

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***Lactococcus lactis*'TE 4,6 ALFA-GLUKANOTRANSFERAZ**  
**ENZİMİNİN HÜCRE DIŞI REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYŞE BIYIKLI**

**DENİZLİ, AĞUSTOS - 2020**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



*Lactococcus lactis*'te 4,6 ALFA-GLUKANOTRANSFERAZ  
ENZİMİNİN HÜCRE DIŞI REKOMBİNANT ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE BIYIKLI

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2020

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Ayşe BIYIKLI tarafından hazırlanan “*Lactococcus lactis*’te 4,6 Alfa-Glukanotransferaz Enziminin Hücre Dışı Rekombinant Üretimi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20.08.2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Üye  
Prof. Dr. Sebahattin NAS

Üye  
Doç. Dr. Enes DERTLİ

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 218O003 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**AYŞE BIYIKLI**

## ÖZET

### ***Lactococcus lactis*'te 4,6 ALFA-GLUKANOTRANSFERAZ ENZİMİNİN HÜCRE DIŞI REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE BIYIKLI

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŐMANI: DOÇ.DR. ÖMER ŞİMŞEK)

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2020

Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından sentezlenen, GH70 enzim ailesi içinde karakterize edilmiş enzim olan 4,6  $\alpha$ -glukanotransferazlar (4,6-AGTaz), dünyada karbonhidrat kaynağı olarak selülozdan sonra en fazla miktarda bulunan nişasta ve maltodekstrinler üzerinde katalitik etkiye sahip olması aÇısından son yıllarda önem kazanmıştır. Bunun yanı sıra 4,6-AGTaz enziminin nişasta üzerindeki spesifik katalitik etkisinin olması teknolojik aÇıdan fonksiyonel amağlı kullanılabilceğini de göstermektedir.

Yapılan bu ĐalıŐmada 4,6-AGTaz enziminin heterolog hücre dışı rekombinant üretilmesi ve elde edilen enzimin aktivitesinin tespiti amaĐlanmıŐtır. Bu amaÇ doğrultusunda *Lactobacillus reuteri* E81 suş genomunda 4,6-AGTaz enzimini kodlayan *gtfB* (4860 bĐ) geni, eritromisin direnĐlilik geni ve *usp45* sinyal serisini iÇeren pLEB825 plazmidine PnisA promotörü altına yerleŐecek Đekilde eklenmiŐtır. Elde edilen rekombinant plazmidin *Lactococcus lactis* NZ9000'e elektroporasyonu başarılı bir Đekilde gerĐekleŐtirilmiŐtır. 4,6-AGTaz enziminin ilk defa *Lactococcus lactis*'te *in vitro* üretimi, elde edilen rekombinant suş *Lactococcus lactis* PLAC39 ile başarılmıştır.

Hücre dışı üretilen 4,6-AGTaz enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık 160 kDa olduğu tespit edilmiŐtır. Saflaştırılan 4,6-AGTaz enziminin bulunduğu reaksiyonlarda maltodekstrin ve amiloz substratları varlığında ĐeŐitli oligosakkaritlerinin oluştuğu ancak söz konusu enzimin maltoz ile reaksiyonları sonrasında Đok ĐeŐitli  $\alpha$ -glukan yapılarının oluŐmadıĐı TLC analizinde gözlemlenmiŐtır.

SonuÇ olarak, 4,6-AGTaz enziminin endüstriyel üretimde kullanılmak üzere gıda güvenli üretici rekombinant *Lactococcus lactis* suşunun eldesi sağlanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELEER:** 4,6  $\alpha$ -Glukanotransferaz, *Lactococcus lactis*, heterolog hücre dışı üretim, klonlama, nişasta.

## ABSTRACT

### EXTRACELLULAR RECOMBINANT PRODUCTION OF 4,6 ALPHA- GLUCANOTRANSFERASE ENZYME IN *Lactococcus lactis*

MSC THESIS

AYSE BIYIKLI

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. OMER SIMSEK)

DENİZLİ, AUGUST 2020

The enzyme 4,6  $\alpha$ -glucanotransferases (4,6-AGTase), which is characterized in the GH70 enzyme family synthesized by lactic acid bacteria (LAB), has gained importance in recent years in terms of its catalytic effect on starch and maltodextrins, which are the most carbohydrate source in the world, after cellulose. In addition, the fact that 4,6-AGTase enzyme has a specific catalytic effect on starch shows that it can be used technologically for functional purposes. In this study, it was aimed to produce heterologous extracellular recombinant of 4,6-AGTase enzyme and to determine the activity of the obtained enzyme. For this purpose, firstly, the *gtfB* gene (4860 bp) encoding the 4,6-AGTase enzyme in the *Lactobacillus reuteri* E81 strain genome was inserted into the pLEB825 plasmid containing the erythromycin resistance gene and the *usp45* signal sequence, located under the PnisA promoter. Electroporation of the obtained recombinant plasmid to *Lactococcus lactis* NZ9000 has been successfully performed. The *in vitro* production of 4,6-AGTase enzyme in *L. lactis* was achieved for the first time with the obtained recombinant strain *Lactococcus lactis* PLAC39.

The molecular weight of the extracellular 4,6-AGTase enzyme was found about 160 kDa. In the reactions involving the purified 4,6-AGTase enzyme, it was observed in TLC analysis that various oligosaccharides were formed in the presence of maltodextrin and amylose substrates, but no various  $\alpha$ -glucan structures were formed after the reaction of the enzyme with maltose.

As a result, a food-safe producer of recombinant *Lactococcus lactis* strain was obtained for use in industrial production of 4,6-AGTase enzyme.

**KEYWORDS:** 4,6  $\alpha$ -Glucanotransferase, *Lactococcus lactis*, heterologous extracellular enzyme production, cloning, starch.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	v
TABLO LİSTESİ .....	vi
SEMBOL LİSTESİ .....	vii
KISALTMA LİSTESİ .....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	2
1.2 Literatür Özeti .....	3
1.2.1 Laktik Asit Bakterileri .....	3
1.2.2 Glukansükrazlar .....	4
1.2.3 Glukansükraz Proteinlerinin Yapısı ve Etki Mekanizmaları .....	6
1.2.4 Nişasta Etkili Enzimler; Glukanotransferazlar .....	11
1.2.5 Glukanotransferazların Nişasta Üzerine Etkisi ve Oluşan Oligosakkaritlerin Fonksiyonel Özellikleri .....	17
1.2.6 <i>Lactococcus lactis</i> ve Heterolog Protein Üretimi .....	19
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>23</b>
2.1 Materyal.....	23
2.1.1 Bakteri Suşları, Plazmidler ve Kültür Ortamları .....	23
2.2 Yöntem .....	25
2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu .....	25
2.2.2 Plazmid İzolasyonu .....	25
2.2.3 Primerler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonları .....	26
2.2.4 Restriksiyon Endonükleaz, Fosfolizasyon ve Ligaz Uygulamaları .....	28
2.2.4.1 pLEB 124 vektörü .....	28
2.2.4.2 pLEB 825 Vektörü .....	29
2.2.4.3 Vektör Defosforilasyonu .....	29
2.2.4.4 Ligasyon.....	30
2.2.5 Koloni Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	30
2.2.6 DNA Saflaştırma İşlemi.....	31
2.2.7 Kompetent <i>E. coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması.....	32
2.2.8 Rekombinant Plazmidlerin <i>E. coli</i> Hücrelerine Elektroporasyonu .....	33
2.2.9 Kompetent <i>L. lactis</i> Hücrelerinin Hazırlanması .....	33
2.2.10 Rekombinant Plazmidlerin <i>L. lactis</i> Hücrelerine Elektroporasyonu .....	34
2.3 Rekombinant Plazmid İçeren Hücrelerden Protein Ekspresyonu ve Ekstraksiyonu .....	35
2.4 4,6 $\alpha$ -Glukanotransferaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	36
2.5 Rekombinant Proteinlerin SDS-PAGE İle Belirlenmesi.....	36
2.6 Rekombinant Proteinlerin Western-Blot Yöntemi ile Doğrulanması .....	37



<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>39</b>
3.1 <i>L. reuteri</i> E81'den <i>gtfB</i> Geninin Klonlanması .....	39
3.1.1 Strateji 1: pLEB825 Vektörüne <i>gtfB</i> Geninin Klonlanması .....	39
3.1.2 Protein Ekspresyonunda Kullanılan Plazmidlerin Oluşturulması.....	43
3.1.3 Strateji 2: pLEB124 Vektörüne <i>gtfB</i> Geninin Klonlanması .....	45
3.2 <i>Lactococcus lactis</i> NZ9000'de Eksprese Edilen Proteinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi .....	47
3.3 <i>L. lactis</i> PLAC39 Tarafından <i>in vitro</i> Üretilen GtfB Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi.....	48
3.4 <i>L. lactis</i> PLAC39 Suşu Tarafından <i>in vitro</i> GtfB Enzimi Üretiminin Gösterilmesi .....	49
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>51</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b> .....	<b>53</b>
<b>6. EKLER</b> .....	<b>62</b>
EK A. <i>L. reuteri</i> E81'de Tanımlanan <i>gtfB</i> Gen Bölgesinin Sekansı .....	62
<b>7. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>65</b>

# ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa

Şekil 1.1: Glukansükrazların temel yapısal organizasyonu .....	6
Şekil 1.2: <i>Lactobacillus reuteri</i> 180'de tanımlanan Gtf180-ΔN'nin kristal yapısı .....	7
Şekil 1.3: Glukansükraz topoloji diyagram modelleri .....	8
Şekil 1.4: α-Amilaz, 4,6 α-glukanotransferaz ve glukansükraz arasındaki evrimsel ilişki .....	15
Şekil 1.5: 4,6 α-Glukanotransferazların reaksiyon yolları .....	16
Şekil 1.6: NICE sisteminin şematik gösterimi .....	21
Şekil 3.1: <i>Lactobacillus reuteri</i> E81 genomundan <i>gtfB</i> geninin ampfliye edilmesini gösteren agaroz jel görüntüsü .....	39
Şekil 3.2: PZR ile ampfliye edilen lineer pLEB825 vektörünün agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 3.3: Koloni PZR ile <i>Lactococcus lactis</i> hücrelerinden elde edilen pozitif kolonilerin agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 3.4: GtfB_R ve Erm_F primerleri kullanılarak PZR ile ampfliye edilen lineer vektörün agaroz jel görüntüsü .....	41
Şekil 3.5: PnisA promotörü ve <i>usp45</i> sinyal serisinin ve Loop_R ve GtfB_F primerleri kullanılarak PZR sonucu elde edilen lineer vektörün agaroz jel görüntüsü .....	42
Şekil 3.6: Koloni PZR ile <i>Lactococcus lactis</i> hücrelerinden elde edilen pozitif kolonilerin agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 3.7: PnisA promotörüne ters yönde <i>gtfB</i> genini içeren vektörün şematik gösterimi.....	43
Şekil 3.8: Ligasyon sonrası elde edilen indüklenebilir PnisA promotörü ile GtfB enzim üretim vektörünün şematik gösterimi.....	44
Şekil 3.9: pLEB124 vektörünün <i>HindIII</i> ve <i>ApaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen lineer vektörün ve pLEB124 vektörünün ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüsü .....	45
Şekil 3.10: <i>Lactobacillus reuteri</i> E81'den elde edilen <i>gtfB</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	45
Şekil 3.11: pLEB597 plazmidinden elde edilen <i>usp45</i> sinyal serisinin agaroz jel görüntüsü.....	46
Şekil 3.12: Rekombinant proteinlerin SDS-PAGE ile belirlenmesi .....	48
Şekil 3.13: <i>Lactococcus lactis</i> PLAC39 suşu tarafından üretilen GtfB enziminin amiloz, maltodekstrin ve maltoz üzerindeki aktivitelerini gösteren TLC görüntüsü .....	49
Şekil 3.14: <i>Lactococcus lactis</i> PLAC39 suşunun ürettiği GtfB enziminin varlığını gösteren Western-Blot görüntüsü .....	50

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler .....	24
Tablo 2.2: PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler .....	27
Tablo 2.3: <i>gtfB</i> geninin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR bileşimi .....	28
Tablo 2.4: <i>gtfB</i> geninin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR şartları .....	28
Tablo 2.5: Restriksiyon enzimleri ve kesim işlemleri için kullanılan reaksiyon ortamı .....	29
Tablo 2.6: Vektör defosforilasyonu için kullanılan reaksiyon bileşimi .....	30
Tablo 2.7: Ligasyon işlemi için hazırlanan reaksiyon ortamı .....	30
Tablo 2.8: Koloni PZR için kullanılan reaksiyon ortamı .....	31
Tablo 2.9: Koloni PZR için kullanılan PZR şartları .....	31
Tablo 2.10: SOC ortamı bileşimi .....	33
Tablo 2.11: <i>Lactococcus lactis</i> hücrelerine elektroporasyon boyunca kullanılan solüsyonlar ve içerikleri .....	34

## SEMBOL LİSTESİ

<b>%</b>	:	Yüzde
<b><math>\alpha</math></b>	:	Alfa
<b><math>\mu</math>g</b>	:	Mikrogram
<b><math>\mu</math>L</b>	:	Mikrolitre
<b>Da</b>	:	Dalton
<b>g</b>	:	Gram
<b>kg</b>	:	Kilogram
<b>mL</b>	:	Mililitre
<b>L</b>	:	Litre
<b>M</b>	:	Molarite
<b>nM</b>	:	Nanomolar
<b>mM</b>	:	Milimolar
<b>rpm</b>	:	Dakikadaki Dönüş Sayısı
<b>s</b>	:	Saniye
<b>dk</b>	:	Dakika
<b>sa</b>	:	Saat
<b>OD</b>	:	Optik Yoğunluk
<b>T<sub>m</sub></b>	:	Çözülme Sıcaklığı
<b>U</b>	:	Ünite
<b>V</b>	:	Volt

## KISALTMA LİSTESİ

<b>bç</b>	:	Baz Çifti
<b>DNA</b>	:	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EPS</b>	:	Ekzopolisakkarit
<b>Ery</b>	:	Eritromisin
<b>FDA</b>	:	Gıda ve İlaç Dairesi
<b>GH13</b>	:	Glikozidik Hidrolaz 13
<b>GH70</b>	:	Glikozidik Hidrolaz 70
<b>GRAS</b>	:	Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen
<b>GS</b>	:	Glukansükraz
<b>GTs</b>	:	Glukanotransferazlar
<b>HPLC</b>	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>LAB</b>	:	Laktik Asit Bakterileri
<b>MRS</b>	:	de Man, Rogosa and Sharpe
<b>PZR</b>	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	:	Ribo Nükleik Asit
<b>TLC</b>	:	İnce Tabaka Kromatografisi
<b>TAE</b>	:	Tris-Asetat-EDTA
<b>UV</b>	:	Ultraviyole
<b>IPTG</b>	:	izopropil $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranosid

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimin boyunca desteğini hep hissettiğim, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, bilimsel anlamda bilgi birikimini asla esirgemeyen, akademisyenlik yolunda ilerlemem konusunda bana rol model olan ve çalışmalarım esnasında göstermiş olduğu sonsuz hoşgörü ve sabrından dolayı değerli danışman hocam Doç.Dr. Ömer ŞİMŞEK'e,

Tüm çalışmalarımda; maddi manevi desteğini hiç esirgemeyen, varlığıyla beni cesaretlendiren, koşulsuz destekçim Gıda Müh. Ramazan NİÇİN'e,

Bu tez çalışmasına değer verip, çalışmayı destekleyen TÜBİTAK'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca tecrübelerini ve bilgilerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Enes DERTLİ'ye, Öğr. Gör. Hümeysra İSPİRLİ'ye, Arş. Gör. Duygu ZEHİR ŞENTÜRK'e ve ekip arkadaşlarıma,

Son olarak bu günlere gelmemde emeği çok büyük ve attığım her adımda arkamda olan sevgili annem Melahat BIYIKLI, babam Yılmaz BIYIKLI ve kardeşim Cennet BIYIKLI'ya,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

Medeniyetin başlangıcından itibaren insanlar tarafından en yüksek miktarda tüketilen tahıl, doğal bir polisakkarit olan nişastadır. Nişastalar fiziksel, kimyasal veya enzimatik değişimler sonucunda sindirim niteliği kazanır. Bu nitelikler; hızlı sindirilen nişasta, yavaş sindirilen nişasta ve dirençli nişasta şeklinde sıralanabilmektedir. Hızlı sindirilebilir nişasta ve dirençli nişasta arasındaki ara nişasta fraksiyonu olan yavaş sindirilebilir nişasta glisemik indeksi aniden artırmaz ve bunun yanında yavaş ve uzun süreli glukoz salınımı sağlayarak tüm ince bağırsak boyunca sindirime uğrar. Dirençli nişasta, çoğunlukla ince bağırsakta sindirilemez ve kalın bağırsağa geçerek bağırsak bakterileri tarafından fermente edilir. Her ne kadar nişastalar, fiziksel ve kimyasal faktörler ile değişime uğramış olsa da tüketici ve çevre güvenliği bakımından enzimatik uygulamalar daha fazla önemsenmektedir. Bu nedenle son yıllarda nişastayı modifiye eden enzimler, başta tüketim olmak üzere gıda teknolojisi açısından büyük önem kazanmıştır. Özellikle düşük glisemik indeksli ve diyet lif içeriği yüksek gıdalara tüketici ilgisi artırmaktadır. Ancak nişasta kristalizasyonu nedeniyle bayatlama sorunlarıyla da karşılaşmaktadır.

Son zamanlarda özellikle dallanma enzimlerine ve 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz gibi nişasta etkili enzimlere ilgi artmaktadır. Kimyasal modifikasyonlar ile elde edilemeyen yeni tip nişasta türevleri, enzimatik modifikasyon yolu ile elde edilebilmektedir. 4,6  $\alpha$ -glukanotransferazlar, nişasta polimerlerine etki ederek sağlıklı nişasta bazlı gıdaların üretilmesine katkı sağlamaktadır. Genom dizilemesi üzerine yapılan çalışmalar, LAB tarafından sentezlenen nişasta modifiye edici enzimlerin biyosentezini yapabildiklerini göstermiştir. Bu çalışmalar neticesinde keşfedilen GH70 enzim ailesinin bir üyesi olan glukanotransferazlar; mikrobiyal kaynak, reaksiyon mekanizması ve yapısal karakterizasyon açısından aynı enzim ailesinde yer alan diğer enzimlerden ayırt edilebilmektedir. Özellikle LAB'da kodlanan glukanotransferazlar,  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağı içeren; amiloz, nişasta ve nişasta türevleri gibi bileşenleri substrat olarak kullanarak, oransızlaştırma reaksiyonunu katalize etmeleri ve parçalanmış glukani yeni bir  $\alpha$ -glikozidik bağ oluşturan bir glukani alıcısına aktararak farklı özellikte polisakkaritleri sentezlemelerinden dolayı oldukça önemli

enzimlerdir. Fırıncılık sektöründe başta ekmek olmak üzere diğer pişmiş mamüllerin oldukça büyük bir kısmının nişasta içeriğine sahip olmasından dolayı, ilgili enzimin bu sektördeki kullanımının kayda değer bir biçimde artacağı öngörülmektedir. Ancak keşfi yapılan bu enzimlerle ilgili temel gereksinim, endüstriyel üretimde kullanılabilir üretici konakçıların elde edilmesidir. Özellikle söz konusu enzimin hücre dışı rekombinant üretimine ihtiyaç duyulmaktadır.

