve bu da maliyeti önemli derecede düşürmektedir. Aynı zamanda hızlı teknolojik gelişmeler; sağlık, enerji, hammadde ve çevre ile ilgili konularda güçlenen bir trend olan enzim teknolojisini içeren kimya ve ilaç sanayisini canlandırmaktadır (Beilen ve Lie 2002). Enzimlerin etkili katalitik özellikleri, çeşitli sanayi ürünleri ve süreçlerine girmesini sağlamıştır. Biyoteknolojideki son gelişmeler, özellikle protein mühendisliği ve yönlendirilmiş evrim gibi alanlarda, yeni ve verimli enzimlerin gelişmesi için önemli araçlar sağlamaktadır. Bu enzimlerin geliştirilmesi teknik uygulamalarda ve tamamen yeni alanlar için özel olarak yeni enzimlerin üretimiyle sonuçlanmaktadır (Kirk 2002).

Endüstriyel enzimlerin yaklaşık %90'ı rekombinant versiyondadır (Olempska Beer 2006). Rekombinant protein elde etme işleminde ilk adım, talep edilen protein veya enzimi kodlayan geni taşıyan uygun bir mikroorganizma seçmektir (Rabbani ve ark. 2011). α-Amilaz ile ilgili en önemli genetik mühendisliği süreçlerinden biri de rekombinant α-amilaz oluşturmak için *Bacillus* türlerinden diğer mikrobiyal konaklara α-amilaz geninin aktarılması olmuştur. Bazı rekombinant suşlar genin yüksek derecedeki ekspresyonu sayesinde enzim üretimini arttırmak için geliştirilmiştir (Mobini-Dehkordi ve Afzal-Javan 2012, Karakaş 2010). *Bacillus subtilis* sistemi heterolog proteinleri geniş bir yelpazede üretebilmektedir. Protein salgılanması, katlanması ve salgı bileşenlerini kodlayan yeni genlerin anlaşılması ile araştırmacılar genetik mühendisliği teknikleriyle geliştirilmiş *Bacillus subtilis* suşlarına adapte olmuşlardır. Stabilitenin geliştirilmesi, ekspresyon vektörlerinin iyi kontrolü, proteinlerin yeniden dizaynı gibi çabalar heterolog proteinler için *Bacillus subtilis* suşlarını cazip hale getirmiştir (Wong 1995). Ayrıca tamamlanmış genom projesi *Bacillus subtilis*'te yapılacak çalışmaların gelişmekte olan biyoteknoloji ve genetik

mühendisliği gibi bilim dallarına destek olabileceğini düşündürmektedir. α-Amilaz geninin *Bacillus subtilis*'ten elde edilmesi ve endüstriyel biyoteknolojide kullanılabilirliğinin araştırılması bu çalışmanın hedeflerini oluşturmaktadır.

Bu kapsamda çalışmamızda ilk olarak hangi organizmaların yüksek amilaz aktivitesi gösterdiği tespit edildi ve seçilen belli *Bacillus* türleri ile yaptığımız aktivite tayinleri sonucunda en yüksek amilaz aktivitesini *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6051 suşlarının gösterdiği belirlendi. Reece (2004)'in belirttiğine göre *Bacillus subtilis* tüm genomu bilinen organizmalardan biridir ve bu bakterinin genom büyüklüğü $4.2x10^6$ bç olup protein kodlayan genlerinin sayısı 4100 dür. Bu nedenle tüm genom haritasının mevcut olması sebebiyle çalışmaların bundan sonraki aşamaları için *Bacillus subtilis* ATCC 6051 ile devam edilmesine karar verildi. Tüm genomu bilinen organizmalardan elde edilen ürünler, biyoinformatik yöntemler ile kolaylıkla karşılaştırılabilir ve bilginin doğruluğu teyit edilebilir.

İyi α-amilaz ürettiği belirlenen *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den, α-amilaz enzimini klonlamak ve uygun bir vektör aracılığıyla ekspresyonunu sağlayıp rekombinant olarak elde etmek için öncelikle biyoinformatik analizler yapıldı. Gen kütüphanesi incelendiğinde *Bacillus* türleri arasında bu enzimin üretiminden sorumlu genin dizisi tarandı. İnceleme sonucunda restriksiyon enzim haritası çıkarılan α-amilaz geninin yaklaşık 2000 bç uzunluğunda olduğu belirlendi. Biyoinformatik yöntemlerle tahmini dizisi belirlenen α-amilaz geni, deneysel olarak elde edildi ve beklenen büyüklük olan yaklaşık 2000 bç uzunluğunda ürünü elde edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda (Asoodeh ve ark. 2014, Qin ve ark. 2014, Roy ve ark. 2013) α-amilaz geninin uzunluğunun 1900-2000 bç arasında olduğu tespit edilmiştir.

Rabbani ve ark. (2011)'nın belirttiğine göre amilaz aktivitesini doğrulayan metodlar ve genin dizi analizi laboratuar ölçekli üretim için zemin hazırlayabilmektedir. Çalışmamızda doğruluğu ispatlanmış klonlama işlemindeki gen bütünlüğünü belirlemek ve DNA dizilerini gözlemlemek için izole edilen uygun konsantrasyonlardaki örnekler dizi analizine gönderildi. Klonladığımız enzimin biyoinformatik incelemeleri için NCBI veri tabanı kullanıldı. Dizi analizi sonucu elde edilen diziler BLAST yapılarak NCBI'daki diziler ile karşılaştırıldı. Klonladığımız genin dizisinin veri tabanındaki *Bacillus subtilis* sp genleri ile %99 benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu sonuç α-amilaz

genini başarılı bir şekilde klonladığımızın göstergesidir. amyE geninin ifade ettiği proteinin tahmini aminoasit dizisi Genetool programı kullanılarak elde edildi. Dizinin yaklaşık 659 aminoasit dizisinden oluştuğu görüldü. Benzer şekilde Munoz ve ark. (2011) *Bacillus* sp. BBM1 α-amilazının karakterizasyon çalışmalarında, enzimin 659 aminoasit dizisini proteine transle eden bir enzim olduğunu görmüşlerdir. El-Fallal ve ark. (2012)'nın belirttiğine göre farklı organizmalardan elde edilen α-amilazlar %30 aminoasit dizi benzerliği göstermekte ve aynı GH13 ailesinde yer almaktadır.

Amilaz üretiminden sorumlu amyE geninin ifade ettiği proteinin tahmini üç boyutlu yapısı, daha önce kristal yapısı tanımlanmış amilaz ile SWISS-MODEL programı kullanılarak karşılaştırıldı. Elde ettiğimiz rekombinant enzimin protein databank (pdb) verilerinde daha önce üç boyutlu yapısı tanımlanmış ve kristal yapısı çözülmüş amilaz ile benzerlik gösterdiği görüldü. Şöyle ki; α-heliks ve β-plakalı yapılar değerlendirildiğinde bir benzerlik görüldü. Aynı zamanda aktif bölge açısından incelendiğinde motif benzerliği gösterdiği ve α-amilazların taşıdığı motiflerin ürettiğimiz rekombinant amilaza benzediği tespit edildi. Benzer şekilde Munoz ve ark. (2011) *Bacillus* sp. BBM1 α-amilazının üç boyutlu yapısını pdb verileri ile karşılaştırmışlardır. Bilindiği gibi α-amilazların çoğu A, B ve C diye adlandırılan 3 bölgeden meydana gelmektedir ve bu nedenle *Bacillus* sp. BBM1 α-amilazının yapısını *B. subtilis* α-amilazı ile karşılaştırırken bu üç bölgeyi model olarak kullanmışlardır.