## 1.1 Tezin Amacı

Bu çalışmada, *Lactobacillus reuteri* E81 tarafından sentezlenen 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz (GtfB) enziminin klonlanması, laktokok konakçıda ifadesi, heterolog hücre dışı üretiminin sağlanması ve elde edilen enzimin aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda hedeflenen aşamalar aşağıda sıralanmıştır:

- 1) Ekşi hamurdan izole edilen *Lactobacillus reuteri* E81 genomundan 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz (*gtfB*) geninin çoğaltılarak hücre dışı biyosentezi yapabilen indüklenebilir promotör altına yerleştirilerek uygun plazmidin hazırlanması,
- 2) *GtfB* geninin ifade edildiği ve hücre dışı 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimini üretebilen rekombinant *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) mutant hücrelerin elde edilmesi,
- 3) Rekombinant olarak elde edilen *L. lactis* hücreleri tarafından üretilen enzimin saflaştırılması ve enzim aktivitesinin belirlenmesi ve gösterilmesi.



## 1.2 Literatür Özeti

### 1.2.1 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), bitki yüzeylerinden hayvan bağırsaklarına kadar çok çeşitli ekolojik ortamda bulunabilen heterojen bir mikroorganizma grubunu oluşturur. LAB; gram-pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, hareketsiz, karbonhidratları şekere dönüştürme yeteneğine sahip bakteri grubudur. LAB, gıda endüstrisindeki kullanımlarında patojen etki göstermediklerinden dolayı GRAS (genel olarak güvenilir kabul edilir) statüsünde bulunan bakteri grubu olarak kabul edilir. Bu bakteri grubunda, tümü DNA'larında %55'ten az G + C içeriğine sahip olan *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cins çeşitleri yer alır (Pontes ve diğ. 2011). LAB'ın karbonhidratların fermantasyonu sonucu laktik asit ürettiği ve eski zamanlardan beri yoğurt, peynir, ekmek, tereyağı, şarap, sosis, turşu ve silaj gibi fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca LAB, bu fermente gıdaların korunmasına, besin değerlerinin ve organoleptik özelliklerinin geliştirilmesine de katkı sağlamaktadır. LAB'ın ürettiği; laktik asit, diasetil, asetoin ve karbondioksit gibi yan ürünlerle, nihai ürünün; dokusuna, aromasına ve raf ömrüne olumlu katkı sağlar. LAB, ortam asitliğini artırarak gıdaları korumanın yanında kısa zincirli yağ asitlerini oluşturarak, fermente gıdaların lezzetine katkıda bulunur. Aynı zamanda LAB'lar tarafından; bakteriyosin, organik asit, ekzopolisakkarit (EPS) gibi çok sayıda antibakteriyel maddelerin üretildiği de bilinmektedir. Özellikle LAB'da tanımlanmış önemli bir enzim grubu olan glukansükrazlar, EPS sentezinde görevlidir. LAB'da tanımlanmış olan bu hücre dışı duvarında aktif glukansükrazlar tarafından sentezlenen EPS'ler; LAB'ın kuruma, ozmotik stres ve antimikrobiyal faktörlerin varlığı gibi zorlu çevresel koşullardan korunmasında da rol oynamaktadırlar (Meng ve diğ. 2016). Aynı zamanda *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus reuteri* gibi LAB türlerinin çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde terapötik uygulamaları ile probiyotik olarak davrandıkları bilinmektedir. Ayrıca probiyotik LAB, gastrointestinal

sistemin patojenik bakteriler tarafından kolonizasyonunu engellediğinden dolayı son derece önemlidir (Amdekar ve diğ. 2010).

### 1.2.2 Glukansükrazlar

Glikozit hidrolaz 70 enzim ailesi (GH70); dekstran, mutan, alternan ve reuteran gibi  $\alpha$ -D-glukan ( $\alpha$ -glukan) polimerleri sentezleyen bir grup hücre dışı bakteriyel glukansükraz (GS) enzimlerini içerir. GH70 ailesi enzimleri, kimyasal yollarla üretilmesi zor olan ve ticari olarak temin edilebilen  $\alpha$ -glukan yapılarının çeşitlendirilmesi açısından önemli bir enzim grubudur (Andre ve diğ. 2010). GH70 ailesi enzimleri,  $\alpha$ -glukanları sentezlemek için basit ve düşük maliyetli sükroz veya nişasta substratlarını kullanır (Desmet ve diğ. 2012). GH70 enzim ailesi içinde sınıflandırılan enzimlerin çoğu, sükrozu  $\alpha$ -glukooligo ve polisakaritlere dönüştüren glukansükrazlardır (<http://www.cazy.org>). Bu sistemde sekanslanan  $\sim$  150 glukansükraz enziminden yaklaşık üçte birinin fonksiyonel glukansükraz olduğu deneysel olarak doğrulanmıştır (Cantarel ve diğ. 2009) ve tamamı *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Weissella* cinsi LAB tarafından sentezlendiği anlaşılmıştır. Çoğu LAB, sadece tek bir glukansükraz sentezlerken, birden fazla GH70 ailesi enzimi sentezleyen *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299 gibi suşlar da tespit edilmiştir (Monchois ve diğ. 1998, Passerini ve diğ. 2015).

Kullanılan glukansükrazlar ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak; boyut, glikozidik bağ bileşimi ve dallanma derecesi bakımından değişen  $\alpha$ -glukan polimerleri veya oligomerleri üretilmektedir. Bu polimerler hücre çevresinde koruyucu bir tabaka meydana getirdiği için oldukça önemlidir. Aynı zamanda oluşan ürünlerdeki bu yapısal değişkenlik, farklı uygulamalar için uygun olabilecek çok çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip ürünler meydana getirir (Gangoiti ve diğ. 2018).

Glukansükrazlar genellikle sentezledikleri ürüne göre adlandırılırlar. Örneğin; dekstran sentezinden sorumlu enzim dekstransükraz (EC 2.4.1.5), alternan sentezinden sorumlu enzim ise alternansükraz (EC 2.4.1.140) olarak isimlendirilir. Sentezlenen bu  $\alpha$ -glukanlar glukoz moleküllerini birbirine bağlayan glikozidik bağ tiplerine göre farklılık gösterirler. Dekstran, özellikle  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), mutan  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3), alternan  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) ve  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), reuteran  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) bağlarını içerir. Gıda endüstrisinde glukansükrazlara olan

ilginin artması nedeniyle, glükansükraz sentezleyen LAB sayıları da artmaktadır. Sükroz içeriğine sahip, katı veya sıvı ortamlarda geliştirilen ve yapışkan çözeltiler meydana getiren suşlar, glukansükraz sentezinden sorumlu suşlar olarak tanımlanmaktadır. Çünkü gen silme üzerine yapılan çalışmalar, bazı suşlardan elde edilen kolonilerin yapışkan yapıda olmasının glukansükraz aktivitesinden kaynaklı olduğunu göstermiştir (Waldherr ve diğ. 2010). Ancak yeni  $\alpha$ -glukan üreten LAB'ın tanımlanmasında artış gözlemlenirken, tam olarak karakterize edilmiş glukansükrazların sayısı oldukça azdır (Gangoiti ve diğ. 2018).

Son yıllarda glükansükraz aktivitesi ardından oluşan oligosakkaritler arasında, gentiobiyozdan türetilen oligosakkaritlerin, prebiyotik, düşük glisemik indeksi olan bir tatlandırıcı olarak ve bir anti-kanserojen ajan olarak görev yaptığı belirtilmiştir. Bu özellikler, bu oligosakkaritlerin fonksiyonel gıdaların ve gıda takviyelerinin geliştirilmesinde kullanılma potansiyelini göstermektedir. Bu durum da gentiobiyoz ve glukansükrazların alıcı reaksiyonlarının üzerinde çalışmaların artmasını sağlamıştır (İspirli ve diğ. 2019).

İspirli ve diğ. (2019) tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus reuteri* E81'den elde edilen glukansükrazın sırasıyla donör ve alıcı şeker olarak sükroz ve gentiobiyoz ile alıcı reaksiyonu ile gentiobiyozdan türetilen oligosakkaritler üretilmiştir. Gentiobiyozdan türetilen oligosakkaritler, verici olarak sükroz ve alıcı şeker olarak gentiobiyoz kullanılarak glukansükraz E81 tarafından üretilmiştir. Gentiobiyozdan türetilen oligosakkaritlerin yapısal karakterizasyonu ile DP 3- DP 8 oligosakkaritlerinin varlığını ortaya çıkarılmış ve gentiobiyozun  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  6) bağlantıları ve  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  3) bağlantıları ile glikosilasyonunu doğrulanmıştır. Türetilen bu oligosakkaritlerin *in vitro* koşullar altında test edilen IL-4, IL-12 ve TNF-a sitokinlerinin üretimini indükleyerek bağışıklık düzenleyici işlevler gösterdiği ve aynı zamanda prebiyotik etkiye sahip oldukları ortaya konulmuştur (İspirli ve diğ. 2019).

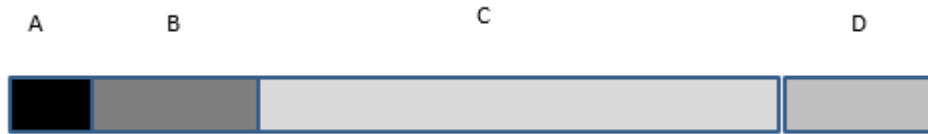
Hücre dışı glukansükraz ve fruktansükraz enzimleri tarafından sükroz kullanılarak EPS üretilmektedir. Bileşimlerine ve biyosentez mekanizmalarına göre LAB tarafından üretilen EPS'ler; heteroekzopolisakkaritler (hetero-EPS) ve homoekzopolisakkaritler (homo-EPS) olarak ikiye ayrılır. Hetero-EPS, birden fazla şeker ünitesinden oluşur ve genellikle aktive edilmiş şekerlerden hücre içinde sentezlenir. Homo-EPS ise tek tip bir monosakkaritten (genellikle D-glukoz veya D-

fruktoz) oluşur ve oluşan bu ürünler  $\alpha$ -glukanlar (dekstran, mutan, alternan, reuteran gibi) ve  $\beta$ -fruktanlar (inülin, levan gibi) olarak sınıflandırılır (Bai ve diğ. 2016, Gangoiti ve diğ. 2018).

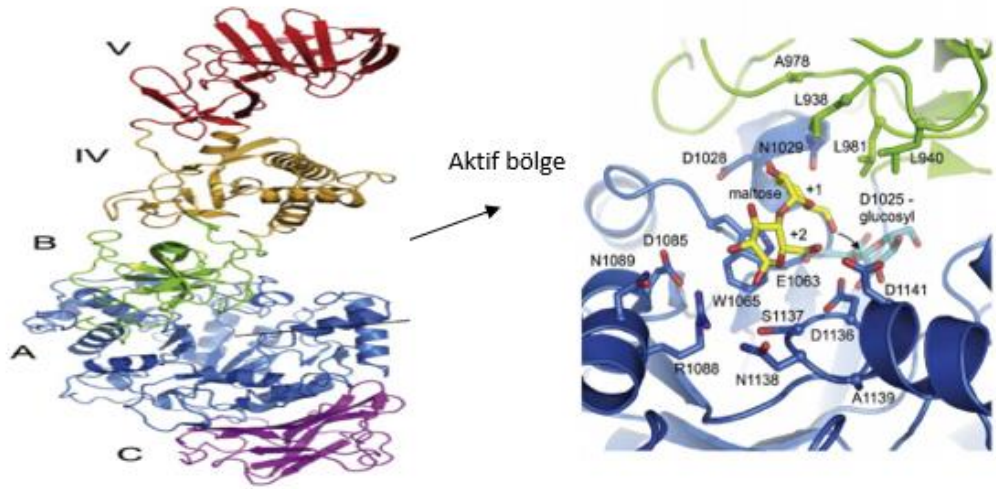
### 1.2.3 Glukansükraz Proteinlerinin Yapısı ve Etki Mekanizmaları

Glukansükrazlar, 60 yıldan uzun bir süredir kapsamlı bir şekilde incelenmektedir. Glukansükrazlar, amino asit sekansı benzerliğine dayanan CAZy ([http:// www.cazy.org](http://www.cazy.org)) sınıflandırma sistemine göre GH70 ailesi enzimleri içerisinde yer alır. Glukansükrazların genel olarak 120-200 kDa aralığında yüksek moleküler ağırlıklara sahip hücre dışı enzimler olması, yapısal karakterizasyonlarının tam olarak çözülmesine engel teşkil etmektedir. Son zamanlarda amino asit sekans analizi üzerine yapılan çalışmalar, tüm glukansükraz proteinlerinin sadece birkaç istisna dışında aynı alan organizasyonuna sahip olduğunu göstermiştir (Gangoiti ve diğ. 2018).

Farklı glukansükrazların amino asit dizi benzerliğine göre yapısı dört farklı bölgeye ayrılabilir. Bu bölgeler; (A): sinyal peptidi (SP), (B): farklı amino asit tekrar üniteleri içeren N-terminal değişken bölgesi, (C): ( $\beta/ \alpha$ ) 8 kovan yapısını kapsayan değişken katalitik bölge, (D): farklı amino asit tekrarlarından oluşan ve  $\alpha$ -glukan bağlanmasında rol oynayan C-terminal glukan bağlanma alanı şeklindedir (Meng ve diğ. 2016) (Şekil 1.1).



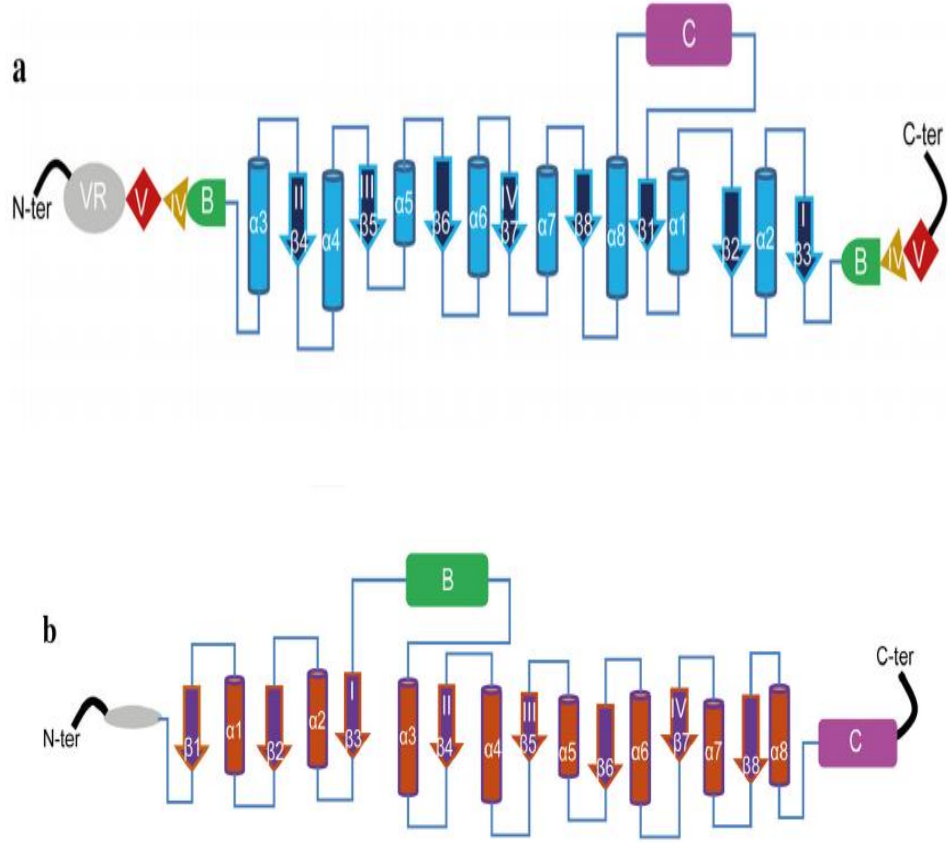
**Şekil 1.1:** Glukansükrazların temel yapısal organizasyonu; (A) sinyal peptit, (B) değişken bölge, (C) ( $\beta/ \alpha$ ) 8 kovan yapısını kapsayan değişken katalitik bölge, (D) glukan bağlanma alanı (Meng ve diğ. 2016)



**Şekil 1.2:** Glukansükrazların temel yapısal organizasyonu; (A) sinyal peptit, (B) değişken bölge, (C) ( $\beta/\alpha$ ) 8 kovan yapısını kapsayan değişken katalitik bölge, (D) gluklan bağlanma alanı (Meng ve diğ. 2016)

Glukansükrazların kristal yapılarının keşfinden önce, katalitik mekanizmaları temel olarak GH13 ailesi enzimleri ile yapısal, GH70 aile enzimleri ile evrimsel ve mekanik olarak ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Son zamanlarda, X-ışını kırınım çalışmaları ile glukansükraz proteinlerinin üç boyutlu yapılarının açığa çıkarılması üzerine çalışmalar yapılmış ve yakın zamanda glukansükraz proteinlerinin kristal yapılarına dair önemli bir ilerleme kaydedilmiştir (Meng ve diğ. 2016).

N-terminal değişken bölgesinden yoksun fakat tam aktiviteyi koruyan glukansükrazların polipeptit zincirleri, beş bölgeden (A, B, C, IV ve V) meydana gelir ve polipeptit zinciri önce IV, B ve A bölgelerin N-terminal yarısını, daha sonra tam C bölgesi ve son olarak A, B ve IV bölgelerinin C-terminal yarısını oluşturan bir U-tipi yapı oluşturur (Bai ve diğ. 2017). Bu nedenle amino asit sekansındaki dört korunmuş sekans motifinin sırası (II-III-IV-I) GH13 enzim ailesinde yer alan  $\alpha$ -amilazdan farklıdır (Şekil 1.2). Bu değişken N-terminal bölgesinin glukansükrazlar arasında uzunluk ve bileşim bakımından önemli ölçüde değişiklik gösterdiği ve bir hücre duvarı bağlanma bölgesi olarak tanımlanabileceği ileri sürülmüştür (Leemhuis ve diğ. 2013).



**Şekil 1.2:** Glukansükraz topoloji diyagram modelleri a) GH70 glukansükrazlar b) GH13  $\alpha$ -amilazlar

Enzimin A bölgesi, GH13 ailesindeki ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> kovan yapısından farklı olarak, GH70 ailesi glukansükrazları dairesel olarak değişen bir ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> kovan yapısına sahiptir. ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> kovan yapısı, enzimin çekirdeğinde yer alan 8 adet  $\beta$ -ipliğinin ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) ve bu  $\beta$ -ipliklerini çevreleyen 8 adet  $\alpha$ -heliks ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 8) varlığıyla karakterize edilir (Şekil 1.3). GH13 ailesi enzimlerinin korunmuş dört aminoasit dizisi motifi (I ila IV) aynı şekilde GH70 enzim ailesinde de mevcuttur. Ancak GH70 ailesi glukansükrazları dairesel olarak değişken yapılarından dolayı korunmuş bölge motiflerinden motif I, II ile IV motiflerinin C terminalinde yer alır (Şekil 1.3).

B bölgesi,  $\beta$ 3 tabakasından  $\alpha$ 3 heliks yapısına doğru uzanan aminosit miktarınca fazla N- ve C- terminallerinden ayrı ve A bölgesinin yanında bir bölgesi ifade eder. B bölgesinin konumu GH13 ailesi enzimlerinin yapısına benzerdir. Glukansükrazların aktif bölgesi alan A ve B bölgelerinin ara yüzündeki cep şeklinde bir boşlukta bulunur. B bölgesi enzim-ürün spesifikliğine katkı sağlayabilecek substrat/alıcı bağlanma bölgelerinin şekillenmesi için çeşitli aminoasitler içerir.

C bölgesi, glukansükrazlarda U-şeklinin altında bulunur ve C bölgesinin etki alanı tam olarak bilinmemektedir. Sonuç olarak hem GH13 hem de GH70 enzim ailelerinde, katalitik çekirdek, üst üste binebilen A, B ve C bölgeleri tarafından oluşturulur. A, B ve C bölgelerine ek olarak, GH70 ailesi içerisindeki glukansükrazlarda katalitik çekirdeğe bağlı iki ekstra alan (IV ve V) vardır.

Enzimin IV bölgesi, B ile V bölgeleri arasındadır. Bölge IV'ün yapısı yeni karakterize edilmiştir ve bilinen diğer enzim aminoasit dizileriyle benzerliği yoktur. Bu alan sadece GH70 ailesi enzimlerinde görülür. V bölgesi, IV'e bölgesine bitişiktir. IV ve V bölgelerinin kesin rolleri henüz bilinmemektedir (Amdekar ve diğ. 2010, Leemhuis ve diğ. 2013). Ancak son zamanlarda alan kısaltma üzerine yapılan çalışmalar ve X-ışını kristalografî çalışmaları, V bölgesinin polimer uzaması için önemli olduğunu göstermiştir. *L. mesenteroides* NRRLB-1355 türünde bulunan glukansükrazdan V bölgesinin art arda silinmesi üzerine yapılan bir çalışmanın sonuçları, daha az verimli polimer sentezinin ve polimer moleküler ağırlığında kademeli bir azalmanın meydana geldiğini destekler niteliktedir (Moulis ve diğ. 2006). Ayrıca V bölgesi, glukan bağlanma cepleri içerir ve IV ve V bölgeleri arasında yer alan bir merkez bölge etrafındaki hareketler nedeniyle farklı pozisyonlar meydana geldiği ve  $\alpha$ -glukan ürünlerinin aktif merkezden uzaklaştırarak veya aktif merkeze doğru hareket ettirerek polisakkarit sentezine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Pijning ve diğ. 2014, Brison ve diğ. 2016, Gangoiti ve diğ. 2018). Etki alanı C dışında, dört alanın her biri hem N- hem de C-terminallerinden iki süreksiz polipeptit zinciri tarafından oluşturulur. A, B ve C bölgeleri katalitik çekirdeği oluşturur ve ayrıca GH13 ailesi enzimlerinde (örneğin;  $\alpha$ -amilaz, amilosükraz, siklodekstrin) bulunur. Buna karşılık, IV ve V bölgeleri GH70 enzim ailesindeki glukansükrazlara özgüdür (Meng ve diğ. 2016).

GTF180- $\Delta$ N'nin, sükroz (donör substrat) ve maltoz (alıcı substrat) ile komplekslerinin üç boyutlu yapısı keşfedildikten sonra glukansükrazların, GH13 ve GH77 ailelerindeki enzimler ile benzer katalitik ve  $\alpha$ -tutucu çift yer değiştirme mekanizmalarını kullandıkları tespit edilmiştir. Bu mekanizmaya göre ilk olarak, enzim alt bölgeleri -1 ve +1 arasında sükrozun  $\alpha$ -1,2-glikosidik bağı parçalanır ve -1 alt bölgesinde bir  $\alpha$ -glukozil-enzim ara maddesi oluşur. İkinci olarak, kovalent olarak bağlı glukozil kısmı,  $\alpha$ -glikosidik bağı transglikosilasyon ve polimerizasyon

reaksiyonları ile glukoz zincirinin indirgenmeyen uç şekere aktarılır. Alternatif olarak, glukozil kısmı maltoz (alıcı reaksiyon) gibi düşük moleküler kütleli bir substrata veya bir su molekülüne (hidroliz reaksiyonu) aktarılabilir. Glukansükrazların üç boyutlu yapılarının aydınlatılması ve yapılan mutajenik çalışmalar, oluşabilecek ürün spesifikliği konusunda araştırmaların daha derin bir şekilde yapılmasına olanak sağlamaktadır. Bu çalışmalar aynı zamanda arzu edilen ürünleri elde etmek amacıyla farklı varyasyonlarda enzimlerin tasarlanması için olanak sağlamaktadır (Meng ve diğ. 2014, Meng ve diğ. 2015, Meng ve diğ. 2016).

Gtf180- $\Delta$ N'nin maltoz ile kompleks halinde kristal yapısı, +1 ve +2 alt bölgelerindeki alıcı substrat ile etkileşime giren korunmuş motifler II, III ve IV'ten değil, aynı zamanda B alanı ve  $\alpha$ 4 sarmalının diğer korunmamış bölgelerinden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bağlantı özgüllüğü, substratın enzime bağlandıktan sonraki uyumuyla da belirlenir (Vujičić-Žagar ve diğ. 2010) (Şekil 1.3). Mutajenez çalışmaları, alıcı bağlanma +1 ve +2 alt bölgelerindeki amino asit kalıntılarının birlikte bağlantı özgüllüğünü belirleyen belirli bir fizikokimyasal mikro-çevre oluşturduğunu göstermiştir (Meng ve diğ. 2014, Meng ve diğ. 2015). Bununla birlikte mutajenez deneyleri glukansükrazların katalitik bölgesinde az sayıda aminoasit yer değişikliğinde bile oluşan ürün çeşitliliğini artırdığı tespit edilmiştir. Özellikle motif IV yapısının aşağı akımında yer alan +2 alt sahalarındaki mutasyonlar glukansükrazların bağlantı oranlarını önemli oranda değiştirdiği ileri sürülmektedir (Shimamura ve diğ. 1994, Kralj ve diğ. 2005, Moulis ve diğ. 2006, Hellmuth ve diğ. 2008, van Leeuwen ve diğ. 2008, van Leeuwen ve diğ. 2009). Bu bölgedeki mutasyonların motif II'deki mutasyonlarla birleştirilmesi sonucu oluşan glukansükraz mutantlarının, vahşi-tip  $\alpha$ -glukoz ürünlerinde bulunmayan önemli miktarlarda ( $\alpha$ 1  $\rightarrow$  4) glukozidik bağlar oluşturabilmesiyle sonuçlanmıştır (van Leeuwen ve diğ. 2008, Kang ve diğ. 2011). Glukansükrazlar ayrıca alıcı substratlara (örneğin maltoz) bağlı olarak etkinliklerini polisakkarit sentezinden oligosakkarit sentezine kaydırabilmektedir. Bu strateji, sindirilemeyen yeni prebiyotik özelliklere sahip oligosakkaritleri sentezlemek için oldukça önemlidir (Valette ve diğ. 1993, Sanz ve diğ. 2005, Monsan ve diğ. 2010).



#### 1.2.4 Nişasta Etkili Enzimler; Glukanotransferazlar

Nişasta, depo karbonhidrat olarak bitki tohumlarında ve köklerinde yer alan ve dünyada en fazla bulunan ikinci karbonhidrat kaynağıdır. Nişasta, glukoz ünitelerinin  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) glikozidik bağlarıyla birbirine bağlanması ile oluşan amiloz ve  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) glikozidik bağlarının yanı sıra yaklaşık %5 oranında  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) bağıyla bağlı yan zincire sahip amilopektin formlarından oluşur. Doğada yer alan nişastalar ortalama olarak %20-25 amiloz ve %75-80 amilopektinden oluşmaktadır. Polimerik zincirin sonunda, indirgeyici uç olarak bilinen bir aldehit grubu mevcuttur. Amiloz, bir indirgeyici ve bir indirgeyici olmayan uç içeren, birkaç yüz ile birkaç bin glukoz ünitesi arasında değişen nispeten küçük bir moleküldür. Amilopektin ise yüz bine kadar glukoz ünitesi içeren çok daha büyük bir moleküldür ve amilozun bir indirgeyici ve birçok indirgeyici olmayan ucu vardır. Amiloz ve amilopektinin birleşmesi ile boyutu ve şekli farklı olabilen nişasta granülleri meydana gelir. Bu granüller, enzimler tarafından parçalanabilen inert substratlar olarak düşünülebilir. Nişastalar genellikle fiziksel, kimyasal veya enzimatik işlemlerle işlendikten sonra gıda, kâğıt ve tekstil gibi çeşitli endüstri uygulamalarında kullanılır. Nişastanın fiziksel ve kimyasal modifikasyonu sonucu elde edilen nişasta türevlerinde ürün kaybı daha fazladır. Bu nedenle enzimatik modifikasyonlar, tercih edilen uygulamalardır. Temel olarak, nişasta etkili enzimler etki şekline bağlı olarak iki ana gruba ayrılır; (1) su kullanarak  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) ve/veya  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) glikozidik bağı hidrolize eden ekzo- ve endo- etkili hidrolazlar, (2)  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) bağına parçalayan glukanotransferazlar (Okaför ve diğ. 2018).

Başlarda, GH70 ailesi enzimleri sadece sükrözdan  $\alpha$ -glukan sentezini katalize eden, LAB'da sentezlenebilen glukansükrazlar olarak tanımlanmıştır (Lombard ve diğ. 2014). Ancak son 6 yılda, GtfB, GtfC ve GtfD olarak belirlenen üç farklı GH70 alt ailesi ortaya çıkmış ve biyokimyasal olarak  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimleri olarak karakterize edilmiştir. Bu  $\alpha$ -GTaz enzimlerinin mikrobiyal orijini, domain (etki alanı) organizasyonu, reaksiyonları ve ürün spesifikliği GH70 ailesi içerisinde yer alan glukansükrazlardan farklıdır. Bu yeni nişasta etkili GH70 ailesi enzimlerinin; gıda, sağlık ve biyomalzeme olarak ticari uygulamalarla enzimatik olarak sentezlenebilen  $\alpha$ -glukanların çeşitliliğini önemli ölçüde genişleteceği düşünülmektedir. Sükröz yerine, bu enzimler maltodekstrinleri ve nişasta substratlarını yeni bir  $\alpha$ -glukooligo ve

polisakkarit sınıfına dönüştürmek için kullanırlar. CAZy sınıflandırma sistemine göre (<http://www.cazy.org>), yeni keşfedilen bu GH70 enzim ailesi içerisinde yer alan nişasta etkili enzimler GH13 ve GH77 aileleri ile GH-H klanı içerisinde yer alan enzimlerin ortak özelliği,  $\alpha$ -glikozidik bağı ile bir katalitik (b / a) 8 fiçı yapısı kullanılarak bir glukoz ünitesi ile başka bir (glukoz, fruktoz, vb.) glukoz ünitesinden ayrılmasıdır ve katalitik alanda N- ve / veya C-terminal alanları yer almaktadır. Ancak diğer alanların tipi ve sayısı her bir GH-H klanına ait enzimler için farklıdır. Bu ek alanlar enzimlerin reaksiyon spesifikliğini belirlediğini gösterir (Stam ve diğ. 2006).

Nişasta ve maltodekstrinlerde aktif olan GtfB, GtfC ve GtfD tipi enzimler GH70 ailesi glukansükrazları ile yüksek aminoasit dizi homolojisi göstermekte, GH13 ve GH70 enzim aileleri arasındaki evrimsel ilişkiyi desteklemektedir (Leemhuis ve diğ. 2013). Yapılan filogenetik çalışmalar, bu enzimlerin GH13-GH70 ara karakterine sahip olduğunu ve özellikle GH13 alt enzim ailesi 5'e ait maltooligosakkarit etkili  $\alpha$ -amilaz ile yakından ilişkili olduğunu hatta bu  $\alpha$ -amilazdan evrimleştiğini ortaya koymaktadır (Bai ve diğ. 2017). Ancak her ne kadar GH77 ailesi enzimleri de  $\alpha$  (1 → 4) glukoz substratları üzerinde etkili ve GH-H klanında yer alsa da yapılarında etki alanı C'nin bulunmamasından dolayı GtfB, GtfC ve GtfD tipi enzimlerle GH13 ailesi enzimleri kadar benzerlik göstermezler (Gangoiti ve diğ. 2018). Karakterize edilmiş nişasta dönüştürücü GH70 enzimlerinin sayısı hala sınırlıdır. Ancak bakteriyel genom dizi analizlerinin her geçen gün artması, belirtilen yeni GH70 alt ailesi enzimlerinin tanımlanmasına büyük katkı sağlamaktadır (Gangoiti ve diğ. 2018). Aynı zamanda enzimlerin aktiviteleri ve oluşan ürünlerin yapısal olarak belirlenmesi konusunda önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu yapı-işlev ilişkilerinin net bir şekilde anlaşılması, enzim mühendisliği ve  $\alpha$ -glukoz ürünlerinin (bağlantı tipleri, boyutları, dallanma derecesi) farklı işlevlere göre uyarlanmasıyla mümkün olabileceği düşünülmüştür.

GtfC benzeri enzimler; LAB olmayan, gram pozitif ve genellikle *Bacillaceae* ailesine ait *Exiguobacterium*, *Bacillus* ve *Geobacillus* cinsleri tarafından sentezlenmektedir. Ancak şu ana kadar sadece *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 tarafından kodlanan GtfC karakterize edilmiştir. GtfC enzimlerini kodlayan bakteriler, çok düşük ve çok yüksek sıcaklıklarda gelişim gösterebilen farklı kaynaklardan izole edilmiştir. Örneğin, *Exiguobacterium sibiricum* 255-15, 2-3 milyon yaşında olduğu

tahmin edilen eski Sibirya'da sürekli donmuş topraktan izole edilmiş, psikrofilik olmayan, spor oluşturmeyen bir bakteridir (Rodrigues ve diğ. 2008). Yine GtfC enzimini kodladığı varsayılan *Geobacillus sp.* 12AMOR1, 90 ° C sıcak derin deniz tortu örneğinden izole edilen bir termofilik bakteridir (Wissuwa ve diğ. 2016). Nişasta etkili enzimlerle ve glukansükrazlar ile sekans karşılaştırması yapıldığında GtfC tipi enzimleri dairesel olarak değişen ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub> fıçı yapısına sahip değillerdir ve enzim etki alanları GH13 enzim ailesiyle benzerlik gösterir. Bununla birlikte A, B, C ve IV etki alanları GH13 ailesine benzer şekilde içerirken, glukansükrazlara ve GtfB benzeri enzimlere özgü bir motif olan V etki alanına sahip değildir. GtfC enziminin bu farklı alan organizasyonu GH13 enzim ailesi ve GH70 enzim ailesi arasındaki evrimsel yolu açıklar niteliğindedir (Bai ve diğ. 2015).

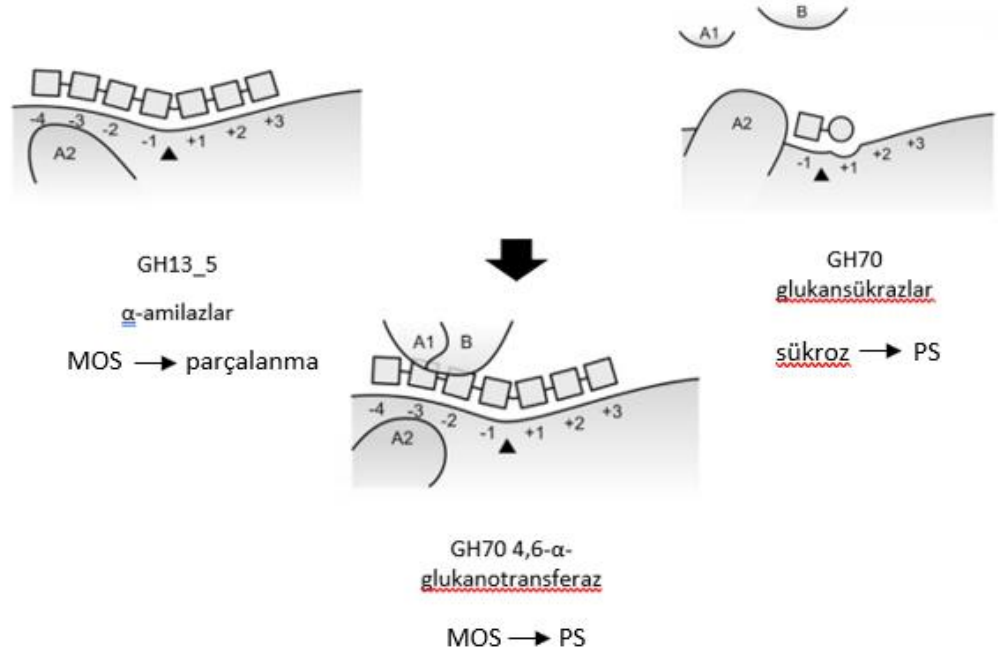
GtfD benzeri enzimler ise polimerizasyon derecesi 4-7 aralığında olan patates nişastası, amiloz ve maltooligosakkaritler gibi nişasta benzeri substratlarda 4,6- $\alpha$ -GTaz aktivitesine sahip bir enzim grubudur ancak bu enzim grubu çeşitli bitki ile ilişkili bakterilerde tanımlanmıştır. GtfD alt ailesinin üyeleri, GtfC tip enzimlerle benzerlik gösterirler (Gangoiti ve diğ. 2016). Şu ana kadar GtfD tipi enzimler, *Azotobacter chroococum* NCIMB 8003 (Gangoiti ve diğ. 2016) ve *Paenibacillus beijingensis* DSM 24997 (Gangoiti ve diğ. 2017) türü bakterilerde biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir.

Nişasta etkili GH70 alt ailesi olarak belirtilen  $\alpha$ -GTaz enzimlerinin ilk ve en çok incelenen alt ailesi GtfB tipi enzimlerdir ve genellikle LAB tarafından sentezlenir. GtfB tip enzimlerin çoğu birkaç istisna dışında (*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* ve *Leuconostoc* suşları) *Lactobacillus* suşları tarafından sentezlenmektedir. GtfB enzimlerinin hücredeki fonksiyonel rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, bazı suşlarda GtfB benzeri proteinleri ve glukansükrazları kodlayan genlerin genomda art arda düzenlediğini ve *in vivo* deneyler sonucu glukansükrazların yanında GtfB benzeri enzimlerinde ekzopolisakkarit sentezine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Bai ve diğ. 2016). Son yıllarda GH70 alt enzim ailesinde GtfB benzeri enzimler grubunda yer alan, farklı reaksiyon ve ürün spesifitesine sahip üç farklı glukano transferaz enzimi üzerinde durulmaktadır. Bu enzimler *L. reuteri* 121 GtfB 4,6- $\alpha$ -GTaz (Kralj ve diğ. 2011, Leemhuis ve diğ. 2013, Bai ve diğ. 2015), *L. fermentum* 4,3- $\alpha$ -GTaz (Gangoiti

ve diğ. 2017) ve *L. reuteri* NCC 2613 GtfB 4,6- $\alpha$ -GTaz (Gangoiti ve diğ. 2017) olarak sıralanabilmektedir.