Protein ekspresyonu için His takısı bulunan pET16b vektörü (6xHis) kullanıldı. amyE, bu vektöre yerleştirildi, klonlandı ve protein izolasyonu yapıldı. Protein izolatları His affinitesi gösteren Ni-NTA agaroz ile saflaştırıldı. Ni-NTA ile saflaştırılan proteinler SDS jel elektroforezi ile görünür hale getirildi. α-Amilaz üreten *Bacillus* türlerinin cinsleri arasında bu enzimin molekül ağırlığı genellikle 22.5-68 kDa olarak rapor edilmiştir (Xie ve ark. 2014). Çalışmamızda saflaştırdığımız rekombinant α-amilazın SDS-PAGE ile yapılan analizlerinde enzimin molekül ağırlığı 67 kDa olarak tespit edildi. Benzer şekilde yaptıkları çalışmalarda Liu ve ark. (2010) *B. subtilis* α-amilazını 48 kDa, Sarıkaya Demirkan ve ark. (2005) *B. amyloliquefaciens* α-amilazını 52 kDa, Özcan ve Altınalan (2001) *B. subtilis* RSKK246 α-amilazını 65 kDa, Munoz ve ark. (2011) *Bacillus* sp. BBM1 α-amilazını 68 kDa büyüklüğünde olduklarını rapor etmişlerdir.

Ancak bazı çalışmalarda klonlanan ve saflaştırılan α-amilazın SDS-PAGE analizleri sonucu molekül ağırlığı 68 kDa'dan büyük de olabilmektedir. *Bacillus* türlerinin molekül ağırlıklarını SDS-PAGE analizlerine göre, Roy ve ark. (2013) 69 kDa, Asoodeh ve ark. (2014) 76 kDa, Jun Wang ve ark. (2012) 72 kDa, Tuzlakoglu Ozturk ve ark. (2013) 73 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz amilaz rekombinant proteininin SDS-PAGE sonucu, western blot analizi ile doğrulanmaya çalışılmıştır. Anti-histidin kullanılarak yapılan analiz ile saflaştırılan proteinin amilaz olduğu teyit edilmiştir. Böylece expresyonun başarılı olduğu görülmüştür. Kakeshita ve ark. (2011) *Bacillus subtilis*'te eksprese ettikleri rekombinant human interferonu (hIFN-α2b), western blot analizleriyle desteklemeye çalışmışlar ve çalışmada antikor olarak anti-hIFN-α2b antibodies kullanmışlardır.

α-Amilaz nişastaya dayalı endüstrilerde talep edilen başlıca enzimdir ve bu yüzden çabalar biyo-uyumlu yeni organizmaları araştırmak, daha düşük üretim maliyeti ile verimli üretim yapmak ve yüksek saflıkta ürün elde etmek için yapılmaktadır. Gelecekte daha termostabil α-amilazların üç boyutlu yapısı, bu multidomain proteinin moleküler mekanizmasının ve yapı fonksiyon ilişkisinin net bir görüntüsünün elde edilmesiyle belirlenecektir. Yere özgü mutajenezler ile birlikte kataliz ve adaptif parametreler için önemli artıkların rolü hakkında gerekli bilgiyi bize verecektir. Farklı α-amilazların kalsiyum iyonlarının çeşitli konsantrasyonları yoluyla yapılacak termodinamik çalışmalar enzim yapısının stabilizasyonunda kalsiyum iyonlarının tam olarak rolünün araştırılmasına yardım edecektir. Böylece bu ön bilgi biyoteknolojik uygulamalar için yeni geliştirilmiş enzimler tasarlamak için yardımcı olacaktır. Yapılacak kinetik çalışmalar farklı α-amilazların katlanma mekanizmaları hakkında detaylı bilgi sağlayacaktır. Daha önce belirtildiği gibi protein komplekslerinin üç boyutlu yapıları hakkındaki bilgiler moleküler sistemlerin mekanizmalarını anlamak açısından değerli bir anlayış sağlamaktadır (Kumari ve ark. 2012). Ancak protein komplekslerinin üç boyutlu yapılarının belirlenmesi deneysel şartlardan dolayı oldukça zor bir görevdir. Homoloji modeli ile yapısı bilinen proteinlerin amino asit sekanslarından elde edilen proteinlerin yapısı (model), bilinmeyen α-amilazın protein yapısını (hedef) tahmin etmek için kullanılabilir (Fiser ve ark. 2002). Önümüzdeki yıllarda farklı kaynaklardan gelen bir-amilaz tahmini modelinin yapısal analizi ile

inhibitör aksiyonundan sorumlu katalitik aktif bölgenin çıkarımı ve potansiyel yerleri hakkında bir fikir verecek ve ileri araştırmalar için yeni fırsatlar açacaktır. Gelecekte α-amilaz mühendisliği için yeni stratejiler, örneğin stabilite özgünlüğünün geliştirilmesi, yüksek termostabiliteye yol açan disülfit bağlarının tanıtımı gibi yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir (Kumari ve ark. 2012).

Yüksek derecede optimize edilmiş α-amilazların protein mühendisliği teknikleri ile oluşturulmasından dolayı, son yıllarda bakteriyel α-amilazların kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Bakteriyel α-amilazların stabilitesi dikkate alındığında hala cevaplanması gereken pek çok soru vardır. Yüksek stabiliteye sahip *Bacillus* α-amilazlarının yapısı ile gelecekte α-amilaz mühendisliğine odaklanmış bir değişim görmek muhtemeldir. Enzimler spesifik pH aktivite profilleri, substrat ve ürün özgünlüğü ile pek çok endüstriyel uygulamada şüphesiz hoş görülmektedir ve bu nedenle α-amilaz mühendisliğine odaklanmış mühendisliğin, stabiliteden yeni alanlara kayacağı tahmin edilmektedir. Önceki çalışmalar, pH aktivitesi ve substrat özgünlüğüne yönelik olmasına karşın şimdiki çalışmalarda protein stabilizasyonuna yönelik çok sayıda strateji geliştirilmiştir. α-Amilaz alanında devam eden araştırma çalışmaları gözönüne alındığında bu tür yöntem ve teoriler yeni ve gelişmiş özelliklere sahip α-amilazların yapımına neden olacaktır (Nielsen ve Bochert 2000).

Sonuç olarak; bu çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6051'den elde edilen α-amilaz'ın bugünün mevcut enzim havuzunda endüstriyel kullanıma uygun olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmanın devamında yapılacak aktivite testleri ve immobilizasyonu çalışmaları ile üretilen rekombinant proteinin endüstriyel biyoteknoloji pazarında önemli bir yer alacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Adrio, J.L., Demain, A.L. 2014. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes review. ***Biomolecules***, 4: 117-139.

Afzal-Javan, F., Mobini-Dehkordi, M. 2013. Amplification, sequencing and cloning of Iranian native *Bacillus subtilis* α-amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. ***Jundishapur Journal Microbiology***, 6(8): e7371.

AISE (Asociation Internationale de la Detergence et des Produits D'Entretien). 2013. Version 2, Complete report.

Akkaya, A., Pazarlıoğlu, N. 2009. 21.yüzyılın anahtar teknolojisi: Beyaz biyoteknoloji. ***Karadeniz Teknik Üniversitesi Dergisi***, 22-33.

Araujo, R., Casal, M., Cavaco-Paulo, A. 2008. Application of enzymes for textiles fibers processing. ***Biocatalysis Biotechnology***, 26: 332-349.

Asoodeh, A., Emtenani, S., Emtenani, S., Jalal, R., Housaindokht, M.R. 2014. Molecular cloning and biochemical characterization of a thermoacidophilic, organic-solvent tolerant α-amylase from a *Bacillus* strain in *Escherichia coli*. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 99: 114-120.

Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. ***Current Opinion in Biotechnology***, 13: 338-344.

Ben Ali, M., Mezghani, M., Bejar, S. 1999. A thermostable α-amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. ***Enzyme and Microbial Technology***, 24: 584-589.

Ben Messaoud, E., Ben Mabrouk, S., Jemli, S., Bejar, S., 2010. Cloning and sequencing of the α-amylase gen from *Bacillus subtilis* US116 strain encoding and enzyme closely identical to that from *Bacillus amyloliquefaciens* but distinct in thermal stability. ***Journal of Food Biochemistry***, 34: 263–282.

Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E.M., Couturier, M. 1994. Positive selection vectors using the F plasmid *ccd*B killer gene. ***Gene***, 148: 71-74.

Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β. ***Methods Enzymol,*** 1: 149-158.

Bertoldo, C., Antranikian, G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. ***Biocatalysis and biotransformation***, 6: 151-160.

Bhattacharya, A., Pletschke, B.I. 2014. Review of the ezymatic machinery of *Halothermothrix orenii* with special reference to industrial applications. ***Enzyme and Microbial Technology***, 55: 159-169.

Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikariwari, R., Nampoothiri, K.M., Duggal, A., Dey, K., Pandey, A. 2013. Industrial Enzymes-Present status and future perspectives for India. ***Journal of Scientific & Industrial Research***, 72: 271-286.

Bozic, N., Ruiz, J., Lopez-Santin, J., Vujcic, Z. 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α-amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. ***Biochemical Engineering Journal***, 53: 203-209.

Bruschi, F., Dundar, M., Gahan, P.B., Gartland, K., Szente, M., Viola-Magni, M.P., Akbarova, Y. 2011. Biotechnology worldwide and the European biotechnology thematic Network Association (EBTNA). ***Current Opinion in Biotechnology***, 22S: S7-S14.

CAZy α-amilaz bilgileri, http://www.cazy.org/GH13.html (Erişim, 08.04.2014).

Chai, Y.Y., AbdRahman, R.N.Z.R., Illias, R., Goh, K.M. 2012. Cloning and characterization of two new thermostable and alkalitolerant α-amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose. ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, 39: 731-741

Costa de Freitas, A., Escaramboni, B., Carvalho, A.F.A., Gomes de Lima, V.M., de Oliva-Neto, P. 2014. Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. ***Chemical Papers***, 68(4): 442-450.

Demain, A.L., Adrio, J.L. 2008. Contributions of microorganisms to industrial biology. ***Molecular Biotechnology***, 38: 41-45.

Demirkan, B.M., Adachi, A., Higasa, T., Utsumi, S. 2005. α-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. ***Process Biochemistry***, 40: 2629-2636.

Dorocki, S., Bogus, M., 2014. Regional variety of biotechnology in Asia. ***Procedia-Social and Behavioral Sciences Journal***, 120: 197-212.

Dundar, M., Akbarova, Y. 2011. Current state of biotechnology in Turkey. ***Current Opinion in Biotechnology***, 22S: S3-S6.

Eksteen, J.M., Steyn, A.J.C., Rensburg, P., Otero, R.R.C., Pretorius, I.S. 2003. Cloning and characterization of a second α-amylase gene (LKA2) from *Lipomyces kononenkoae* IGC4052B and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. ***Yeast,*** 20: 69-78.

El-Fallal, A., Dobara, M.A., El-Sayed, A., Omar, N. 2012. Starch and Microbial α-Amylases: from concepts to biotechnological applications. ***Carbohydrates–Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology***, 21: 459-488.

Erdoğan, D. 2012. Lipaz geninin termofilik *Geobacillus kaustophilus*'tan klonlanması ekspresyonu ve saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 102.

Fiser, A., Feig, M., Brooks, C.L. 2002. Evolution and physics in comparative protein structure modeling. ***Accounts of Chemical Research***, 35: 413-21.

Frillingos, S., Linden, A., Niehaus, F., Vargas, C., Nieto, J.J., Ventosa, A., Antranikian, G., Drainas, C., 2000. Cloning and expression of α-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. ***Journal of Applied Microbiology***, 88: 495-503.

Gangadharan, D., Ramachandran, P., Paramasamy, G., Pandey, A., Nampoothiri, K.M. 2010. Molecular cloning, overexpression and characterization of the raw-starch digesting α-amylase of *Bacillus amyloliquefaciens*. ***Versita***, 65(3): 392-398.

Gartland, K.M.A., Bruschi, F., Dundar, M., Gahan, P.B., Viola Magni, V.P., Akbarova, Y. 2013. Progress towards the ‘‘Golden Age’’ of biotechnology. ***Current Opinion in Biotechnology***, 24S: S6–S13.

Ghollasi, M., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Ghasemi, A. 2010. Engineering of a *Bacillus* α-amylase with improved thermostability and calcium independency. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, 162: 444-459.

Glick, B.L., Pasternak, J.J., Patten, C.L. 2009. Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA. Waterloo Üniversitesi, 4. Baskı, Sayfa: 1020. Canada.

Grzybowska, B., Szweda, P., Synowiecki, J. 2004. Cloning of the thermostable α-amylase gene from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* isolation and some properties of the enzyme. ***Molecular Biotechnology***, 26(2): 101-109.

Gupta, A., Gupta, V.K., Modi, D.R., Yadava, L.P. 2008. Production and characterization of α-amylase from *Aspergillus niger*. ***Biotechnology***, 1: 1-6.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. ***Process Biochemistry***, 38: 1599-1616.

Haki, G.D., Anceno, A.J., Rakshit, S.K. 2008. Atypical Ca^{2+} independent, raw-starch hydrolysing α-amylase from *Bacillus* sp. GRE1: characterization and gene isolation. ***Journal of Microbiology and Biotechnology***, 24: 2517–2524.

Han, X., Lin, B., Ru, G., Zhang, Z., Liu, Y., Hu, Z. 2014. Gene cloning and characterization of an α-amylase from *Alteromonas macleodii* B7 for *Enteromorpha* polysaccharide degradation. ***Journal of Microbiology and Biotechnology***, 24(2): 254-263.

Hernandez-Martin, E., Otero, C. 2008. Different enzyme requriments for the synthesis of biodiesel: Novozym and Lipozym. ***Bioresource Technology***, 99: 277-286.

Horvathova, V., Godany, A., Sturdik, E., Janecek, S. 2006. α-amylase from *Thermococcus hydrothermalis* re-cloning aimed at the improved expression and hydrolysis of corn starch. ***Enzyme and Microbial Technology***, 39: 1300-1305.

Hostinova, E., Janecek, S., Gasperik, J. 2010. Gene sequence, bioinformatics and enzymatic characterization of α-amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* KZ. ***Protein Journal***, 29: 355-364.

Hussain, I., Siddique, F., Mahmood, M.S., Ahmed, S.I. 2013. A review of the microbiological aspect of α-amylase production. ***International Journal of Agriculture&Biology***, 15(5): 1029-1034.

Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larson, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Dusko, Ehrlich S., Overbeek, R., Kyrpides, N. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. ***Nature*** (London), 423: 87-91.

Jadhav, S.B., Singhal, R.S. 2014. Pullulan complexed α-amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability. ***Carbohydrate Polymers***, 105: 49-56.

Janecek, S. 2005. Amylolytic families of glycoside hydrolases:focus on the family GH-57. ***Biologia Bratislava,*** 16:177-184.

Jaspreet, S.J., Kaurb, L., McCarthy, O.J. 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications A review. ***Food Hydrocolloids***, 21: 1-22.

Jeang, C.L., Chen, L.S., Chen, M.Y., Shiau, R.J. 2002. Cloning of a gene encoding raw-starch-digesting amylase from a *Cytophaga* sp. and its expression in *Escherichia coli*. ***Applied Environmental Microbiology***, 68(7): 3651-3654.

Jegannathan, K.R., Nielsen, P.H. 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production-a literature review. ***Journal of Cleaner Production***, 42: 228-240.

Jeon, E.J., Jung, J.H., Seo, D.H., Jung, D.H., Holden, J.F., Park, C.S. 2014. Bioinformatic and biochemical analysis of a novel maltose-forming α-amylase of the GH57 family in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. CL1. ***Enzyme and Microbial Technology***, 60: 9-15.

Kakeshita, H., Kageyama, Y., Endo, K., Tohata, M., Ara, K., Ozaki, K., Nakamura, K. 2011. Secretion of biologically-active human interferon-β-by *Bacillus subtilis*. ***Biotechnology Letters***, 33(9): 1847-1852.

Kandasamy, N., Velmurugan, P., Sundarvel, A., Raghava, R.J., Bangaru, C., Palanisamy, T. 2012. Eco-bening enzymatic dehairing of goatskins utilizing a protease from a *Pseudomanas fluorescens* species isolated from fish visceral waste. ***Journal of Cleaner Production***, 25: 27-33.

Kang, E.J., Kim, E.S., Lee, J.E., Jhon, D.Y. 2001. Cloning, sequencing, characterization, and expression of a new α-amylase isozyme gene (amy3) from *Pseudomonas* sp. ***Biotechnology Letters***, 23: 811-816.

Karakaş, B., İnan, M., Certel, M. 2010. Epression and characterization of *Bacillus subtilis* PY22 α-amylase in *Pichia pastoris*. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 64: 129-134.