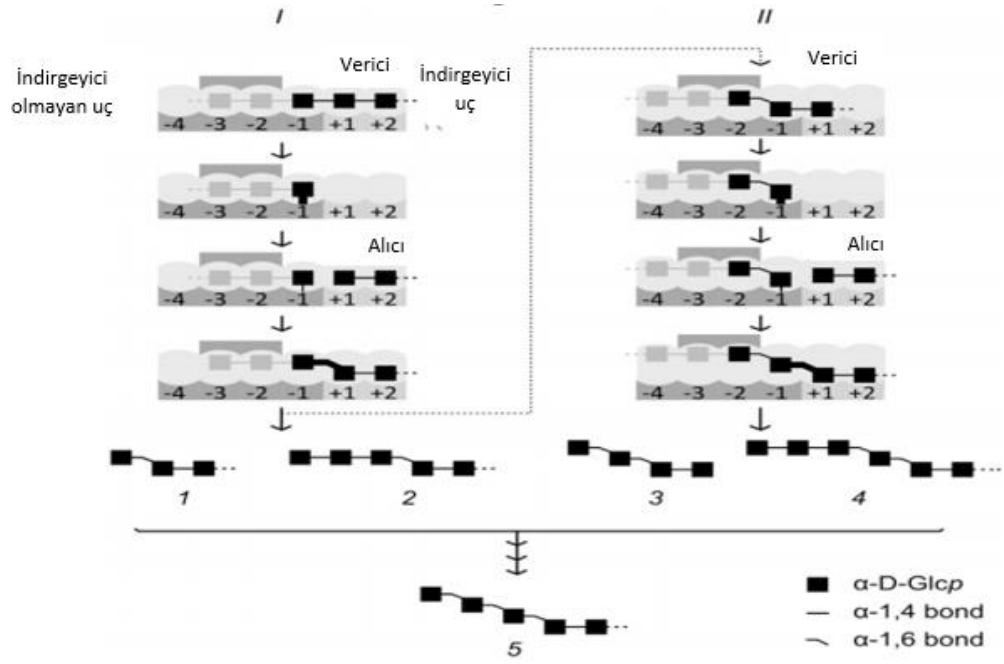
GH70 enzim ailesi içerisinde GtfB enzimini sentezlediği bildirilen ilk suş *L. reuteri* 121'dir. Bu enzimi kodlayan genin, sükroz etkili ve sükrozu reuteran polimerine dönüştüren glukansükrazlardan biri olan *gtfA* geninin akış yönünün yukarısında olduğu bulunmuştur (Kralj ve diğ. 2002). *L. reuteri* 121 de tespit edilen GtfB enzimini kodlayan genin, *gtfA* geni ile yüksek aminoasit dizi benzerliğine sahip olmasına rağmen sükrozda inaktif olduğu ancak maltooligosakkaritler ve nişastadaki  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) bağlarını hidrolaz/transglikosilaz aktivitesi ile parçalayarak  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) bağlantılarını sentezlediği ortaya konulmuştur. Farklı reaksiyon verme şekilleri göz önüne alındığında, bu enzimler 4,6  $\alpha$ -glukanotransferazlar (4,6  $\alpha$ -GT'ler) (EC 2.4.1.-) olarak tanımlanmıştır. *L. reuteri* 121 tarafından sentezlenen GtfB enziminin kristal yapısında yer alan katalitik bölgesinin GH13 ailesinde yer alan  $\alpha$ -amilazlar ve GH70 ailesinde yer alan glukansükrazlar arasında yer aldığını göstermektedir. Filogenetik ve genomik analizler de 4,6  $\alpha$ -GT'lerin ve GS'lerin, GH13\_5 alt familyasının maltooligosakkaritler üzerinde etkili  $\alpha$ -amilazlara yakın ortak bir atadan evrimleştiklerini desteklemektedir. *L. reuteri* 121 GtfB'nin kristal yapısı, kısmen bir tünel oluşturan uzun döngülerle kaplanmış  $\alpha$ -amilaz benzeri bir bağlama oluğuna sahip olduğunu göstermektedir. Bu tünelin içindeki yer alan ve 4,6  $\alpha$ -GT'ler ile GH13 amilazları arasındaki farka neden olan bu döngüler A1 ve B'dir.

Ekşi hamurdan izole edilen ve tam olarak sekansı bilinen *L. reuteri* E81 suşunun genomunda 4,6- $\alpha$ -GTaz geninin varlığı tespit edilmiştir. Bu enzimin *E. coli*'de ekspresyonunun ve takiben biyokimyasal karakterizasyonunun gerçekleştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. İlgili enzimin, substrat kullanımı ve donör-alıcı çalışmaları için  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) glikozidik bağı içeren substratlar kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Bu enzim grubu tarafından üretilen maltooligosakkaritlerin fonksiyonları incelenmiştir (İspirli ve diğ. 2019b)



**Şekil 1.3:**  $\alpha$ -Amilaz, 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz ve glukansükraz arasındaki evrimsel ilişki (kare: glukoz üniteleri; küre: fruktoz üniteleri; MOS: maltooligosakkaritler; PS: polisakkaritler)

Bağların ayrılması ve transglükosilasyon aşamaları katalitik bölgenin alt bölgeleri olan -1 ve +1 arasında gerçekleşir (Şekil 1.4). Maltooligosakkaritler üzerine etkili  $\alpha$ -amilazlar birden fazla alıcı ve verici alana sahiptir ancak A1 ve B döngülerinden yoksundur ve bu nedenle polisakkarit sentezleyemezler, bunun yanında maltooligosakkaritlerin parçalanmasından sorumludurlar. 4,6  $\alpha$ -Glukanotransferazlar ise A1 ve B döngülerine sahiptir ve bu yapılar sayesinde 4,6  $\alpha$ -glukanotransferazlara özgü tünel yapıları oluşarak transglükosilasyon esnasında ara maddenin tutulması sağlanır ve farklı çeşitlilikte polisakkaritler meydana gelir. Glukansükrazlar da A1 ve B döngülerine sahiptir ancak A2 döngüsünün uzaması ve A1 ve B döngülerinin kısılması ile glukansükrazlar glukon polimerlerinin sentezi için sükrözü kullanır hale gelmiştir (Şekil 1.4). Ayrıca Şekil 1.4'te de görüldüğü gibi glukansükrazların aktif bölgesinin daha açık yapıda olması oluşturdukları ürünlerin dallı yapılarının olmasını bunun aksine 4,6  $\alpha$ -glukanotransferazların tünel yapılarından dolayı sadece lineer yapıda ürünleri sentezlemesini açıklamaktadır.



Şekil 1.4: 4,6  $\alpha$ -Glukanotransferazların reaksiyon yolları

Şekil 1.5'te 6 tane verici alt bölge gösterilmiştir. Bunlardan -2 ve -3 bölgeleri (A1 ve B döngülerinin yer aldığı bölge) 4,6  $\alpha$ -glukanotransferazlarda olan tünel yapısını içeren alt bölgelerdir. Yeni oluşan bağlar daha kalın çizgilerle belirtilmiştir. Şekil 1.5'in I. kısmında görüldüğü gibi maltooligosakkaritlerin donör substrat olarak bağlanmasıyla transglükolizasyon bir veya çoklu alt bölgelerde (gri ile gösterilen) gerçekleşir. Bunun sonucunda 1 ve 2 olarak gösterilmiş olan ürünler meydana gelir. Bu ürünler Şekil 1.5'in II. kısmında gösterildiği gibi tekrar donör substrat olarak da kullanılarak 3 ve 4 gibi ürünler meydana gelebilir. Sonuç olarak oluşan tüm ürünler (1,2,3,4),  $\alpha$ -1,6 bağı açısından zengin farklı izomalto-maltooligosakkaritler (IMMP) meydana gelir.

IMMP'ler maltooligosakkaritlerin veya nişastaların indirgeyici olmayan ucuna doğrusal  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) glukan ünitelerinin eklenmesi ile oluşur (Dijkhuizen ve diğ. 2010, Kralj ve diğ. 2011, Kralj ve diğ. 2011, Leemhuis ve diğ. 2014). Bu GtfB tipi enzimler tarafından ifade edilen 4,6  $\alpha$ -GTase aktivitesine benzer olarak *Gluconobacter oxydans* suşları tarafından üretilen ve GH15 enzim ailesi içerisinde yer alan dekstran dekstrinazlar, IMMP'ye benzer ancak içerisinde  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) zincirlerine ek olarak ( $\alpha$ 1  $\rightarrow$  4) dallarının bulunduğu dekstranlar üretir. Üretilen dekstran ve IMMP, yüksek diyet lif içeriğine sahiptir (Leemhuis ve diğ. 2014, Gangoiti ve diğ. 2018). Çeşitli nişastalar ve maltodekstrinler IMMP sentezi için substrat olarak değerlendirilmektedir. Örneğin;

*L. reuteri* 121 tarafından sentezlenen glukansükrazlar uzun ve doğrusal ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) bağlı glukoz dizisine ve daha düşük miktarlarda  $\alpha (1 \rightarrow 4,6)$  dallanma noktalarına sahip substratları kullandıklarında, daha fazla miktarda  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  bağına sahip ürün ortaya çıkmaktadır (Leemhuis ve diğ. 2014).

Daha önce glukansükrazların yapısal organizasyonuna değinilmişti. *L. reuteri* 121 tarafından sentezlenen GtfB enzimi aynı U-tipi yapı organizasyonuna sahiptir ancak aktif bölgesinin genel mimarisi farklıdır. Glukansükrazlar sadece bir alıcı alt bölgesine (-1) sahipken, GtfB enzimleri çoklu alıcı alt bölgesine sahiptir. Bu açıdan GH13 ailesine ait  $\alpha$ -amilazlara benzerler ve bu durum maltooligosakkaritlere yönelik substrat speksifikliklerini açıklar. Aynı zamanda GtfB enziminin transglikozilasyon aktivitesi sadece ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) özgüdür. GtfB enzimlerinin katalitik bölgesi GH70 ailesi enzimleri glukansükrazlarında olduğu gibi I ile IV motifleri arasında yer alan dairesel olarak değişen bir  $(\beta/\alpha)_8$  korunmuş kovan yapısına sahiptir. Ancak GH70 ailesi glukansükrazlarının çoğunda motif V, hem N- hem de C-terminal polipeptit segmentlerinden oluşmasına rağmen GtfB enziminde, motif V daha küçük olduğu için sadece N-terminal polipeptit ünitesinden oluştuğu belirtilmektedir.

### **1.2.5 Glukanotransferazların Nişasta Üzerine Etkisi ve Oluşan Oligosakkaritlerin Fonksiyonel Özellikleri**

Nişasta; patates, pirinç, buğday ve mısır gibi temel gıdaların ana bileşeni olan, hem enerji kaynağı hem de gıdalarda tekstürü geliştirici ajan olarak yer alan, insan diyetinde bir önemli yere sahip, karbonhidrat kaynağıdır. Nişastalar fiziksel, kimyasal ve enzimatik modifikasyonlara tabi tutularak fonksiyon kazanır. Son zamanlarda özellikle dallanma enzimlerine ve 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz gibi nişasta etkili enzimlere ilgi artmaktadır. Kimyasal modifikasyonları ile elde edilemeyen yeni tip nişasta türevleri, enzimatik modifikasyon yolu ile elde edilebilmektedir. Günümüzde tüketicilerin düşük glisemik indeksli ve diyet lif içeriği yüksek gıdalara karşı artan talebi bu enzimlere olan ilgiyi artırmıştır. Nişasta, gıda ürünlerinde, sindirim özelliklerine göre hızlı sindirilebilir nişasta, yavaş sindirilebilir nişasta ve dirençli nişasta olarak sınıflandırılmıştır (Englyst ve diğ. 1992). Hızlı sindirilebilir nişasta ve dirençli nişasta arasındaki ara nişasta fraksiyonu olan yavaş sindirilir nişasta, glisemik

indeksi aniden artırmaz bunun yanında yavaş ve uzun süreli glukoz salınımı sağlayarak tüm ince bağırsak boyunca sindirilir (Zhang ve Hamaker 2009). Yavaş sindirilebilir nişastalar, gıda endüstrisinde dikkat çekmektedir. Örneğin, buğday unundan yapılmış ekmeğe yaklaşık olarak %9,5 yavaş sindirilebilir nişasta içerir (Štěrbová ve diğ. 2016). Ekmekte yavaş sindirilebilir nişasta içeriğini artırmak için az pişmiş ekmeğin dondurulması, hamur hidrasyonunun azaltılması, yüksek amiloz nişastası kullanımı ve bitki özlerinin eklenmesi gibi çeşitli ekmeğe üretim teknikleri geliştirilmiştir. Çünkü yavaş sindirilen nişasta bakımından zengin gıdaların tüketiminin kan şekeri artışına neden olmadığı ve bunun sonucunda diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalık gibi kronik hastalıkların riskini azalttığı bildirilmiştir (Miao ve diğ. 2015, Zhang ve Hamaker 2009). Nişastayı enzimle modifiye etmek amacıyla amilosükraz, dallanma enzimleri, 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz, amilomaltaz ve pullulanaz dahil olmak üzere çeşitli amilolitik enzimler, amiloz/amilopektin ve uzun veya kısa dal zincirlerinin oranını düzenleyerek tahıl nişastalarından yavaş sindirilebilir nişasta üretmek amacıyla kullanılmıştır (Li ve diğ. 2019).

Leemhuis ve diğ. (2014)'nin yaptığı bir çalışmada, *L. reuteri* 121'in 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimi kullanılarak nişasta ve nişasta kaynaklı maltodekstrinlerin enzimatik modifikasyonu ile yeni bir çözünür diyet lifi türünü temsil eden IMMP'in oluştuğunu ortaya koymuştur. Aynı zamanda herhangi bir nişasta türevinin GtfB enzimi için substrat olarak işlev görebileceği ancak amiloz bakımından zengin ve düşük dallanma derecesine sahip substratlar kullanıldığında ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) bağlantı yüzdesi yüksek ürünlerin elde edilebileceği ortaya konulmuştur. Oluşan bu IMMP'in üst gastrointestinal sistem ve ince bağırsak için *in vivo* modeller kullanılarak diyet lifi analizi yapılmıştır ve GtfB enzimi modifikasyonu sonucu yeni oluşan IMMP'lerin diyet lifi içeriğinin ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) bağlantılarının yüzdesi bakımından orantılı olduğu tespit edilmiştir. Li ve diğ. (2019)'nin yaptığı bir çalışmada ise buğday unundan yapılan ekmeğin hazırlanması aşamasında *Streptococcus thermophilus* tarafından sentezlenen GtfB enzimi eklenmiştir. Probiyotik bir laktik asit bakterisi olan *Streptococcus thermophilus* genellikle *Lactobacillus* suşları ile yoğurt ve peynir üretiminde kullanılır. Ancak genomik sekanslama sonucu *S. thermophilus*'un GtfB enzimini kodladığı tespit edilmiştir ve bu gen 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz üretmek için *Escherichia coli* (*E. coli*) içinde heterolog olarak ifade edilmiştir (Li ve diğ. 2018). Bu rekombinant GtfB enziminin eklenmesinden sonra ekmeklerin yavaş sindirilebilir nişasta



içeriklerinin %19,7 – 35 arttığı ve ekmeklerin özgül hacimlerinin de %2,3 – 11,4 arttığı gözlemlenmiştir. Yine bu çalışmada, GtfB enzimi ile modifiye edilmiş ekmeklerin daha yumuşak olduğu ve 7 gün boyunca 4 °C'de saklandıktan sonra daha az yapışkan ve çiğnenebilir olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu sonuçlar *S. thermophilus* tarafından sentezlenen GtfB'nin ekmeğin hamur reolojisi ve buğday ununun pişirme performansı üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu, bunun yanında düşük retrogradasyon ve aynı zamanda yavaş sindirilebilir nişasta içeriğine sahip bir ekmek üretilebileceğini destekler niteliktedir (Li ve diğ. 2019).

### 1.2.6 *Lactococcus lactis* ve Heterolog Protein Üretimi

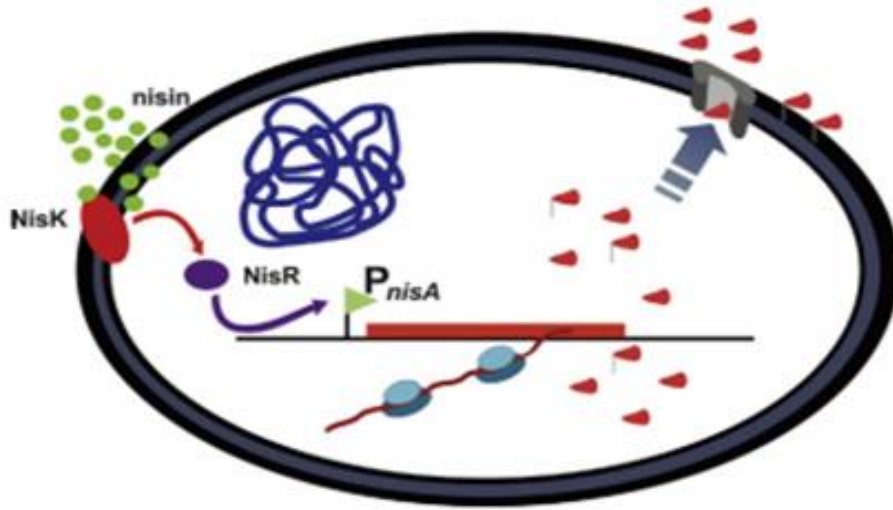
*Lactococcus lactis*; fenotipik olarak gram pozitif, kok şeklinde, homo-laktik, sporlanmayan, fakültatif anaerobik mikroorganizma türüdür. *L. lactis*, özellikle peynir, yoğurt, turşu ve benzer gıdaların fermantasyon yoluyla üretilmesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından genellikle güvenli olarak (GRAS) kabul edilmektedir. Lezzet vermenin yanı sıra, LAB olan *L. lactis*'in ürettiği asit, bakteriyosin gibi metabolitlerin gıdaların korunmasından dolayı, bu bakterilerin gıda endüstrisindeki önemi büyüktür. Gıdalardaki bu önemli işlevleri dışında birçok suşunun, genom dizisinin bilinmesi ile klonlama ve ekspresyon sistemlerine uyum sağladığından *L. lactis*, genetik mühendisliğinde model bir konakçıdır (Pontes ve diğ. 2011).

Günümüzde rekombinant olarak proteinlerin ekspresyonlarına yönelik çalışmalar hem genetik bilgilerdeki ilerlemeler hem de yeni moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesiyle beraber hız kazanmıştır. Genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak rekombinant proteinlerin ekspresyonu ve saflaştırılması endüstriyel uygulamalarda oldukça önemlidir. Rekombinant protein üretiminde yaygın kullanılan konakçı *Escherichia coli*'dir. Protein üretimini sağlamak amacıyla öncelikle ilgili proteini kodlayan genin veya DNA parçalarının izolasyonu yapılır ve vektör olarak adlandırılan virüs ve plazmid gibi basit küçük ve manipüle edilebilir genetik elementlere aktarılır. Klonlama vektörü olarak prokaryotlarda daha çok plazmidler kullanılmaktadır. Bu plazmidler genel olarak; replikasyon orijini, antibiyotik direncine sahip özel alanlar ve çoklu klonlama bölgesine sahiptir. *In vitro* koşullarda üretilen

rekombinant DNA molekülleri replikasyon yapabilecekleri uygun konak organizmalara aktarılır (Madigan ve diğ. 2016).

*E. coli*'ye uyum sağlayan pET plazmidleri hedef proteinin izopropil  $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranosid (IPTG) ile ekspresyonunun indüklenmesinde hayati bir rol oynayan T7 promotör sistemini içerir (Studier ve Moffatt 1986). Bu pET plazmidleri antibiyotik direnç genlerine ve protein saflaştırmasını kolaylaştırıcı afinite bölgelerine sahiptir. Ancak *E. coli* ekspresyonunun bazı dezavantajları vardır. *E. coli* ekspresyonunda rekombinant proteinlerin kullanımını engelleyen durum; protein çökmesine ve protein çözünürlüğüne sebep olan inklüzyon cisimciklerinin sık görülmesidir. Aynı zamanda bazı proteinlerin düşük verimleri, yüksek saflaştırma maliyetleri ve bakteriyel bileşenler (örneğin lipopolisakkarit) tarafından kontaminasyon riski, *E. coli* geFn ekspresyon sisteminin dezavantajlarından (Song ve diğ. 2017).

Son yirmi yılda *E. coli*'ye alternatif olarak, tamamen sekanslanmış bir genomu sahip, genetik olarak manipüle edilmesi kolay ve birçok genetik araca sahip olan *L. lactis* önemli bir klonlama aracı olarak görülmektedir. *L. lactis* biyoteknoloji alanında proteinlerin üretimi için kullanılan bir 'biyoreaktör' olarak nitelendirilmektedir. *L. lactis*'te heterolog proteinlerin ekspresyonunda, verimli protein eldesi ve üretimin kontrol edilmesi amacıyla konstitütif veya indüktif promotörler içeren çeşitli vektörler geliştirilmiştir. Genellikle daha iyi kontrol sağladıkları için indüklenbilir promotörler tercih edilir. Bunlar arasında en önemlileri P45 ve P32 laktokok promotörleridir. Ancak ekspresyon sistemini geliştirmek amacıyla hala güçlü promotörler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Pontes ve diğ. 2011). Bununla birlikte, şüphesiz, bugüne kadar ki en başarılı laktokok ekspresyon sistemi, Kuipers ve diğ. (1995) tarafından geliştirilen nisin kontrollü gen ekspresyon (NICE) sistemidir. Nisin, biyosentezi 11 genlik bir küme tarafından kodlanan bir 34 amino asitten oluşan anti-mikrobiyal peptittir. Bu 11 gen bloğu içerisinde *nisR* ve *nisK* genleri, nisin genlerinin ekspresyonunu düzenler. *NisK*, sitoplazmik zar da bulunan ve nisin molekülü için bir reseptör görevi gören bir histidin-protein kinazdır. Nisin alımı üzerine *nisR* fosforilasyon yoluyla aktive edilir, bu da nisin gen kümesindeki  $P_{nisA}$  ve  $P_{nisF}$  promotörlerinin transkripsiyonunu indükler (Kuipers ve diğ. 1995). İlgilenilen gen plazmitte yer alan  $P_{nisA}$  promotörünün alt kısmına yerleştirildiğinde belirli oranlarda nisin ilave edilerek indüklenme yapılır.



Şekil 1.5: NICE sisteminin şematik gösterimi

Konakçı olarak kullanılan *L. lactis* NZ9000, kromozomuna *nisR* ve *nisK* genleri yerleştirilmiş nisin-negatif *L. lactis* MG1363 suşunun bir türevidir (Kuipers ve diğ. 1998).

Heterolog proteinlerin hücre dışına salgılanması; daha basit saflaştırma adımları, daha yüksek verim ve kaliteli ürün elde etme gibi avantajlar nedeniyle hücre içi olarak ifade edilen proteinlere kıyasla daha çok tercih edilir. Bu açıdan heterolog protein üretimi için bir konakçı olarak *L. lactis*'te geliştirilen salgı sisteminin kullanılması da avantajlıdır. Çünkü gram pozitif bakteriler hücre dışındaki ortama doğrudan salgılamaya izin veren tek katmanlı bir hücre duvarına sahiptir. Bu durum salgılanan proteinlerin çoğunlukla periplazmada sıkıştığı, *E. coli* ile karşılaştırıldığında önemli bir avantajdır. Ayrıca, *L. lactis* bir hücre dışı proteazı olan HrtA'ya sahiptir, bu enzim salgılanan heterolog proteinlerin parçalanma şansını azaltma özelliğindedir (Song ve diğ. 2017). Yine *L. lactis*'lerde bulunan sinyal peptitleri (SP'ler), konakçıya, sitoplazmik zar ve hücre duvarı boyunca translokasyon yoluyla proteini hücre dışı bölgeye gönderilmesi için sinyal gönderen bir proteinin N-terminal uzantılarıdır ve genellikle 14-25 aminoasit uzunluğundadır. Aynı zamanda sinyal peptitleri (SP'ler) protein sekresyonunu spesifik ortama yönlendirir. Özellikle *L. lactis*'te üretim verimini ve protein sekresyonunu optimize etmek için sinyal peptitlerinin seçimi önemli bir role sahiptir. Özellikle sinyal peptitlerden *usp45*, *L. lactis*' de önemli ölçüde salgılanan bir proteindir. Bu sinyal peptit, *L. lactis*'te

sekresyon için şimdiye kadar kullanılan en başarılı peptittir (Subramaniam ve diğ. 2013).

Son zamanlarda *usp45*'e ek olarak *Pediococcus pentasaceus*'ta keşfedilen yeni bir sinyal peptiti olarak *SPK1* üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada,  $\beta$ -siklodekstrin glukanotransferaz enziminin *L. lactis* NZ9000'de hücre dışı salgılanması amacıyla üç farklı sinyal peptit (*usp45*, *SPK1*, *NSP*) kullanılmıştır. Siklodekstrin glukanotransferaz (CGTase), nişastadan siklodekstrin oluşumunu katalize eden bir hücre dışı enzimdir. *Bacillus spp.* ve *Escherichia coli*'de, CGTase üretiminde, proteaz gibi safsızlıkların varlığı nedeniyle, elde edilen ürün kalitesi düşmektedir. Bu nedenle, gıda ve ilaç sektöründe kullanılmak amacıyla daha kaliteli ürün eldesi için laktokok sistemi tercih edilmiştir ve farklı sinyal peptitler ve siklodekstrin glukanotransferaz genini içeren *L. lactis* suşlarının elde edilmesi hedeflenmiştir ve oluşturulan mutant suşların salgılama yetileri karşılaştırılmıştır.  $\beta$ -siklodekstrin glukanotransferazın hücre dışı üretiminde sinyal peptit olarak *SPK1* ve konakçı olarak da *L.lactis* NZ 9000 kullanıldığında salgılamanın en yüksek verimlilikte olduğu saptanmıştır (Subramaniam ve diğ. 2013).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Bakteri Suşları, Plazmidler ve Kültür Ortamları

Çalışmada kullanılan ve çalışma süresince elde edilen bakteri suşları ve plazmidler sırasıyla Tablo 2.1’de belirtilmiştir.

4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimini sentezleyen *Lactobacillus reuteri* E81 ile klonlamada kullanılacak tüm suşlar Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonundan (PUFECC) sağlanmıştır. Ekşi hamur mikroflorasında laktik asit bakterileri açısından çeşitlilik oldukça fazladır. *L. reuteri* E81 suşu ekşi hamurdan izole edilerek mutlak tanımlamaları gerçekleştirilmiş ayrıca bu suşların genom dizi analizi sonucunda (Dertli ve diğ. 2018) 4,6  $\alpha$ -glukanotransferazı kodlayan *gtfB* genini içerdiği ve ilgili enzimin üretildiği RAST kaynaklarından teyit edilmiştir.

Klonlama sonucu yeni oluşturulan plazmidler GtfB enziminin hücre dışı üretimi için önce ara konakçı olarak *Escherichia coli* TG1 suşuna aktarılmıştır. Ardından *Lactococcus lactis* NZ9000 suşu ana konakçı olarak kullanılmıştır.

*Lactobacillus* suşları MRS (Merck, Almanya), laktokok suşları %0,5 glukoz (Merck, Almanya) içeren M17 (Merck, Almanya) ve *Escherichia coli* suşları ise LB (Merck, Almanya) ortamlarında geliştirilmiştir. Çalışma süresince genetik modifikasyon çalışmalarında 10 veya 200  $\mu$ g/ml eritromisin içeren kültür ortamları hazırlanmıştır. Laktobasil ve laktokok suşları sırasıyla 37 ve 30 °C’de 48 saat, *E. coli* suşları ise 37 °C’de 200 rpm çalkalanarak 24 saat inkübe edilmiştir. Tüm suşlar ile yeni oluşturulan suşların %20 gliserol (Merck, Almanya) ilave edilerek stokları hazırlanmıştır. Stokları alınan tüm suşlar -80°C’de muhafaza edilmiştir.

**Tablo 2.1:** Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve plazmidler

Suşlar ve Plazmidler	Açıklama	Gelişme Şartları	Besiyeri	Antibiyotik Direnci
<i>L. reuteri</i> E81	4,6 $\alpha$ -glukanotransferaz sentezinden sorumlu doğal suş	37°C	MRS	-
<i>L. lactis</i> NZ 9000	Konakçı Suş	30°C	M17G	-
<i>L. lactis</i> MG 1614	Konakçı Suş	30°C	M17G	-
<i>L. lactis</i> LAC 473	pLEB 825 vektörünü taşımaktadır.	30°C	M17G	Eritromisin
<i>L. lactis</i> PLAC38	pLEB 825 vektöründe, P45 promotörüne ters yönde <i>gtfB</i> genini içermektedir.	30°C	M17G	Eritromisin
<i>L. lactis</i> PLAC39	<i>gtfB</i> genini taşıyan pLEB 825 plazmid vektörünü içermektedir.	30°C	M17G	Eritromisin
<i>E. coli</i> TG1	Ara konakçı suş	37°C, 250 rpm	LB	-
<i>E. coli</i> PEC01	pLEB 124 vektörünü taşımaktadır.	37°C,250 rpm	LB	Eritromisin
<i>E. coli</i> PEC07	Sinyal peptit ( <i>usp45</i> ) genini içeren pLEB597 plazmid vektörünü içerir.	37°C,250 rpm	LB	Eritromisin
pLEB 825	PnisA promotörünü, eritromisin dirençlilik genini ve <i>usp45</i> sinyal serisini içeren vektör.	-	-	-
pLEB 597	Sinyal serisi <i>usp45</i> içeren vektör.	-	-	-

## 2.2 Yöntem

### 2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz (4,6  $\alpha$ -GTaz) enziminin sentezinden sorumlu *gtfB* genini kodlayan *L. reuteri* E81 suşundan genomik DNA izolasyonu genomik DNA izolasyon kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Laktik asit bakterilerinin izolasyon aşamasında DNA izolasyon işlemi kit protokülüne ek olarak lizozim enzimi ile müdahale yapılmıştır. DNA izolasyonu için bir gece geliştirilmiş hücrelerden 1.5 ml alınarak 8 000 x g'de 10 dk santrifüj işlemi yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bakteri hücrelerine 180  $\mu$ l lizozim solüsyonundan (50 mg ml<sup>-1</sup>) eklenmiş ve pipetleme yapıldıktan sonra 37 °C 'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından 20  $\mu$ l proteinaz K ve 200  $\mu$ l genomik liziz solüsyonu eklenmiş ve 50 °C'de 30 dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası 20  $\mu$ l RNAaz ve 200  $\mu$ l etanol solüsyonu (%96-100) eklenmiştir. Her bir örnek ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra lizatlar tutundurma kolonlarına aktarılmıştır. (Kolon hacmi 800  $\mu$ l olduğu için geriye kalan örnekler için de aynı işlem uygulanmıştır.) 10.000 x g 'de 1 dk santrifüj edildikten sonra altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolona 500  $\mu$ l yıkama solüsyonu ilave edilmiş ve 10.000 x g 'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Yıkama işlemi tekrarlanmıştır ve altta kalan sıvının uzaklaştırılmasının ardından kolonda kalan etanolü uzaklaştırmak amacıyla bir kere daha boş santrifüjlenmiştir ve kolonlar 1.5 mL hacme sahip eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir. Daha sonra kolonlar elüsyon tamponundan 50  $\mu$ l eklenerek 2 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 14.000 x g'de 2 dk santrifüjleme işlemi yapılarak örnekler eppendorf tüpünde toplanmıştır. Elde edilen genomik DNA -20 °C de muhafaza edilmiştir.

### 2.2.2 Plazmid İzolasyonu

Tez çalışmasında, hem *L. lactis* hem de *E. coli* hücrelerindeki plazmidler kullanılmıştır. Kullanılan plazmidlerin izolasyonu için Thermo Plazmid İzolasyon Kiti (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. *E. coli* hücrelerinden plazmid izolasyonu için kit

protokolü uygulanmıştır. Ancak *L. lactis* hücrelerinin plazmid izolasyonu için kit protokolüne ek olarak lizozim uygulaması yapılmıştır. Plazmid izolasyonu için *E. coli* hücreleri eritromisin içeren (200 mg/mL) LB broth ortamında ve *L. lactis* hücreleri yine eritromisin içeren (10 mg/mL) M17G (M17 broth + 0.5 % glukoz) ortamında geliştirilmiştir. Geliştirilen hücrelerden 1.5 mL alınarak oda sıcaklığında 8.000 x g'de 10 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra *E. coli* hücrelerine 250 µL RNaz içeren resüspansiyon solüsyonu eklenmiştir. *L. lactis* hücrelerine ise resüspansiyon solüsyonuna ek olarak 180 µL lizozim çözeltisi (50 mg mL<sup>-1</sup>) eklenmiştir ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. *E. coli* ve *L. lactis* hücrelerinin izolasyon aşamaları lizozim uygulamasından sonra aynı şekilde devam etmiştir. Resüspansiyon solüsyonunun ardından 250 µL liziz solüsyonu ve 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklenerek örnekler ters yüz edilerek yavaşça karıştırılmıştır ve bulutsu bir solüsyon elde edilmiştir. Ardından 14.000 x g' de 5 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant tutundurma kolonlarına alınmıştır. Kolona alınan örnekler 14.000 x g de 1 dk santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolona 500 µl yıkama solüsyonu ilave edilmiş ve 10.000 x g 'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Yıkama işlemi tekrarlanmıştır ve altta kalan sıvının uzaklaştırılmasının ardından kolonda kalan etanolü uzaklaştırmak amacıyla bir kere daha boş santrifüjlenmiştir ve kolonlar 1.5 mL hacme sahip eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir. Daha sonra kolonlar elüsyon tamponundan 50 µl eklenerek 2 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 14.000 x g'de 2 dk santrifüjleme işlemi yapılarak örnekler eppendorf tüpünde toplanmıştır. Elde edilen plazmid DNA'lar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

### 2.2.3 Primerler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonları

Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR), sıcaklık döngüsü uygulanan cihazda (Kyratec, Australia) gerçekleştirilmiştir. Bir ekşi hamur izolatu olan *L. reuteri* E81 suşundan *gtfB* geninin amplifikasyonu ve klonlanması amacıyla kullanılan primerler Tablo 2.2 de verilmiştir (Metabion, Almanya).



**Tablo 2.2:** PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler (Altı çizili bölgeler restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleridir.)

Primer	Sekans 5'- 3'	Tm (°C)
GtfB1_F_XhoI	AT <u>CTCGAGT</u> CTGCGGGGGTATTAACCACAAGT	74
GtfB_His_R_ApaI	AT <u>GGGCCCT</u> TAGTGATGGTGATGGTGATGGTTGTTA	77
GtfB1_F	TCTGCGGGGGTATTAACCAC	53
GtfB2_R	AT <u>CTCGAGT</u> TAGTGATGGTGATGGTGATGGTTGTAAAA GTTTAATGAAATTGC	67
Pusp45_F	AGAAAGCTTTAACTTAATGGGAGGAA	53
Pusp45_R	ACA <u>CTC GAG</u> AGC GTA AAC ACC TGA	57
Loop_R	ATA GGG CCC AAA TAA AAG CCC CCT TCG ACT	72
GtfB_S_R	ATT TGC ATT AAT TAC TTG TGG ATA	55
Pnis_F	ACT GCT CGA GAG TCT TAT AAC TAT ACT	68
Ery_F	TGTTAAACCGTGTGCTCTACGACCAAACTA	66
RepScreen_F	GAGGGCAATTATCAGTGTGG	63
Usp45_R	AGC GTA AAC ACC TGA CAA CGG	61
16S_F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	52
16S_R	TACCAGGGTATCTAATCCTGTT	51

**Tablo 2.3:** *gtfB* geninin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR bileşimi

PZR Bileşenleri	Miktar (µL)
Deiyonize su	32.5
10 x Q5 Reaksiyon Tamponu	10
dNTPs (10mM)	1
Forward primer (25µM)	2.5
Reverse primer (25µM)	2.5
Q5 DNA polimeraz	0.5
Kalıp DNA	1
<b>Toplam hacim</b>	<b>50</b>

**Tablo 2.4:** *gtfB* geninin amplifiye edilmesi için kullanılan PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon	98	30 s	x 1
Denatürasyon	98	10 s	
Bağlanma	Tm-5	30 s	x 25-30
Uzama	72	20-30 s/kb	
Son Uzama	72	5 dk	x 1

## 2.2.4 Restriksiyon Endonükleaz, Fosfolizasyon ve Ligaz Uygulamaları

### 2.2.4.1 pLEB 124 Vektörü

Çalışmada klonlama aşamasında iki farklı vektör kullanılmıştır. Bunlardan pLEB124 vektörü *E. coli* PEC01 suşundan izole edilmiştir. Vektör plazmid *HindIII* ve *ApaI* yapışkan uç restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. *E. coli* PEC07'den de pLEB597 plazmidini izole edilmiştir. Bu plazmid kalıp DNA olarak kullanılarak sinyal serisi *usp45*, PZR ile amplifiye edilmiştir. *Usp45* fragmenti *HindIII* ve *XhoI* yapışkan uç restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR ile amplifiye edilen ilgili gen (*gtfB*), *XhoI* ve *ApaI* yapışkan uç restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

(Thermo, Amerika Birleşik Devletleri). Tüm kesilen fragmentler DNA saflaştırma kitinden geçirilmiştir. Elde edilen ürünlerin 260nm ve 280nm dalga boyunda DNA konsantrasyonları ve saflıklarına bakılmıştır. Son olarak tüm fragmentlerin 3.2.3.4'te belirtildiği koşullarda ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 2.5:** Restriksiyon enzimleri ve kesim işlemleri için kullanılan reaksiyon ortamı

<b>Reaksiyon ortamı</b>	<b>Miktar (µL)</b>
<b>Restriksiyon enzimi</b>	1
<b>10x ilgili tampon</b>	2
<b>İlgili fragment (GtfB fragmenti veya vektör plazmid)</b>	(~0,1-0,5 µg DNA)
<b>Deiyonize su</b>	20 µL'ye tamamlandı.

Yukarıda belirtilen reaksiyon ortamı eppendorf içerisinde hazırlandıktan sonra alt üst edilerek karıştırılmış ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 65 °C'de 20 dk bekletilerek enzim inaktive edilmiştir.

#### **2.2.4.2 pLEB 825 Vektörü**

Çalışma boyunca kullanılan diğer vektör olan pLEB825, *L. lactis* LAC 473 suşundan izole edilmiştir. Sirküler vektör kalıp olarak kullanılmış ve Tablo 2.2' de belirtilen loop\_R ve usp45\_R primerleri kullanılarak PZR ile lineer hale getirilmiştir. Ardından PZR ile amplifiye edilen GtfB ile lineer pLEB825 vektörünün ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### **2.2.4.3 Vektör Defosforilasyonu**

Karides alkaline fosfataz (SAP) (New England Biolabs Inc., MA, ABD) ile defosforilasyon işlemi üretici firmanın belirttiği protokole uygun olarak yapılmıştır. Bu uygulamanın amacı, fosfat gruplarının DNA ve RNA'nın 5' uçlarından çıkarılması klonlama uygulamalarında lineer plazmidin yeniden-ligasyonunun önlemektir. Tablo 2.6 da de reaksiyon bileşimi 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından 65 °C'de inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 2.6:** Vektör defosforilasyonu için kullanılan reaksiyon bileşimi

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Miktar (µL)</b>
<b>Deiyonize su</b>	10
<b>10X Reaksiyon Tamponu</b>	4
<b>Vektör DNA</b>	34
<b>SAP (1 U/1 µL)</b>	2
<b>Toplam Hacim</b>	50

#### 2.2.4.4 Ligasyon

Ligasyon, T4 DNA ligaz (New England Biolabs Inc., MA, ABD) enzimi kullanılarak Tablo 2.7’de belirtilen reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. Klonlanacak DNA insert ve vektörleri molar konsantrasyonlarına göre 1:1, 2:1, 3:1 oranlarında denendi. DNA-Vektör molar oranlarının hesaplanmasında <https://nebiocalculator.neb.com/> web sitesinden yararlanıldı.

Aşağıda belirtilen reaksiyon ortamı eppendorf içerisinde alt üst edilerek karıştırıldı. 16 °C bir gece inkübasyona bırakıldı. 65°C’de 15 dk enzim inaktive edildi.

**Tablo 2.7:** Ligasyon işlemi için hazırlanan reaksiyon ortamı

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Miktar (µL)</b>
<b>Doğrusal vektör DNA</b>	400 ng
<b>Insert DNA</b>	DNA boyutuna göre değişken
<b>10x DNA Ligaz Tamponu</b>	2
<b>T4 DNA Ligaz</b>	1
<b>Deiyonize su</b>	20 µL’ye tamamlandı.