Karoui, H., Bex, F., Greze, P., Couturier, M. 1983. Ham22, a mini-F mutation which is lethal to host cell and promotes *rec*A-dependent induction of lamboid prophage. ***European Molecular Biology Organization Journal***, 2: 1863-1868.

Kelly, R.M., Dijkhuızen, L., Leemhuis, H. 2009. Starch and α-glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution. ***Journal of Biotechnology***, 140: 184-193.

Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. ***KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi,*** 9(1): 12-19.

Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. ***Current Opinion in Biotechnology***, 13: 345-351.

Kolcuoğlu, Y. 2009. Termofilik *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4 suşundan maltojenik amilaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 109.

Konsula, Z., Kyriakides, L.M. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an α-amylase from *Bacillus subtilis*. ***Process Biochemistry***, 39: 1745-1749.

Kuk, S., Erensoy, A. 2008. Gen klonlama, plazmit seçimi ve *Fasciola hepatica* cathepsin L1 uygulamaları. ***Türkiye Parazitoloji Dergisi***, 32(1): 16-22.

Kumar Sen, S., Kumar Dora, T., Das Mahapatrab, P.K., Rauta, S. 2014. Thermostable alpha-amylase enzyme production from hot spring isolates *Alcaligenes faecalis* SSB17 statistical optimization. ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***, Basım aşamasında.

Kumar, A., Singh, S. 2013. Directed evolution: Tailoring biocatalysis for industrial application. ***Critical Reviews in Biotechnology***, 33: 365-378.

Kumari, A., Kritika Singh, K., Kayastha, A.M. 2012. α-Amylase: general properties, mechanism and biotechnological applications – A Review. ***Current Opinion in Biotechnology***, 1: 98-107.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszar, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevdo, V. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. ***Nature*** (London), 390: 249-256.

Kyong Kang, H., Ha Lee, J., Kim, D., F.Day, D., F.Robyt, J., Park, K.H., Moon, T.W. 2004. Cloning and expression *Lipomyces starkeyi* α-amylase in *Escherichia coli* and determination of some of its properties. ***FEMS Microbiology Letters***, 233: 53-64.

Lan Tran, P., Lee, J.S., Park, K.H. 2014. Experimental evidence for a 9-binding subsite of *Bacillus licheniformis* thermostable α-amylase. ***FEBS Letters***. 588: 620-624.

Leveque, E., Haye, B., Belarbi, A. 2000. Cloning and expression of an α-amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaebacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. ***FEMS Microbiology Letters***, 186: 67-71.

Li, S., Zuo, Z., Niu, D., Singh, S., Permaul, K., Prior, B.A., Shi, G., Wang, Z. 2011. Gene cloning, heterologous expression, and characterization of a high maltose-producing α-amylase of *Rhizopus oryzae*. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, 164: 581-592.

Lim, W.J., Park, S.R., An, C.L., Lee, J.Y., Hong, S.Y., Shin, E.C., Kim, E.J., Kim, J.O., Kim, H., Yun, H.D. 2003. Cloning and characterization of a thermostable intracellular α-

amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. ***Research in Microbiology,*** 154: 681-687.

Lin-lin, Z., Qi, W., Rong-xi, L., Yong-jun, W., Ru-hong, M. 2009. Analysis, gene cloning and expression of two α-amylases from *Bacillus cereus*. ***Chinese Journal of Agricultural Biotechnology,*** 6(2): 135-140.

Liu, Y., Lu, F., Chen, G., Snyder, C.L., Sun, J., Li, Y., Wang, J., Xiao, J. 2010. High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium-temperature α-amylase from *Bacillus subtilis*. ***Biotechnology Letters,*** 32: 119-124.

Lods, L.M., Dres, C., Johnson, C., Scholz, D.B., Brooks, G.J. 2001. The future of enzymes in cosmetics. ***International Journal of Cosmetic Science,*** 22: 85-94.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. ***Journal of Bioogical Chemistry,*** 193: 265-275.

Lu, M., Wang, S., Fang, Y., Li, H., Liu, S., Liu, H. 2010. Cloning, expression, purification, and characterization of cold-adapted α-amylase from *Pseudoalteromonas arctica* GS230. ***Protein Journal,*** 29: 591-597.

Mabrouk, S.M., Messaoud, E.B., Ayadi, D., Jemli, S., Roy, A., Mezghani, M., Bejar, S. 2008. Cloning and sequencing of an original gene encoding a maltogenic amylase from *Bacillus* sp. US149 strain and characterization of the recombinant activity. ***Molecular Biotechnology,*** 38: 211-219.

Maktouf, S. 2013. Amylase and lichenase and lichenase activities from a new strain of *Bacillus*: Production in solid medium and characterization. Doktora Tezi, Toulouse Üniversitesi Fransa, 147.

Man, J., Yang, Y., Zhang, C., Zhang, F.,Wang, Y., Gu, M., Liu, Q., Wei, C. 2013. Morphology and structural characterization of high-amylose rice starch residues hydrolyzed by porcine pancreatic α-amylase. ***Food Hydrocolloids***. 31: 195-203.

Mariano Da Silva, S., Koehnlein, E.A., Bracht, A., Castoldi, R., Rodrigues de Morais, G., Baesco, M.L., Peralta, R.A., Marques de Souza, C.G., Babeto de Sa Nakanishi, A., Peralta, R.M. 2014. Inhibition of salivary and pancreatic α-amylases by a pinhao coat *Araucaria angustifolia* extract rich in condensed tannin. ***Food Research International,*** 56: 1-8.

Marmur, J. 1961. A procedure fort he isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism. ***Journal of Molecular Biology,*** 3: 208-218.

Mathur, A., Chand, S. 2011. Cloning and expression of α-amylase gene in *Escherichia coli*: Effect on specific oxygen uptake rate and host cell morphology during batch fermentation. ***Indian Chemical Engineer,*** 53(3): 111-123.

Matsubara, T., Ben Ammar, Y., Anindyawati, T., Yamamoto, S., Ito, K., Iizuka, M., Minamiura, N. 2004. Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of raw starch digesting α-amylase from *Aspergillus awamori* KT-11. ***Journal of Biochemistry and Molecular Biology,*** 37(4): 429-438.

Mobini-Dehkordi, M., Afzal-Javan, F. 2012. Application of alpha-amylase in biotechnology. ***Journal of Biology and today's world,*** 1(1): 39-50.

Mullis, K.B. 1990. Recombinant DNA technology and molecular cloning. ***Scientific American,*** 262: 36.

Muoz, J., Quintero, M., Gutirrez, P.A. 2011. Characterization of the α-amylase gene from *Bacillus* sp. BBM1. ***Vitae Revista De la Facultad de Quimica Farmacutica,*** 279-286.

Nguyen, D., Zhang, X., Jiang, Z., Audet, A., Paice, M.G., Renaud, S., Tsang, A. 2008. Bleaching of craft pulp by a commercial lipase; accessory enzymes degrade hexenuronic acids. ***Enzyme and Microbial Technology,*** 43: 130-136.

Nielsen, J.E., Borchert, T.V. 2000. Protein engineering of α-amylase. ***Biochimica et Biophysica Acta,*** 1543: 253-274.

Novozymes AS: Annual report 4th edition. 2013. Final editing Damhus T., Kaasgaard S., Olsen H.S. all of Novozymes A/S. Denmark.

Okafor, N. 2007. Modern İndustrial Biology and Biotechnology, Springer. 551. USA.

Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., Di Novi, M.J. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms a review. ***Regulatory Toxicology and Pharmacology,*** 45: 144-158.

Özcan, N., Altınalan, A. 2001. Molecular cloning of an α-amylase gene from *Bacillus subtilis* RSKK246 and its expression in *Escherichia coli* and in *Bacillus subtilis*. ***Turkish Journal of Veterinary and Animal Science,*** 25: 197-201.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases (review article). ***Biotechnology and Applied Biochemistry,*** 31: 135-152.

Polaina, J., MacCabe, A.P. 2007. Industrial Enzymes Structure, Function and Applications. Springer. 651. Netherlands.

Qin, Y., Huang, Z., Liu, Z. 2014. A novel cold-active and salt-tolerant α-amylase from marine bacterium *Zunongwangia profunda*: molecular cloning, heterologous expression and biochemical characterization. ***Extremophiles,*** 18: 271-281.