#### 2.2.5 Koloni Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tablo 2.7’de verilen reaksiyonun ardından elde edilen rekombinant plazmid DNA’lar ilk olarak ara konakçı suş olan *E. coli* TG1’a ardından *L. lactis* NZ9000 ve *L. lactis* MG1614 konakçı suşlara elektroporasyonla transforme edilmiştir.

Rekombinant plazmidin sahip olduğu antibiyotik direncine uygun olarak hazırlanan besiyerine ekildikten sonra istenen rekombinant plazmidi ihtiva eden kolonileri bulmak amacıyla gelişen koloniler toplanmıştır. Gelişen kolonilerden seçilerek yeni bir seçici besiyerine öze yardımıyla ekilmiştir. Kolonilerin gelişmesinin ardından koloniler bir kürdan yardımıyla alınarak Tablo 2.8’de belirtilen koloni PZR ortamına aktarılmıştır.

**Tablo 2.8:** Koloni PZR için kullanılan reaksiyon ortamı

<b>PZR Bileşenleri</b>	<b>Miktar (µL)</b>
<b>Deiyonize Su</b>	36,25
<b>5X One Taq Standart Reaksiyon Tamponu</b>	10
<b>dNTPs (10mM)</b>	1
<b>Forward Primer (25 µM)</b>	1
<b>Reverse Primer (25 µM)</b>	1
<b>One Taq DNA Polimeraz</b>	0,25
<b>Kalıp DNA</b>	Koloni (~0.5 µL)
<b>Toplam Hacim</b>	50

**Tablo 2.9:** Koloni PZR için kullanılan PZR koşulları

<b>Aşama</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü sayısı</b>
<b>Denatürasyon</b>	94	1 dk 30 s	x 1
<b>Denatürasyon</b>	94	30 s	
<b>Bağlanma</b>	Tm-5	30 s	
<b>Uzama</b>	68	20-30 s/kb	x 25-30
<b>Son Uzama</b>	68	5 dk	x 1

### 2.2.6 DNA Saflaştırma İşlemi

PZR ve restriksiyon enzimleri ile müdahale sonrasında ortamda bulunan primer dimerlerinin, primerlerin, nükleotitlerin, proteinlerin, tuzun, agarozun, etidyum bromürün ve diğer safsızlıkların giderilmesi amacıyla NucleoSpin® Gel and PCR

Clean-up (Macherey-Nagel, Almanya) saflaştırma kiti kullanılmıştır. İlk olarak örnek hacminden 2 kat fazla miktarda NTI tamponu ilave edilmiştir. Karışım 6-7 kez alt üst ederek karıştırıldıktan sonra 700 µL hacme sahip saflaştırma kolonuna alınmıştır. Ardından 11.000 x g'de 30 s santrifüj edilmiştir. Kolonun altında kalan kısım uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi için kolona 700 µL NT3 tamponundan ilave edilerek 11.000 x g'de 30 s santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Altta kalan sıvının uzaklaştırılmasının ardından kolonda kalan etanolü uzaklaştırmak amacıyla bir kere daha boş santrifüjlenmiştir ve kolonlar 1.5 mL hacme sahip eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir. Daha sonra kolonlar elüsyon tamponundan 30 µl eklenerek 2 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 11.000 x g'de 2 dk santrifüleme işlemi yapılarak örnekler eppendorf tüpünde toplanmıştır. Elde edilen plazmid DNA'lar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

### **2.2.7 Kompetent *E. coli* Hücrelerinin Hazırlanması**

*E. coli* TG1 hücresi elektrokompent hücre olarak kullanılmak amacıyla hazırlanmıştır. Öncelikle -20 °C'de muhafaza edilen *E. coli* TG1 suşu, 5 mL LB ortamında 37 °C'de ve 250 rpm karıştırma hızında 1 gece üretilmiştir. Bu hücreler LB Agar içeren petri plaklarına tek koloni düşürülecek şekilde öze aracılığı ile aktarıldıktan sonra, 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Agar ortamlarında üreyen tipik koloniler 5 mL LB ortamı içeren tüplere aktarılmış ve hücreler 250 rpm çalkalama hızında ve 37 °C'de 1 gece geliştirildikten sonra, sıcaklığı 37 °C'ye getirilmiş LB besiyeri ortamına 1/100 aşılama yapılmıştır ve yukarıda belirtilen koşullarda inkübe edilmiştir.

İki saat inkübasyon sonrasında her 15 dk da bir üreme ortamlarının optik yoğunlukları (OD600) belirlendi. OD (600 nm) 0.4-0.6 aralığına ulaşıldıktan sonra, inkübasyon sonlandırılarak, ortam sıcaklığı 4 °C'nin altına düşürüldü. Soğutulan hücre süspansiyonları eşit miktarlarda santrifüj tüplerine dağıtılarak, santrifüj işlemine (10000 rpm'de 20 dk, 4 °C) tabi tutuldu. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, hücre çökeltileri önceden hazırlanarak ve 4 °C'ye soğutulmuş, %10 gliserol içeren steril deiyonize su içerisinde çözüldü. 4 °C'de muhafaza edilen hücre süspansiyonları 10000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek hücre çökeltisi elde edildi. %10 gliserol içeren

deiyonize su ile yapılan yıkama işlemi, 2 kez daha tekrar edildi. Son aşamada hücre çökeltisi başlangıç hücresel hacmin 1/100 oranında %10 gliserollü deiyonize su ile çözülerek, önceden buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 50 µl olacak şekilde dağıtıldı. Bu kompetent hücreler -80 °C’de muhafaza edildi.

### 2.2.8 Rekombinant Plazmidlerin *E. coli* Hücrelerine Elektroporasyonu

Elektrokompetent hücrelerinin hazırlanmasının ardından rekombinant plazmidlerin *E. coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Öncelikle -80’de muhafaza edilen kompetent hücreler 2 mm aralığa sahip elektroporasyon kuvvetlerine (Bio-rad, CA, ABD) alınıp buz üzerinde bekletildi. -20 °C’de muhafaza edilen rekombinant plazmidi içeren ligasyon karışımı da buz üzerinde çözündürüldükten sonra 5 µL alınarak, kompetent hücreler ile (50 µL) karıştırıldı. Bu karışım 10 dk buz üzerinde inkübe edildi ve pipet yardımıyla elektroporasyon kuvveti içerisine hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarıldı. *E. coli* hücreleri için 2.5 kV, 200Ω ve 25 µF değerleri cihaza girilerek yaklaşık 5-6 saniyeye tekabül eden elektrik uygulaması yapıldı. Elektroporasyon uygulanmış hücrelerin üzerine 1 mL geliştirilmiş besiyeri ortamına (Tablo 2.10) ilave edildi ve 2 saat bu ortamda inkübe edildikten sonra, 200 µg mL<sup>-1</sup> eritromisin içeren LB agar plaklarına yayıldı. LB agar ortamları 37 °C’de 48 saat inkübe edildi.

**Tablo 2.10:** SOC ortamı bileşimi

SOC ortamı	Miktar
<b>Tripton</b>	2 g
<b>NaCl</b>	0,5 g
<b>KCl (1M)</b>	0,25 mL
<b>MgSO<sub>4</sub> (1M)</b>	2 mL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	97 mL

pH, 4 N NaOH kullanılarak 7,0’a ayarlandı ve ortam 121 °C’de 15 dk sterilize edildi. Ortam kullanılmadan hemen önce 18 µL (1 mL için) 1 M glukoz ilave edildi.

### 2.2.9 Kompetent *L. lactis* Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetent *L. lactis* hücrelerinin hazırlanması amacıyla -80 °C’de muhafaza edilen *L. lactis* NZ9000 ve *L. lactis* MG1614 suşu M17G ortamında 30 °C’de 12 saat süreyle üretildi. Daha sonra hücreler M17G agar üzerinde tek koloni oluşturacak şekilde ekim yapıldı. Üreyen koloniler %1 glisin içeren M17G ortamına aktarıldı (1/100) ve optik yoğunluk (OD600) 0.2-0.4 aralığına gelinceye kadar inkübe edildi. Hedeflenen yoğunluğa erişildikten sonra ortam buz üzerinde soğutuldu ve 7000 rpm’de, (4 °C’de 7 dk) santrifüj edilerek hücreler toplandı. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 4 °C’ye soğutulmuş elpo tamponu içerisinde çözüldü. Bu ortam tekrar 7000 rpm’de (4 °C’de 7 dk) santrifüj edildi (Yıkama ve santrifüj işlemi 4 kez yapıldı). Son basamakta hücreler başlangıç kültür hacmin 1/100’ü oranındaki yıkama çözeltisi içerisinde çözülerek, önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine (100 µL) dağıtıldı ve -70 °C’de saklandı.

### 2.2.10 Rekombinant Plazmidlerin *L. lactis* Hücrelerine Elektroporasyonu

*L. lactis* hücrelerine yapılan elektroporasyon uygulamalarında; *E. coli* hücreleri için takip edilen basamaklar uygulandı. Tek fark olarak cihaza girilen değerler 2.5 kV, 400Ω ve 25 µF olarak değiştirildi ve 6-7 saniyeye tekabül eden elektrik uygulaması yapıldı. Ayrıca elektrik akımı uygulandıktan sonra hücreler ifade ortamına alındı ve 2 saat inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra hücre seyreltilerinden M17G (10 µg mL<sup>-1</sup>) agar ortamına yayma ekimi yapıldı. 30 °C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

**Tablo 2.11:** *Lactococcus lactis* hücrelerine elektroporasyon boyunca kullanılan solüsyonlar ve içerikleri

Solüsyon	İçerik
<b>M17G</b>	M17 + %0,5 Glukoz
<b>M17GS</b>	2x M17+0.5 M Sakkaroz + %0,5 Glukoz
<b>Elpo Tamponu</b>	0.5 M Sakkaroz + %15 Gliserol + Deiyonize su
<b>İfade ortamı</b>	M17GS sıvı besiyeri + 2mM CaCl <sub>2</sub> + 20mM MgCl <sub>2</sub>



### 2.3 Rekombinant Plazmid İçeren Hücrelerden Protein Ekspresyonu ve Ekstraksiyonu

Glukanotransferaz geni (*gtfB*), nisin indeklenebilir Pnis promotörünü içeren pLEB825 vektörüne klonlandı ve bu rekombinant plazmid önce ara konakçı olan *E. coli* TG1 elektrokompotent hücrelerine transforme edildi. Eritromisin içeren LB agar ortamından pozitif olduğu düşünülen koloniler seçildi. Seçilen koloniler 5 mL LB (200µg mL<sup>-1</sup>) ortamında 1 gece geliştirildi. Ardından geliştirilen kültürlerden 3.2.2.'deki protokole uyularak plazmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmidler jel elektroforezde görüntülendi. İstenen plazmid boyutuna sahip olanlar seçildi ve ilgili geni içerip içermediğine dair kontrol etmek için, izole edilen plazmidler kalıp olarak kullanıldı ve Loop\_R ve GtfB1\_F primerleri ile PZR yapıldı. Pozitif olduğu düşünülen rekombinant plazmidler *L. lactis* NZ9000 elektrokompotent hücrelerine transforme edildi. Eritromisin içeren M17G agar ortamından, ilgili koloniler seçildi. Seçilen koloniler 5 mL M17G (5 µg mL<sup>-1</sup>) sıvı besiyerinde 1 gece geliştirildi ve ardından 3.2.2.'de belirtildiği gibi plazmid izolasyonu yapıldı. Rekombinant hücrelerden pozitif olduğu düşünülen klonlar %20 gliserol ilave edilerek -80°C'de muhafaza edildi.

Enzim retimi için -80°C'deki muhtemel klonlar, 5 mL M17G ve eritromisin (10 µg mL<sup>-1</sup>) içeren ortamda 1 gece geliştirildi. Ardından 100 mL M17G ve eritromisin (10 µg mL<sup>-1</sup>) ortamına %1 inokülasyon yapıldı. OD600nm 0.3-0.4 aralığına geldiğinde 10000 IU mL<sup>-1</sup> nisin stok zeltisinden son nisin konsantrasyonu 50IU mL<sup>-1</sup> olacak şekilde ilave edilmiştir ve hücreler 8 saat gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon sresinin bitmesinin ardından alınan hücreler 7000 x g'de 7 dk santrifüj edilmiş (Hettich Universal 30 RF, Almanya) ve ken hücrelerin karışmamasına dikkat edilerek süpernatant steril bir tüpe alınmıştır. Alınan süpernatant örnek hacmi 15 mL olan Amicon® Ultra-15 (MiliporeSigma, Almanya) santrifüj filtrelerinden geçirilerek ilgili enzim dışındaki proteinlerin elimine edilmesi hedeflenmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen rnekler -20 °C'de 1 gece bekletilmiştir ve GtfB enziminin saflaştırılması için HisPur™ Ni-NTA Spin (Thermo, USA) saflaştırma kiti kullanılmıştır. Protein saflaştirmasında üretici firmanın protokolünden yararlanılmıştır. Ekstrakte edilen enzim -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

## 2.4 4,6 $\alpha$ -Glukanotransferaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

4,6  $\alpha$ -Glukanotransferaz (GtfB) enziminin aktivitesi sonucu farklı polimerizasyon derecelerine sahip amiloz, maltooligasakkarit, patates nişastası gibi substratlardaki  $\alpha$ -1,4 bağlarını parçalayarak ve geriye kalan glukoz ünitelerine de  $\alpha$ -1,6 bağı eklenmesiyle birlikte son ürünlerde farklılıklar meydana gelmektedir. GtfB enziminin HisPur™ Ni-NTA Spin (Thermo, USA) saflaştırma kitinden geçirilerek saflaştırılmasının ardından enzim aktivitesine bakılmıştır. GtfB enzimin aktivitesini tespit etmek amacıyla, %1 Amiloz V (AVEBE, Hollanda) stok solüsyonu 20 mg Amiloz V, 1 ml distile su ve 1 mL 2 M NaOH'da çözündürülerek hazırlanmıştır. Bu solüsyona ek olarak, aktivite testinden hemen önce nötralizasyon sağlamak amacıyla reaksiyon ortamıyla eşit hacimde 1 M HCl ilave edilmiştir. Stok solüsyonu kullanılarak aktivite testi için %0.25 Amiloz V, 25 mM NaAc ve 1mM CaCl<sub>2</sub> ile reaksiyon ortamı oluşturulmuştur. Oluşturulan 500  $\mu$ L reaksiyon ortamına 5, 10, 50, 100  $\mu$ L enzim ilavesi yapılarak 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan ürünlerin kontrolü amiloz-iyodin testi ile yapılmıştır (Bai ve diğ. 2015).

Amiloz-iyodin testi için 0.26 g iyot ve 2.6 g potasyum iyodür (KI) 10 mL suda çözündürülerek stok solüsyonu (260 kat) hazırlanmıştır. Bu solüsyon seyreltildikten sonra (1 kat) 150  $\mu$ L alınarak 15  $\mu$ L enzim ile inkübasyona bırakılmış reaksiyon ortamıyla karıştırılmıştır. OD660 nm de okuma yapılmıştır.

GtfB ve substratların reaksiyonları sonucunda oluşan oligosakkaritler, reaksiyon ürünlerinin TLC plakalarına (silica gel 60 F254, 20 x 20 cm TLC sheets Merck, Darmstadt, Almanya) yüklenerek ürünler bütanol: etanol:su (5:5:3) çözücü sisteminde yürütülmesi ile tespit edilmiştir. Ürünler, çözücü sistemde 6 saat yürütülmüş ve takiben reaksiyon ortamındaki karbonhidratlar metanol: sülfürik asit (1:1) çözeltilisine daldırıldıktan sonra ısı uygulamasına maruz bırakılarak gözlemlenmiştir.

## 2.5 Rekombinant Proteinlerin SDS-PAGE ile Belirlenmesi

Saflaştırılan enzimin moleküler büyüklüğü trisin-sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforez (Trisin-SDS-PAGE) sistemi kullanılarak belirlenmiştir (Schagger ve von Jagow 1987). Trisin-SDS-PAGE uygulamasında, Laemmli (1970)

tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Dikey jel elektroforez sisteminde, 10x8 cm ve 10x7.5 cm ebatlarındaki cam plakalar Bio-Rad jel hazırlama sistemine yerleştirilmiştir. Çalışmada üretilen enzimin büyüklüğü yaklaşık olarak 160 kDa olduğu düşünüldüğü için %8 lik ayırıcı jel ve %4 lük yığıma jel hazırlanmıştır. İlk olarak hazırlanan ayırıcı jel, jel tarağının 1 cm altına gelecek şekilde iki plaka arasına dökülmüştür ve üzerine yaklaşık 2 ml distile su eklenmiş ve ayırıcı jelin polimerizasyonu için yaklaşık 1 saat beklenmiştir. Süre sonunda filtre kâğıdı yardımıyla ortamdaki su alınmıştır. Daha sonra iki plaka arasına yığıma jel dökülmüştür ve jel tarağı yerleştirilmiştir. Yığıma jelin polimerizasyonu için yaklaşık 30 dk beklenmiştir.

Hazırlanan enzim örnekleri jel kuyucuklarına 30 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Örneklerin elektroforezi önce 50 V elektrik akımında 1 saat, daha sonra 100 V elektrik akımında 3 saat olacak şekilde gerçekleşmiştir. Elektroforezi takiben sistemden çıkarılan jel önce 45 dk boyama çözeltisinde tutulduktan sonra 45 dk boya giderme çözeltisinde tutulmuştur. Elde edilen jel görüntülerinin beyaz ışık altında incelenerek protein boyutları Color Prestained Protein Standard'ı (New England Biolabs Inc., MA, ABD) ile kontrol edilmiştir.

## **2.6 Rekombinant Proteinlerin Western-Blot Yöntemi ile Doğrulanması**

Western-Blot analizi (Sambrook ve diğ. 1989) ve (Wang ve Chao 2006) tarafından önerilen yöntemler kombine edilerek kullanılmıştır. Yapılan çalışmada His-Tag içeren proteinlerin doğrulanması amacıyla Western Blot işlemi uygulanmıştır. Bölüm 2.5'te belirtilen şekilde SDS-PAGE uygulaması yapılmıştır. Yığıma için %4, ayırma için %8 akrilamid/bis-akrilamid (Bioshop, Ontario, Kanada) derişiminde hazırlanan poliakrilamid jelle yüklenerek önce 50 V'da 1 saat, takiben 100 V'da 3 saat yürütülmüştür. Daha sonra jeller hemen transfer tamponuna (1,92 M Glisin, 0,25 M Tris) aktarılmış ve dengeleninceye kadar tutulmuştur. Takiben jeller yarı-kuru Western-Blot sistemine (Bio-rad) yerleştirilmiştir. Poliakrilamid üzerinde bulunan proteinler PVDF (Milipore) membranına 15 V da aktarım yapılmıştır. Aktarım izlenebilir proteinin markerin (New England Biolabs Inc., MA., ABD) geçişi

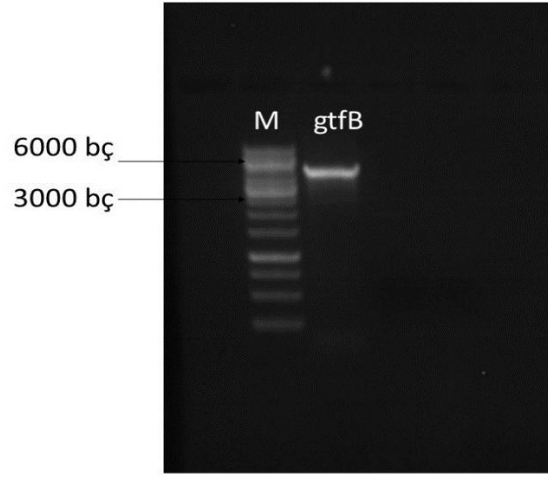
tamamlandığında durdurulmuştur. Yarı-kuru Western-Blot sisteminden PVDF membran dikkatle alınarak PBST (PBS+%0,1 Tween20) tamponunda %5 süt tozu içeren solüsyonda 1 saat tutulmuştur.

Yukarıda sıralanan aşamalardan sonra, membran üzerinde füzyon proteinin varlığının araştırılması işlemlerine geçilmiştir. Öncelikle membran 2 kez PBST tamponunda iyice yıkanmıştır. Takiben membran PBST tamponuyla 1/5000 oranında seyreltilmiş tavşan spesifik HisTag-antikoru (New England Biolabs Inc., MA, ABD) içeren solüsyonuna alınmış ve 1 gece 4°C'de 100 rpm'de çalkalanmıştır. Bir gece sonunda spesifik olmayan bağlantıların uzaklaştırılması için membran PBST tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra membran yine PBST tamponu ile 1/10000 oranında seyreltilmiş antijeni (Anti-rabbit-IgG AP-konjuge, Promega) içeren solüsyona alınmış ve 1 saat 100 devirde çalkanarak inkübe edilmiştir. Takiben II. antikorun uzaklaştırılması amacıyla membran tekrar 3 kez yıkanmış ve son aşamada membranın üzerine 10 ml substrat (Western-Blue, Promega) konularak renk değişimi ile füzyon proteinlerin membran üzerindeki yeri tespit edilmiştir.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 *L. reuteri* E81'den *gtfB* Geninin Klonlanması

Yapılan çalışmada *L. reuteri* E81'de kodlanan *gtfB* genini *L. lactis* hücrelerine transfer etmek amacıyla 4860 bç lik gen bölgesinin tamamı PZR ile çoğaltılmış ve ilgili gen bölgesi nisin indüklenebilir promotör olan PnisA ve laktokoklarda hücre dışı enzim salgılamadan sorumlu *usp45* sinyal serisini içeren pLEB825 vektörüne klonlanmıştır. Öncelikle ilgili gen bölgesi Tablo 2.2'de belirtilen primerler kullanılarak PZR ile ampfiliye edilmiştir (Şekil 3.1).



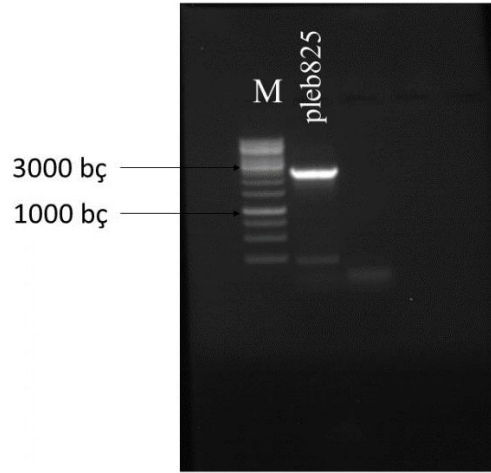
**Şekil 3.1:** *Lactobacillus reuteri* E81 genomundan *gtfB* geninin ampfiliye edilmesini gösteren agaroz jel görüntüsü

Daha sonra elde edilen *gtfB* fragmenti, Bölüm 2.2'de belirtildiği gibi iki farklı strateji ile klonlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.1 Strateji 1: pLEB825 Vektörüne *gtfB* Geninin Klonlanması

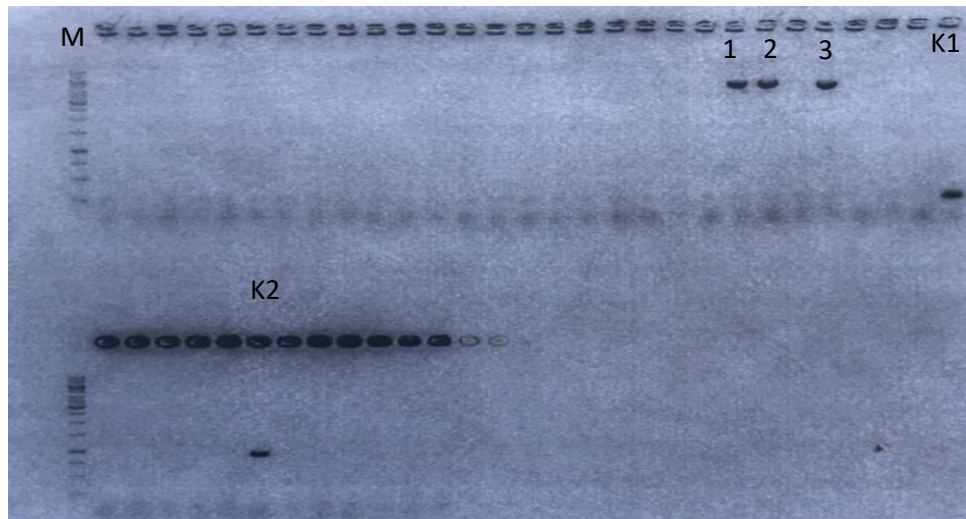
Klonlama işlemi için tasarlanan stratejilerden birincisinde, kullanılan Pnis promotörüne ve laktik asit bakterilerinde hücre dışı enzim üretiminden sorumlu *usp45* sinyal peptidine sahip olan vektör pLEB825, *usp45\_R* ve *loop\_R* primer çifti

kullanılarak PZR ile lineer hale getirilmiştir. Şekil 3.2’de PZR sonucu elde edilen vektörün agaroz jeldeki görüntüsü gösterilmektedir.



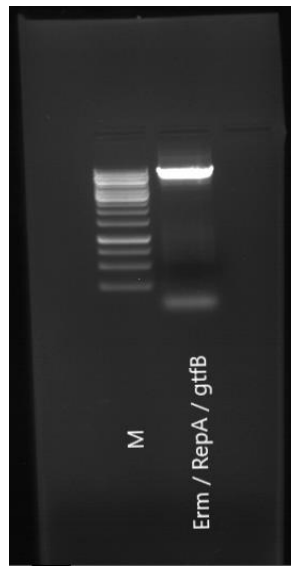
Şekil 3.2: PZR ile amplifiye edilen lineer pLEB825 vektörünün agaroz jel görüntüsü

Elde edilen lineer vektör DNA saflaştırma kitinden geçirmiş ve self ligasyonu önlemek amacıyla defosforilizasyon işlemi yapılmıştır ve *gtfB* geni bu vektöre eklenmiştir. Elde edilen rekombinant plazmid önce ara konakçı olan *E. coli* TG1 hücrelerine, ardından *L. lactis* NZ9000 hücrelerine transforme edilmiştir. Rekombinant plazmidleri içeren yaklaşık 100 laktokok hücreye koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR sonucu 3 adet pozitif koloni tespit edilmiştir (Şekil 3.3).



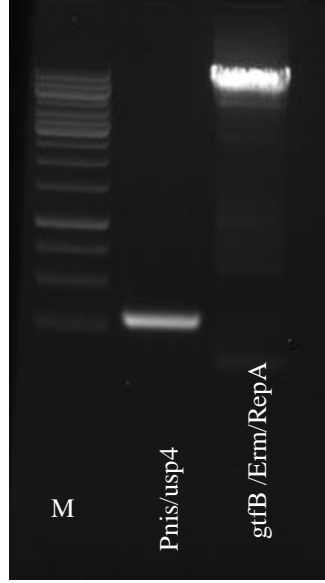
Şekil 3.3: Koloni PZR ile *Lactococcus lactis* hücrelerinden elde edilen pozitif kolonilerin agaroz jel görüntüsü

Ancak bu hücreler içerisinde yer alan rekombinant plazmidlerdeki *gtfB* geninin Pnis promotörüne ters yönde bağlandığı Pnis\_F ve RepScreen\_F primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucu tespit edilmiştir. Hücre dışı enzim üretimini sağlamak amacıyla, Pnis promotörüne ters yönde bağlı plazmid kalıp olarak kullanılarak klonlama işlemine devam edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle GtfB\_R ve Erm\_F primerleri kullanılarak PZR ile yaklaşık 7-8 kb boyutunda lineer bir plazmid elde edilmiştir (Şekil 3.4). Plazmidin bu kısmından P45 ve *usp45* sinyal serisinin dışındaki bölge çoğaltılmıştır. Ardından bu bölge self ligasyon yapılarak *E. coli* TG1'da tekrar çoğaltılmıştır.



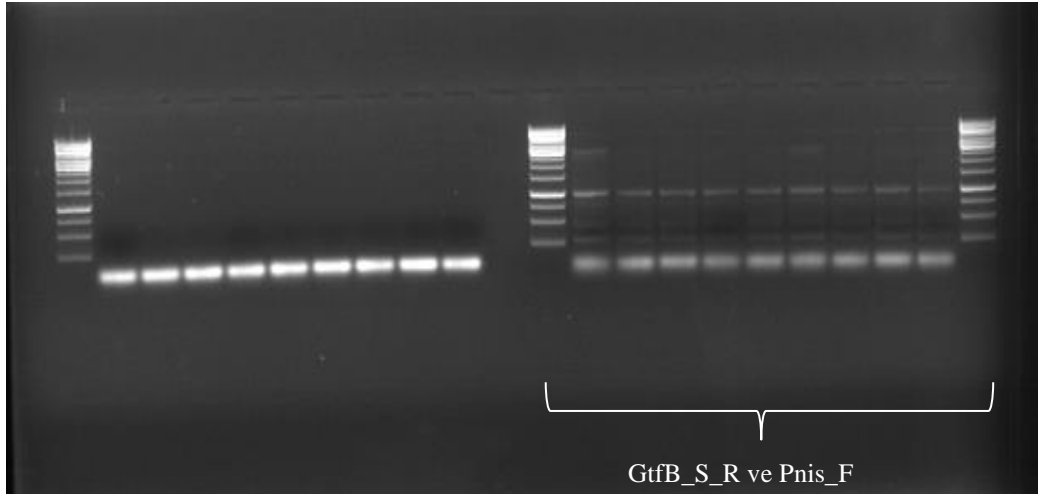
Şekil 3.4: GtfB\_R ve Erm\_F primerleri kullanılarak PZR ile amplifiye edilen lineer vektörün agaroz jel görüntüsü

Elde edilen plazmid kalıp DNA olmak üzere Loop\_R ve GtfB\_F primerleri kullanılarak plazmid tekrar lineer hale getirilmiştir. Aynı zamanda Şekil 3.2 'de gösterilen plazmid kalıp olarak kullanılmış ve Pnis/Usp45 bölgesi PZR ile amplifiye edilmiştir (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5:** PnisA promotörü ve *usp45* sinyal serisinin ve Loop\_R ve GtfB\_F primerleri kullanılarak PZR sonucu elde edilen linear vektörün agaroz jel görüntüsü

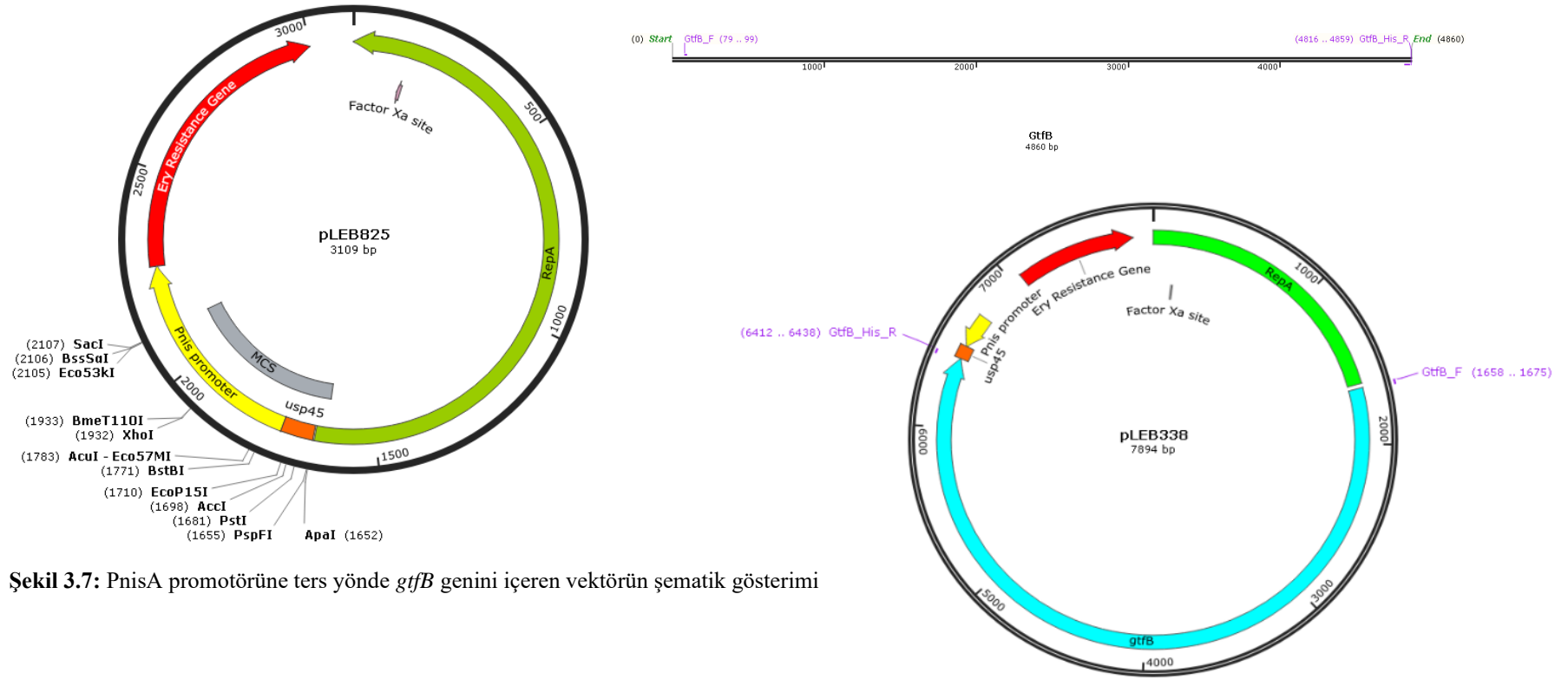
Elde edilen fragmentler ligasyon ortamında birleştirilerek GtfB-pLEB825 plazmidi elde edilmiştir. Elde edilen plazmidin *L. lactis* NZ9000'e transformasyonu sonucu gözlemlenen pozitif olduğu düşünülen koloniler toplanmış ve bu kolonilerin GtfB\_S\_R ve Pnis\_F primerleri ile koloni PZR yapılması sonucunda doğruluğu kanıtlanmıştır (Şekil 3.6).



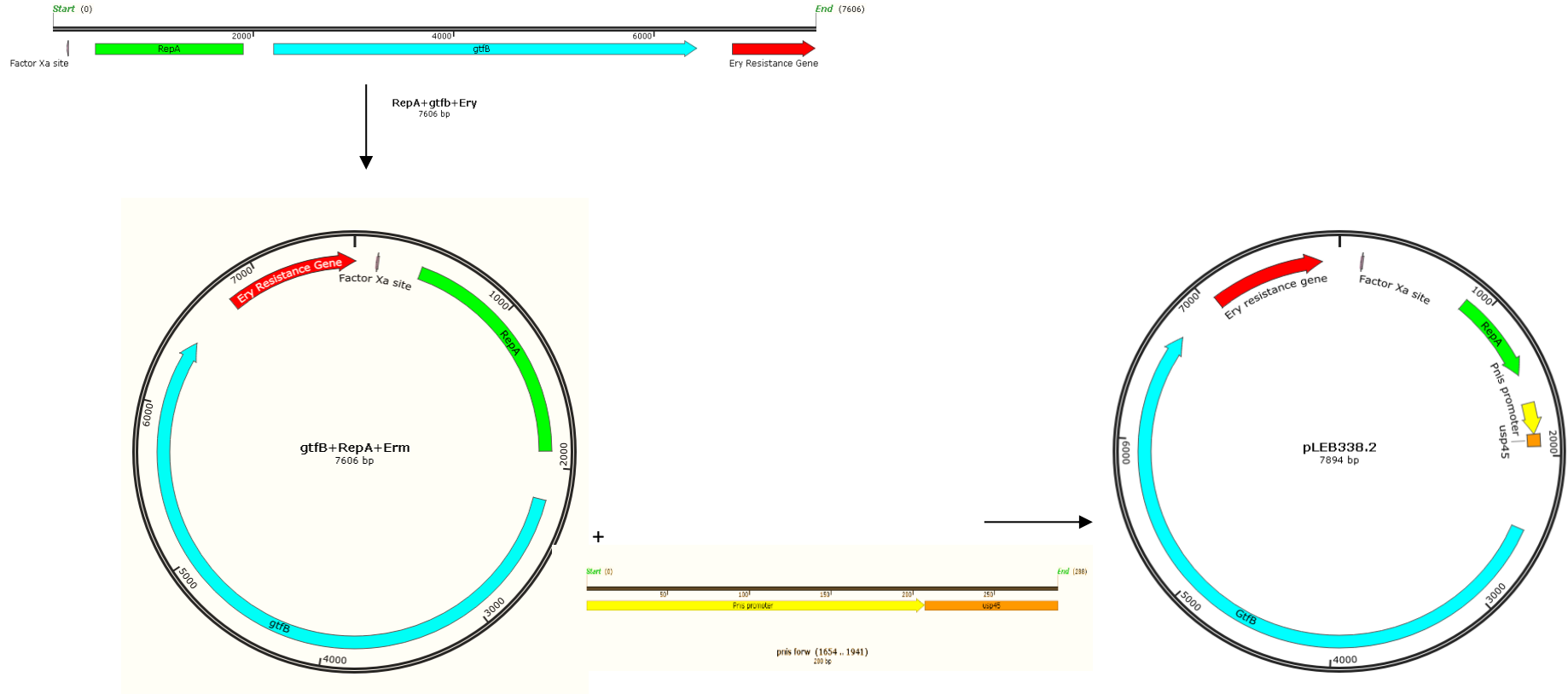
**Şekil 3.6:** Koloni PZR ile *Lactococcus lactis* hücrelerinden elde edilen pozitif kolonilerin agaroz jel görüntüsü



### 3.1.2 Protein Ekspresyonunda Kullanılan Plazmidlerin Oluşturulması



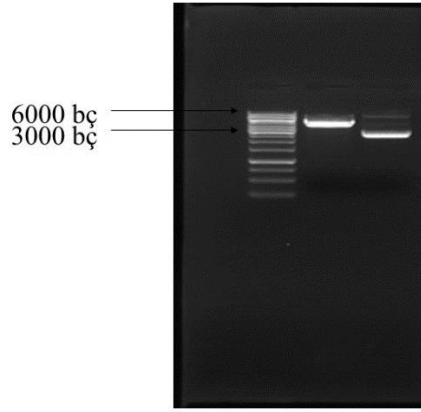
Şekil 3.7: PnisA promotörüne ters yönde *gtfB* genini içeren vektörün şematik gösterimi



Şekil 3.8: Ligasyon sonrası elde edilen indüklenebilir PnisA promotörü ile GtFB enzim üretim vektörünün şematik gösterimi

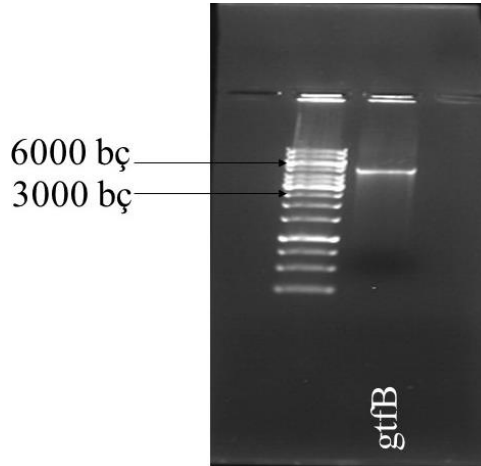
### 3.1.3 Strateji 2: pLEB124 Vektörüne *gtfB* Geninin Klonlanması

GtfB enziminin hücre dışı üretilmesi için yapılan diğer bir klonlama stratejisinde ise sürekli çalışan laktokok promotörü P45 ve eritromisin dirençlilik genini içeren 4.5 kb'lık sahip vektör olan pLEB124, *HindIII* ve *ApaI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilmiştir (Şekil 3.9).