Rabbani, M., Sadeghi, H.M., Moazen, F., Rahimi, M., Salehi, G. 2011. Cloning and expression of randomly mutated *Bacillus subtilis* α-amylase genes in HB101. ***Biotechnology Research International,*** Article ID 305956.

Reyes-Sosa, F.M., Molina-Heredia, F.P., De la Rosa, M.A. 2010. A novel α-amylase from the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7119. ***Applied Microbiology and Biotechnology,*** 86: 131-141.

Roy, J.K., Borah, A., Lata Mahanta, C., Mukherjee, A.K. 2013. Cloning and overexpression of raw starch digesting α-amylase gene from *Bacillus subtilis* strain AS01a in *Escherichia coli* and application of the purrified recombinant α-amylase (AmyBS-I) in raw starch digestion and baking industry. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,*** 97: 118-129

Sabale, A.G., Rane, V.M. 2012. Enzymes: for today and tomorrow. ***Chemical Business,*** 26(7): 38-44.

Saha, B.C., Jordan, D.B., Bothast, R.J. 2009. Encyclopedia of Microbiology Enzymes, Industrial. Elsevier. 361. USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: Laboratory manual, second edition. 1448. (New York: Cold Spring Harbor Lab. Press). USA.

Sarıkaya, Demirkan E., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., Utsumi, S. 2005. α-Amylase from *B. amyloliquefaciens*, purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. ***Process Biochemistry,*** 40: 2629-2636.

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

Sengupta, S., Dasgupta, M. 2006. Enzymology, industrial and clinical applications excluding diagnostic clinical enzymology. 1-25. India.

Sharma, A., Satyanarayana, T. 2013. Microbial acid-stable α-amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. ***Process Biochemistry,*** 48: 201-211.

Sidkey, N.M., Maha, A., Reham, B., Reham, S., Ghadeer, B. 2011. Purification and characterization of α-amylase from a newly isolated *Aspergillus flavus* F2Mbb. ***International Research Journal of Microbiology,*** 2: 96-103.

Singh Nigam, P. 2013. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. ***Biomolecules,*** 3: 597-611.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Madhavan, K., Soccol, C.R., Pandey, A. 2006. α-Amylases from microbial sources an overview on recent developments. ***Food Technology and Biotechnology,*** 44: 173-184.

Soaeres, J.C., Moreira, P.R., Queiroga, C., Morgado, J., Malcata, F.X., Pintado, M.E. 2011. Application of immobilized enzyme technologies for the textile industry: a review. ***Biocatalysis and Biotransformation,*** 29(6): 223-237.

Soetaert, W., Vandamme, E.J. 2010. The scope and impact of industrial biotechnology. ***Industrial Biotechnology,*** 1-16.

Souza, P.M., Magalhaes, P.O., 2010. Application of Microbial α-amylase in industry a review. ***Brazilian Journal of Microbiology,*** 41: 850-861.

Steen, J., 2006. The general stress response in *Bacillus subtilis.* A research project.

Studier, W.F., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct the expression of cloned genes. ***Methods in Enzymology,*** 185: 60-69.

Sumitani, J.I., Nagae, H., Kawaguchi, T., Arai, M. 1998. *Bacillus* animal type α-amylase: Cloning and sequencing of the gene and comparison of the deduced amino acid sequence with that of other amylases. ***Journal of Fermentation and Bioengineering,*** 85(4): 428-432.

Sun, Q., Gong, M., Li, Y., Xiong, L. 2014. Effect of retrogradation time on preparation and characterization of proso millet starch nanoparticles. ***Carbohydrate polymers,*** 111: 133-138.

Synowiecki, J., Grzybowska, B., Zdzieblo, A. 2006. Sources, properties and suitability of new thermostable enzymes in food processing. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition,*** 46: 197–205.

Taniguchi, H., Honnda, Y. 2009. Industrial Amylases. ***Applied Microbiology,*** 159-173.

Tao, X., Jang, M.S., Kim, K.S., Yu, Z., Lee, Y.C. 2008. Molecular cloning, expression and characterization of α-amylase gen from a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp MY-1. ***Indian Journal of Biochemistry and Biophysics,*** 45: 305-309.

Tuzlakoglu Ozturk, M., Akbulut, N., Issever Ozturk, S., Gumusel, F. 2013. Ligase-independent cloning of amylase gene from a local *Bacillus subtilis* isolate and biochemical characterization of the purified enzyme. ***Applied Biochemistry and Biotechnology,*** 171: 263-278.

Uçan, F., Akyildiz, A. 2012. Meyve Suyu Sanayinde Enzimatik Uygulamalar. ***Gıda,*** 37(6): 363-370.

Van deer Maarel, M.J.E.C., van Deer Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. 2002. Properties and application of starch converting enzymes of the α-amylase family. ***Journal of Biotechnology,*** 94: 137-155.

Vengadaramana, A. 2013. Industrial important microbial alpha-amylase on starch-converting process. ***Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP),*** 2(3): 209-221.

Walsh, G. 2002. Proteins: Biochemistry and Biotechnology, John Wiley&Sons Baffins Lane, West Sussex, England.

Wang, G.J., Wang, Z.S., Zhang,Y.W., Zhang, Y.Z. 2012. Cloning and expression of amyE gene from *Bacillus subtilis* in *Zymomonas mobilis* and direct production of ethanol from soluble starch. ***Biotechnology and Bioprocess Engineering,*** 17: 780-786.

Wang, L., Zhou, Q., Chen, H., Chu, Z., Lu, J., Zhang, Y., Yang, S. 2007. Efficient solubilization, purification of recombinant extracellular α-amylase from *Pyrococcus furiosus* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,*** 34: 187-192.

Westers, L., Westers, H., Quax, W.J., 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. ***Biochimica et Biophysica Acta,***1694:299-310.

Wong, D.W.S., 2006. The ABC's of Gene Cloning. Springer. 227. USA.

Wong, S.L., 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. ***Current Opinion in Biotechnology,*** 6: 517-522.

Wu, B., Hu, G.K., Feng, H., Wu, J.M., Zhang, Y.Z., 2007. Cloning and expression of an α-amylase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. ***Current Microbiology,*** 55: 105-113.

Xie, F., Quan, S., Liu, D., Ma, H., Li, F., Zhou, F., Chen, G. 2014. Purification and characterization a novel α-amylase from a nevly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. ***Process Biochemistry,*** 49: 47-53.

Xu, J., Wang, Q., Bashari, M., Chen, F., Wang, P., Cui, L., Yuan, J., Xu, X., Fan, X. 2014. Branched limit dextrin impact on wheat and waxy starch gels retrogradation. ***Food Hydrocolloids,*** 39: 136-143.

Yamaguchi, R., Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arakawa, T., Tokunaga, M. 2011. Salt-dependent thermo-reversible α-amylase: cloning and characterization of halophilic α-amylase from moderately halophilic bacterium, *Kocuria varians.* ***Applied Microbiology and Biotechnology,*** 89: 673–684.

Yang, C.H., Huang, Y.C., Chen, C.Y., Wen, C.Y. 2010. Expression of *Thermobifida fusca* thermostable raw starch digesting alpha-amylase in *Pichia pastoris* and its application in raw sago starch hydrolysis. ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,*** 37: 401-406.

Yang, C.H., Liu, W.H. 2007. Cloning and characterization of a maltotriose-producing α-amylase gene from *Thermobifida fusca*. ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,*** 34: 325-330.

Yang, H., Liu, L., Shin, H.D., Jianghua Li, R.R., Du Chen, G., Chen, J. 2013. Comparative analysis of heterologous expression. Biochemical characterization optimal production of an alkaline α-amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. ***Biotechnology Progress,*** 29: 39-47.

Yin, X.H., Gagnat, J., Gerbaud, C., Guerineau, M., Virolle, M.J. 1997. Cloning and characterization of a new α-amylase gene from *Streptomyces lividans* TK24. ***Gene,*** 197: 37-45.

Zhang, J., Zeng, R. 2011. Molecular cloning and expression of an extracellular α-amylase gene from an Antarctic deep sea psychrotolerant *Pseudomonas stutzeri* strain 7193, ***World Journal of Microbiology and Biotechnology,*** 27: 841-850.

Zhu, D., Wu, Q., Wang, N. 2011. Industrial enzymes. ***Comprehensive Biotechnology,*** 3: 3-13.

EKLER

Ek-1. Primer Sentez Raporu

eurofins mwg|operon

Oligonucleotide Synthesis Report

Lund University
Dept Biology

Order ID: 3025239
Customer ID: 924953

Order Date: 26.06.2013
Lab No.: 3185
No. of Oligos: 2/2

Eurofins MWG Operon
Anzingerstraße 7a
D- 85560 Ebersberg

No.	Oligo Name	Sequence (5' -> 3')	Yield [OD]	Yield [µg]	Yield [nmol]	Concentration [pmol/µl]	Vol. for 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Content	Synthesis Scale	Purification	Modification	Barcode IDO	QC Report
1	AmyE Frw	AAG CTT AAG GAG GTG ATC TAG ATG TTT GCA AAA CGA TTC AAA ACC TC (47)	12.9	341	23.5	-	235	71.2	14518	38.3 %	0.01 µmol	HPSF	-	016456094	-
2	Amy Rev	GCATGCTCAATGGGGAA GAGAACCGCTT (28)	7.6	206	23.8	-	238	68.0	8662	53.6 %	-	-	-	016456095	MALDI

Ek-2. Ligasyon Hesaplamaları

$\frac{C1}{bç1} = \frac{C2}{bç2}$

$\frac{ng1}{bç1} = \frac{ng2}{bç2}$

C	: konsantrasyon
bç	: baz çifti
ng	: nanogram

$\frac{22}{8274} = \frac{X}{1980}$

Klon (8) konsantrasyon: 33.48 ng/µL

$\frac{\text{Klon gen}}{\text{Klon8}} = \frac{5.26}{33.48} =$ **0.157 µL**

Klon 8 için ligasyon hesaplamaları			
1 µL pDG148 için		**2 µL pDG148 için**	
1:1 için	V1 = 0.157 µL	1:1 için	V1x2 = 0.157x2 = 0.31 µL
1:3 için	V3 = 0.47 µL	1:3 için	V3x2 = 0.47x2 = 0.94 µL
1:5 için	V5 = 0.79 µL	1:5 için	V5x2 = 079x2 = 1.58 µL

Klon 8 için reaksiyon bileşenleri ve ligasyon hesap oranları				
Reaksiyon Bileşenleri	**1:0 oran**	**1:1 oran**	**1:3 oran**	**1:5 oran**
Steril distile su	6.5 µL	6.2 µL	5.5 µL	4.9 µL
amyE klon 8	-	0.3 µL	1 µL	1.6 µL
pDG148	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Ligaz tamponu	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Ligaz	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Toplam	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Klon 7 konsantrasyon: 28.23 ng/µL

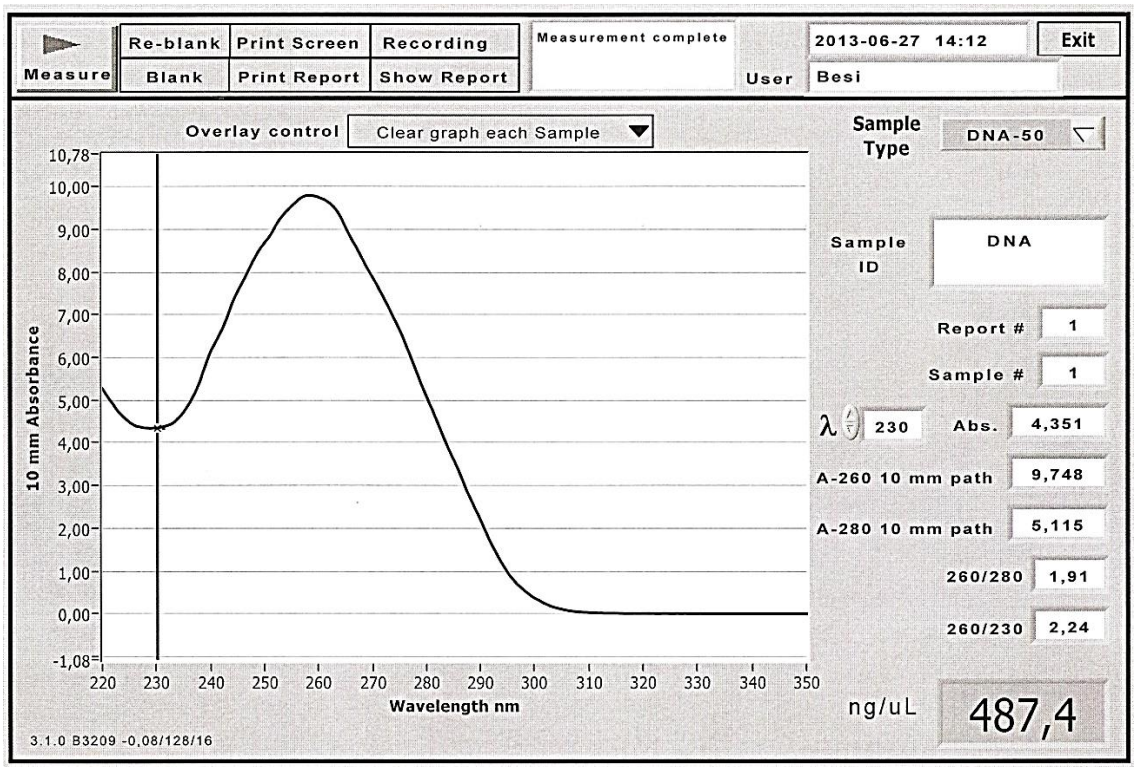
Klon gen = 5.26 = **0.186 µL**

Klon7 28.23

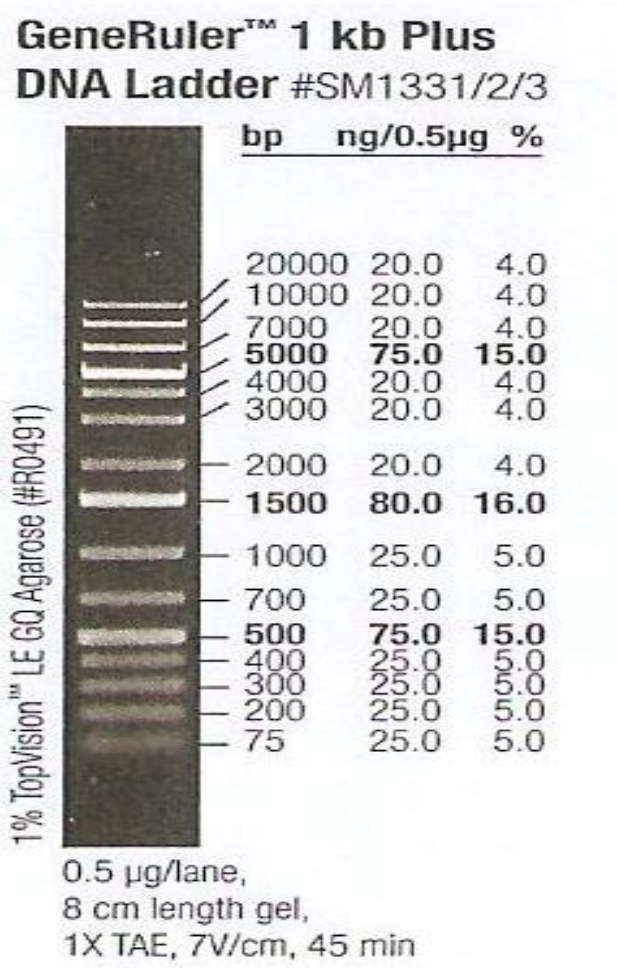
Klon 7 için ligasyon hesaplamaları			
1 µL pDG148 için		**2 µL pDG148 için**	
1:1 için	V1 = 0.186 µL	1:1 için	V1x2 = 0.186x2 = 0.37 µL
1:3 için	V3 = 0.558 µL	1:3 için	V3x2 = 0.558x2 = 1.11 µL
1:5 için	V5 = 0.93 µL	1:5 için	V5x2 = 0.930x2 = 1.86 µL

Klon 7 için reaksiyon bileşenleri ve ligasyon hesap oranları				
Reaksiyon Bileşenleri	**1:0 oran**	**1:1 oran**	**1:3 oran**	**1:5 oran**
Steril distile su	6.5 µL	6.1 µL	5.4 µL	4.6 µL
amyE klon 8	-	0.4 µL	1.1 µL	1.9 µL
pDG148	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Ligaz tamponu	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Ligaz	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Toplam	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

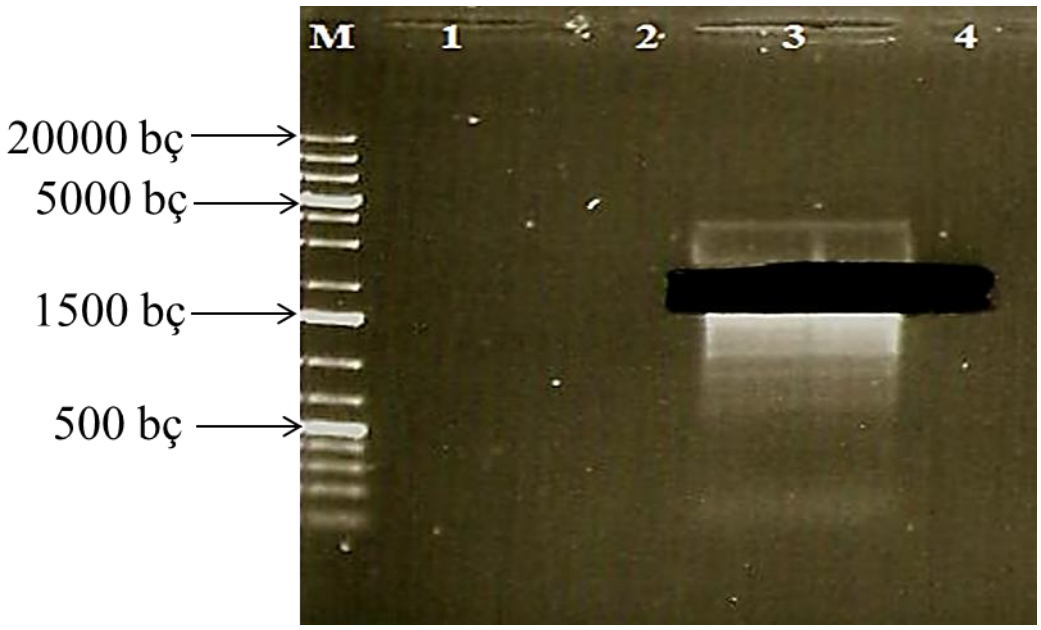
Ek-3. *Bacillus subtilis* Genomik DNA'sının Nanodrop Sonucu



Ek-4. DNA Belirteci

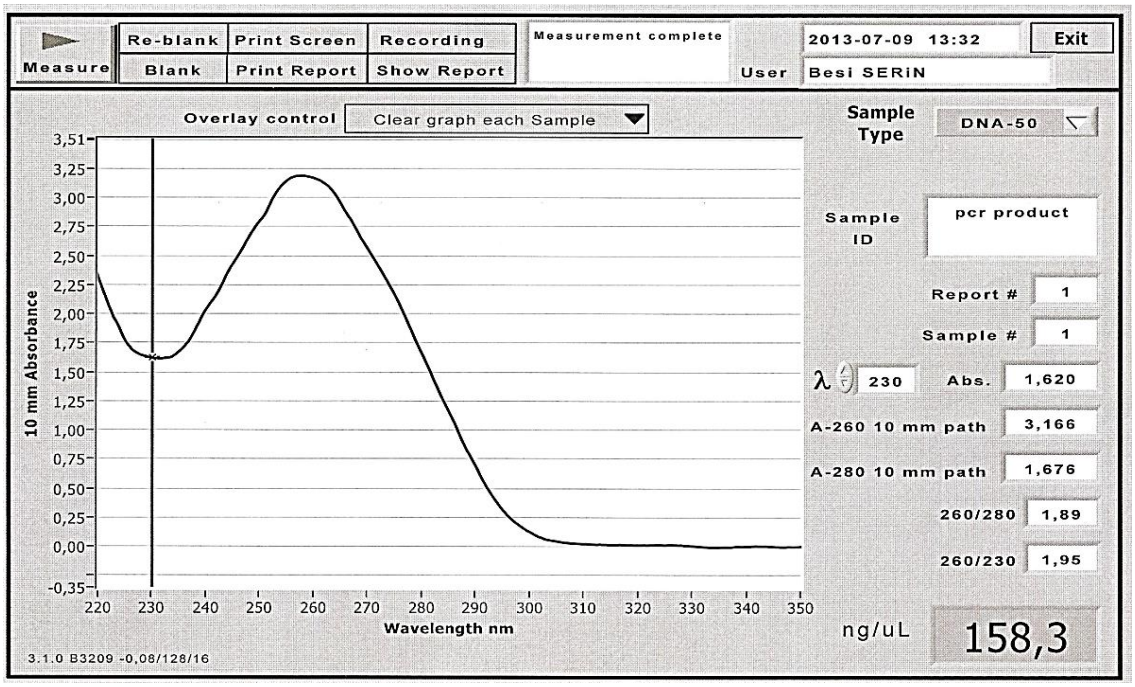


Ek-5. PCR Ürününün Jelden Kesimi

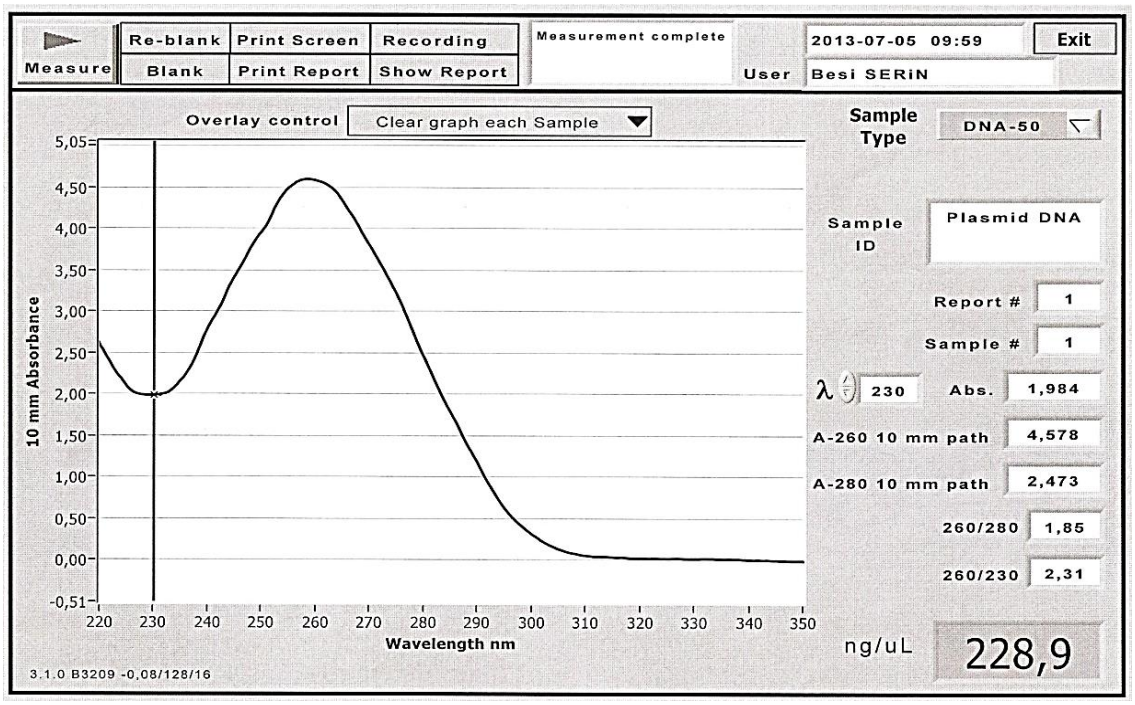


M.Marker, 3. PCR ürünü (jelden kesilmiş hali), 1, 2 ve 4. Boş kuyucuklar

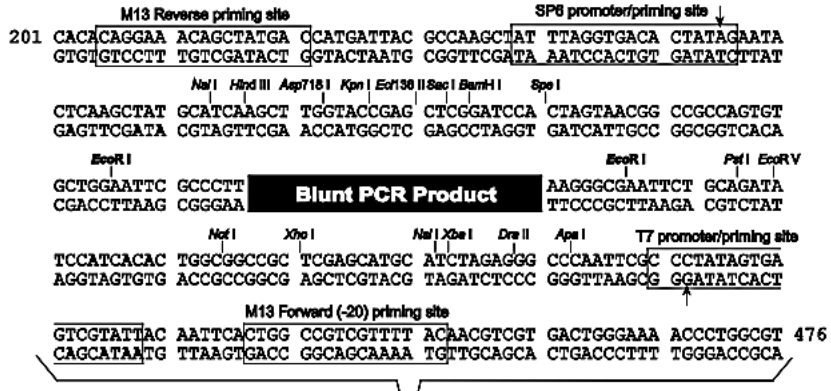
Ek-6. PCR Ürününün Nanodrop Sonucu



Ek-7. pDG148'in Nanodrop Sonucu

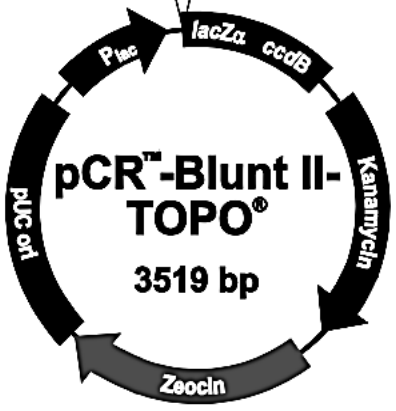


Ek-8. pCR Blunt II TOPO Gen Dizilimi

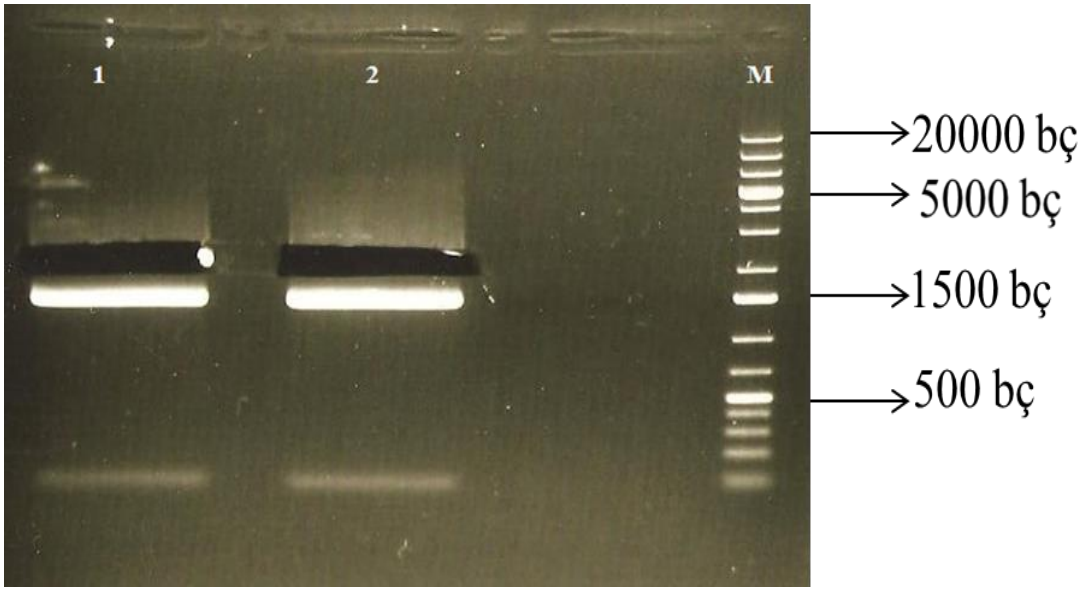


Comments for pCR™-Blunt II-TOPO®
3519 nucleotides

lac promoter/operator region: bases 95-216
M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZ-alpha ORF: bases 217-576
SP6 promoter priming site: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-399
TOPO®-Cloning site: bases 336-337
T7 promoter priming site: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
Fusion joint: bases 577-585
ccdB lethal gene ORF: bases 586-888
kan gene: bases 1099-2031
kan promoter: bases 1099-1236
Kanamycin resistance gene ORF: bases 1237-2031
Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
pUC origin: bases 2724-3397



Ek-9. pCR TOPO-amyE Klonlarının Jelden Kesimi



M. Marker, **1.** 7.klon, **2.** 8.klon

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Besi SERİN

Doğum tarihi ve yeri : 17.12.1978/ Diyarbakır

Elektronik posta adresi : beserin@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ		
Eğitim Derecesi	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Yılı**
Doktora	Dicle Ünv./ Fen Bilimleri Enstitüsü	2014
Yüksek Lisans	Dicle Ünv./ Fen Bilimleri Enstitüsü	2009
Lisans	Dicle Ünv./ Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği	2001

İŞ DENEYİMİ		
Görev	**Yer**	**Yıl**
Lab.Tek	D.Bakır Çüngüş Merkez Sağlık Ocağı	2001
Lab.Tek	D.Bakır Devlet Hastanesi	2002
Lab.Tek	D.Bakır 450 Evler Sağlık Ocağı	2003-2009
Lab.Tek	D.Bakır Kadın Doğum ve Çocuk Hast.	2009-halen

YURTİÇİ / YURTDIŞI AKADEMİK DENEYİM		
Eğitim Konusu	**Kurum**	**Yıl**
Gen Klonlama	Lund University, Faculty of Science, Molecular Cell Biology, Lund/SWEDEN	16 Nisan-16 Temmuz 2013
Mikrorganizma Moleküler Genetik Uygulamaları Eğitimi	TÜBİTAK MAM GMBAE Gebze/TÜRKİYE	04-08 Temmuz 2011

PROJE BİLGİLERİ		
Projenin Adı	**Destekleyen Kuruluş**	**Yıl**
SSF Tekniğiyle *Bacillus circulans*'tan α-amilaz ve β-galaktozidaz Üretimi (Yüksek Lisans Projesi)	BAP (08 FF 23)	2008-2009
Bacillus subtilis ATCC 6051'den α-Amilazın Klonlanması ve Karakterizasyonu (Doktora Projesi)	DÜBAP (13 FF 45)	2012-2013

Yayınlar

1.N. Akcan, **B. Serin**, and F. Uyar, 2012. Production and optimization parameters of amylases from *Bacillus subtilis* RSKK96 under solid state fermentation. Chem. Biochem. Eng. 26(3) 233-239.

2. Serin. B., Akcan. N., Uyar. F., 2012. Production and optimization of α-amylase from *Bacillus circulans* ATCC 4516 with solid state fermentation. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, Volume:40 No:4.

Bildiriler

1. B Serin, N Akcan, H Alkan, F Uyar, Z Baysal. " Katı faz fermentasyon tekniği ile *Bacillus circulans*'tan α-amilaz ve β-galaktozidaz üretimi" 24. Ulusal Kimya Kongresi, BP011 29 Haziran-2 Temmuz Zonguldak, 2010. ("Production of α-amylase and β-galactosidase from *Bacillus circulans* with Solid State Fermentation, 24. National Chemistry Congress, 29 June- 2 July, Zonguldak TURKEY, 2010")

2. Akcan N., **Serin B**., Baysal Z., Uyar F. "Katı Faz Fermantasyon Tekniği ile *Bacillus subtilis* RSKK96'dan α-Amilaz ve Proteaz Üretimi" 2. Ulusal Katı Atık Yönetim Kongresi, pp:338-344, 18-20 Ekim Mersin 2010. ("Production of α-amylase and protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with Solid State Fermentation, 2. National Solid Waste Administration Congress, pp:338-344, 18-20 October, Mersin, TURKEY, 2010")

3. Akcan N., **Serin B**., Baysal Z., Uyar F. "Tarımsal Atıklar Kullanılarak Katı Faz Fermantasyon Tekniği (KFF) ile Enzim Üretimi" 2. Ulusal Katı Atık Yönetim Kongresi, pp:328-337, 18-20 Ekim Mersin 2010. ("Production of Enzyme Use of Agricultural Waste with Solid State Fermentation, 2. National Solid Waste Administration Congress, pp:328-337, 18-20 October, Mersin, TURKEY, 2010")