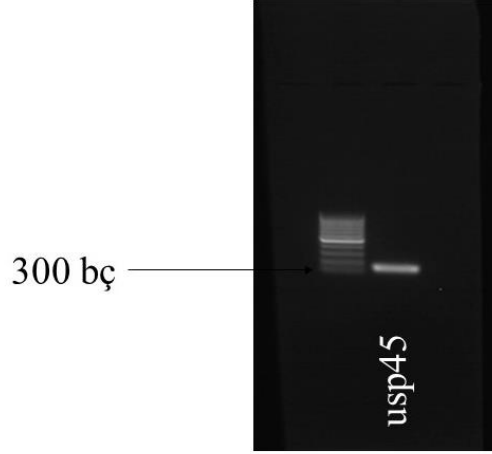
**Şekil 3.9:** pLEB124 vektörünün *HindIII* ve *ApaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen lineer vektörün ve pLEB124 vektörünün ekstraksiyon sonrası agaroz jel görüntüsü

*L. reuteri* E81 genomik DNA'sından GtfB1\_F\_XhoI ve GtfB\_His\_R\_ApaI primerleri kullanılarak *gtfB* geninin tümü amplifiye edilmiştir (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10:** *Lactobacillus reuteri* E81'den elde edilen *gtfB* geninin agaroz jel görüntüsü

Ayrıca laktokoklarda hücre dışı enzim üretiminden sorumlu sinyal serisi *usp45* bölgesi de pLEB597 vektörü kalıp olarak kullanılarak PZR ile ampfiliye edilmiştir (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11:** pLEB597 plazmidinden elde edilen *usp45* sinyal serisinin agaroz jel görüntüsü

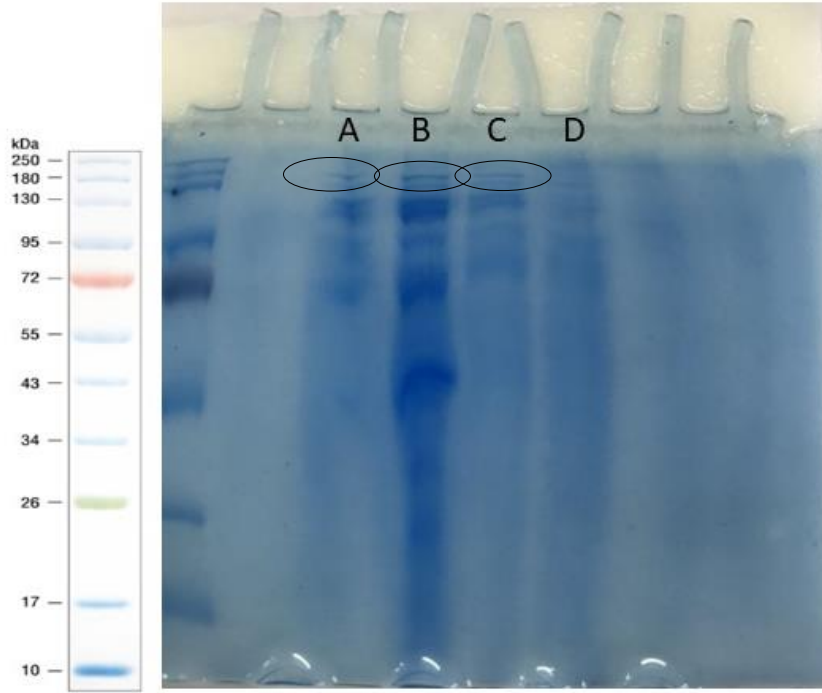
Elde edilen *usp45*, *gtfB* ve lineer pLEB124 fragmentleri ligasyon işlemi ile birleştirilmiştir. İkinci strateji sonrasında elde edilen rekombinant plazmidler ara konakçı olan *E. coli* TG1 hücrelerine, ardından *L. lactis* MG1614 hücrelerine transforme edilmiştir. Ancak toplanan tüm kolonilerde *gtfB* genini içerdiğini işaret eden fragmnet çoğaltılamamıştır. Bu sonuç sürekli promotör altında oldukça büyük bir genin laktokok hücrelerinde ifade edilmesinin güç olduğuna işaret etmiştir.

### 3.2 *Lactococcus lactis* NZ9000'de Eksprese Edilen Proteinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi

Rekombinant *L. lactis* NZ9000 suşlarının kültür üst sıvılarından ilgili GtfB enziminin saflaştırılması iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. 8 saat indüklemeye sonrasında elde edilen kültür üst sıvısı 1) süpernatant örnek hacmi 15 mL olan Amicon® Ultra-15 (MiliporeSigma, Almanya) santrifüj filtrelerinden geçirilerek 2) süpernatantın HisPur™ Ni-NTA Spin (Thermo, USA) saflaştırma kiti ile saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda saflaştırılan örnekler konsantre edilmiştir.

Saflaştırılan GtfB enziminin trisin sodyum dodezil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (Trisin-SDS-PAGE) sistemi kullanılarak yapılan analiz sonucu; moleküler büyüklükleri yaklaşık olarak 160 kDa büyüklüğünde bir proteinin varlığına işaret etmiştir. SDS-PAGE görüntüsü *L. lactis* PLAC39 suşunda nisin indüklenmesi sonucunda 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimini üretebildiğine işaret etmiştir.

*L. lactis* son yıllarda protein üretimi açısından iyi bir konakçıdır. Bununla ilişkili olarak birçok proteinin üretildiği rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmada 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz enziminin üretilmesi ilk defa başarılmıştır. Daha da önemlisi hücre dışına salgılanan enziminin büyüklüğü oldukça fazladır. Büyüklük bakımından da değerlendirildiğinde *L. lactis*'te bu boyutun sentezi önemli bir adım olarak kabul edilebilir.



**Şekil 3.12 :** Rekombinant proteinlerin SDS-PAGE ile belirlenmesi (*L. lactis* NZ9000 de ifade edilen pLEB825/GtfB klonunun 8 saat nisin (50U/mL) ile indüklenme yapılmasının ardından elde edilen supernatantın a) süpernatantın Amicon® Ultra-15 (MiliporeSigma, Almanya) santrifüj filtrelerinden geçirilmesi ile elde edilen enzim b) Amicon® Ultra-15 (MiliporeSigma, Almanya) santrifüj filtrelerinden geçirildikten sonra kurutularak konsantre edilen enzim c) süpernatantın HisPur™ Ni-NTA Spin (Thermo, USA) saflaştırma kiti ile saflaştırılan enzim d) süpernatantın HisPur™ Ni-NTA Spin (Thermo, USA) saflaştırma kiti ile saflaştırıldıktan sonra kurutularak konsantre edilen enzim)

### 3.3 *L. lactis* PLAC39 Tarafından *in vitro* Üretilen GtfB Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzimin aktivitesi amiloz, maltodekstrin ve maltozun substrat olarak kullanıldığı 25 mM NaAc, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 4.7 ile oluşturulan reaksiyon ortamına 50 µl, 100 µl ve 200 µl saflaştırılan enzimin ilavesinin ardından 37 °C inkübasyon sonrasında oluşan ürünler TLC ve amiloz-iyot testi ile belirlenmiştir.

Şekil 3.19 'da görüldüğü gibi GtfB enziminin bulunduğu reaksiyonlardan (B, D ve F) maltodekstrin, maltoz veya amiloz substratları kullanılarak daha büyük oligosakkaritlerin oluştuğu görülmektedir. Bu reaksiyonlar söz konusu enzimin maltodekstrinler üzerinde daha etkili olduklarına işaret etmektedir. TLC görüntüleri izlendiğinde enzimin maltozdan çok büyük yapıları oluşturamadığı görülmektedir.



**Şekil 3.13:** *Lactococcus lactis* PLAC39 suşu tarafından üretilen GtfB enziminin amiloz, maltodekstrin ve maltoz üzerindeki aktivitelerini gösteren TLC görüntüsü (substratlarının bulunduğu reaksiyon ortamında 37°C, 24 saat inkübasyon sonucunda açığa çıkan ürünlerin TLC görüntüsü, Reaksiyon ortamında 25mM sodyum asetat, 1mM CaCl<sub>2</sub> pH 4.7 A; Maltodekstrin(kontrol), C; Maltoz (kontrol), E; Amiloz (kontrol), B; 25 mM Maltodekstrin D; 25 mM Maltoz, F; %0.125 Amiloz substratları ile oluşturulan enzim-substrat reaksiyonları)

#### 3.4 *L. lactis* PLAC39 Suşu Tarafından *in vitro* GtfB Enzimi Üretiminin Gösterilmesi

GtfB enziminin PZR ile amplifiye edilme aşamasında, GtfB\_His\_R\_ApaI primerinde (5'ATGGGCCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTTGTTA 3') His-tag protein takısı yer almaktadır. SDS-PAGE jel görüntüsünde gözlemlenen bantların istenen protein olup olmadığını tespit etmek amacıyla Western-Blot analizi yapılmıştır. Şekil 3.20'de belirtilen bantlar Western-blot işlemi sonrasında His-tag antibody ile reaksiyona girmiş GtfB proteininin varlığını temsil etmektedir. Bu sonuç *L. lactis* PLAC39 tarafından nisin indüklemesi sonucunda GtfB enzimini üretebildiğini göstermektedir.



**Şekil 3.14:** *Lactococcus lactis* PLAC39 suşunun ürettiği GtfB enziminin varlığını gösteren Western-Blot görüntüsü

Laktik asit bakterilerinde tespiti oldukça yeni yapılan 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz enzimi bugüne kadar *E. coli* 'de *in vivo* üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Bai ve diğ. 2015).

İspirli ve diğ., (2019) tarafından yapılan çalışmada *Lactobacillus reuteri* E81 suşunda tanımlanan 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz enziminin *in vitro* koşullarda ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak maltoz ve maltoheptoz kullanılması ve ilgili enzimin katalitik etkisi ile birlikte  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) ve  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) bağlarına sahip doğrusal maltooligosakkaritlerin sentezi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu oligosakaritler, *in vitro* koşullar altında test edilen anti-enflamatuar IL-4 ve proinflamatuar IL-12 sitokinlerini tetikleyerek, malto-oligosakkaritlerin potansiyel fonksiyonel rollerini ortaya çıkararak önemli immün modüle edici fonksiyon seviyeleri göstermiştir (İspirli ve diğ. 2019b).

Bu tez çalışmasında ise ilk defa endüstriyel kullanım yönünde *L. lactis*'te *in vitro* üretimi başarılmıştır. Söz konusu enzimin oldukça büyük bir proteine sahip olmasından dolayı SDS-PAGE ve Western Blot analizlerine göre düşük miktarda üretilebilmiştir. Daha da önemlisi hücre dışına salgılanan enzimin büyüklüğü oldukça fazladır. Bu açıdan değerlendirildiğinde de *L. lactis*'te bu boyutta bir proteinin sentezi önemli bir adım olarak kabul edilebilir.



## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda nişasta ve maltooligosakkaritlere özgül spesifik etkisi bulunan ve özellikle laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen GH70 enzim ailesine mensup glukanoferazların (GTaz) moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıyla beraber bu enzimler önem kazanmıştır. Ancak glukanoferazların karakterizasyonlarına yönelik çalışmaların hız kazanmasına rağmen bu enzimlerin büyük ölçek üretimleri için hücre dışı üretimi sağlayacak rekombinant hücre sistemlerine ihtiyaç vardır. Yapılan bu çalışmada, GH70 enzim ailesine mensup olan 4,6  $\alpha$ -glukanoferaz enziminin heterolog hücre dışı üretimi *L. lactis*'te gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada ekşi hamurdan izole edilen *L. reuteri* E81 suşunda 4,6  $\alpha$ -glukanoferaz (4,6- $\alpha$ -GTaz) enziminin sentezinden sorumlu *gtfB* geni tespit edilmiştir. Bu genin ekspresyonu amacıyla gene uygun vektörün hazırlanması ve uygun primerler tasarlanmasının ardından klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 4,6  $\alpha$ -glukanoferaz enziminin heterolog hücre dışı üretimi nispetle uyarılan *Lactococcus lactis* NZ9000'de gerçekleştirilmiş, saflaştırılan enzimin SDS-PAGE, Western-Blot yöntemleri ile doğrulaması yapılmıştır. Elde edilen enzimin aktivitesi, amiloz V ve maltodekstrin gibi substratlarda aktif olduğu belirlenmiş ve oluşan yeni ürünler TLC ile gösterilmiştir. Tez çalışması boyunca elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Bu çalışmada *L. reuteri* E81 suşunun genom dizi analizi incelenmiş ve *gtfB* (4860bp) geni içerdiğinin tespitinden sonra genetik düzenlemeler yapılarak ilgili gen bölgesi, PnisA promotörünü ve laktokoklarda hücre dışı enzim salgılamasından sorumlu *usp45* sinyal serisini ihtiva eden pLEB825 vektörüne klonlanmıştır.
2. Elde edilen rekombinant plazmid *Lactococcus lactis* NZ9000 'e başarıyla atılmıştır. Böylece 4,6  $\alpha$ -glukanoferaz enzimini hücre dışı üretebilen *L. lactis* PLAC39 hücreleri elde edilmiştir. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda glukanoferazların yapısal ve biyokimyasal özelliklerinin karakterize edilmiş olmasına rağmen hücre dışı üretiminin yapılmamış olmasından dolayı elde edilen rekombinant *L.*

*lactis* hücreleri oldukça önemlidir ve ileride yapılacak çalışmalara ışık tutmaktadır.

3. Bu çalışma kapsamında elde edilen rekombinant *L. lactis* PLAC 39 hücrelerinden GtfB enziminin saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiş ve saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE yöntemi ile yaklaşık olarak 160 kDa olarak belirlenmiştir. Tespit edilen enzimin ilgili enzim olduğu Western-Blot yöntemi ile doğrulanmıştır.
4. Saflaştırılan enzimlerin enzim-substrat reaksiyonları sonucunda, 4,6  $\alpha$ -glukanotransferaz'ın maltoz, maltodekstrin ve amiloz V gibi  $\alpha$ -1,4 bağına sahip substratlara karşı etkisinin olduğu TLC yöntemi ile gösterilmiştir. Enzim-substrat reaksiyonları sonucu gözlemlenen ürünler üretilen enzimin aktivitesini kanıtlar niteliktedir.

Sonuç olarak, nişasta günlük yaşamda birçok ürün vasıtasıyla tüketilen önemli bir besin kaynağıdır ve söz konusu enzimler nişasta ve türevlerine etki ederek yeni  $\alpha$ -glukan yapılarının elde edilmesini sağlamaktadırlar. Yapılan bu çalışmada hücre dışı üretilen GtfB enziminin nişasta ve nişasta türevlerine uygulanması halinde ortaya çıkan ürünler gıda teknolojisi açısından çok önemli bir yere sahiptir. İleriye yönelik yapılan çalışmalarda bu enzimlerin yüksek oranlarda üretilmeleri ve ticari açıdan öneme sahip özgün oligosakkaritlerin üretimini artırılması gerekmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

Amdekar, S., Dwivedi, D., Roy, P., Kushwah, S., & Singh, V., “Probiotics: multifarious oral vaccine against infectious traumas”, *FEMS Immunol. Med. Mic.*, 58(3), 299–306, (2010).

Andre, I., Potocki-Veronese, G., Morel, S., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., “Sucrose-utilizing transglucosidases for biocatalysis”, *Top. Curr. Chem.*, 294, 25–48, (2010).

Bai, Y., Böger, M., Van Der Kaaij, R. M., Woortman, A. J. J., Pijning, T., Van Leeuwen, S. S., Dijkhuizen, L., “*Lactobacillus reuteri* strains convert starch and maltodextrins into homoexopolysaccharides using an extracellular and cell-associated 4,6- $\alpha$ -Glucanotransferase”, *J. Agric. Food Chem.*, 64(14), 2941–2952, (2016).

Bai, Y., Gangoiti, J., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L., & Pijning, T., “Crystal structure of 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase supports diet-driven evolution of GH70 enzymes from  $\alpha$ -amylases in oral bacteria”, *Struc.*, 25(2), 231–242, (2017).

Brison, Y., Malbert, Y., Czaplicki, G., Mourey, L., Remaud-Simeon, M., Tranier, S., “Structural insights into the carbohydrate binding ability of an  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$ 2) branching sucrose from glycoside hydrolase family 70”, *J. Biol. Chem.*, 291, 7527–7540, (2016).

Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B., “The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37,(2009).

D.C. Williams, R.M. Van Frank, W.L. Muth, J.P. Burnett., “Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins”, *Science* ,80, (1982).

Dertli, E., Skory, C. D., Şimşek, Ö., “Genome Sequences of Five *Lactobacillus sp.* Isolates from Traditional Turkish Sourdough”, *Genome Announc.*, 6 (26), e00616-18, (2018).

Desmet, T., Soetaert, W., Bojarova, P., Kren, V., Dijkhuizen, L., Eastwick-Field, V., “Enzymatic glycosylation of small molecules: challenging substrates require tailored catalysts”, *Chemistry* ,18, 10786–10801, (2012).

Dijkhuizen L, Van der Maarel MJEC, Kamerling JP, Leemhuis RJ, Kralj S, Dobruchowska JM., “Glucooligosaccharides Comprising ( $\alpha$  1- $\rightarrow$ 4) and

(alpha 1->6) glycosidic bonds, use thereof, and methods for producing them”, *CA 2761257 A1*, 1-31, (2010).

H. N., Kingman, S. M., & Cummings, J. H., “Classification and measurement of nutritionally important starch fractions”, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 46, S33–S50, (1992).

F.W. Studier, B.A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.*, 189 (1), 113-130, (1986).

Fujiwara, T., Hoshino, T., Ooshima, T., Sobue, S., Hamada, S., “Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from *Streptococcus oralis*”, *Infect. Immun.*, 68, 2475–2483, (2000)

Gangoiti, J., Lamothe, L., van Leeuwen, S., Vafeiadi, C., Dijkhuizen, L., “Characterization of the *Paenibacillus beijingensis* DSM 24997 GtfD and its glucan polymer products representing a new Glycoside Hydrolase 70 subfamily of 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes”, *PLoS one*, 12(4), (2017d).

Gangoiti, J., Pijning, T., & Dijkhuizen, L., “Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing  $\alpha$ -glucans from starch and sucrose”, *Biotechnol. Adv.*, 36(1), 196–207, (2018).

Gangoiti, J., Pijning, T., Dijkhuizen, L., “The *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC enzyme represents a novel glycoside hydrolase 70 subfamily of 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes” *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 756–766, (2015).

Gangoiti, J., van Leeuwen, S., Meng, X., Duboux, S., Vafeiadi, C., Pijning, T., et al., “Mining novel starch-converting glycoside hydrolase 70 enzymes from the Nestlé culture collection genome database: the *Lactobacillus reuteri* NCC 2613 GtfB” *Sci. Rep.*, 7, 9947, (2017).

Gangoiti, J., van Leeuwen, S.S., Gerwig, G.J., Duboux, S., Pijning, T., Dijkhuizen, L., “4,3- $\alpha$ -Glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H”, *Sci. Rep.*, 7, 39761, (2017b).

Gangoiti, J., van Leeuwen, S.S., Vafeiadi, C., Dijkhuizen, L., “The gram-negative bacterium *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 employs a new glycoside hydrolase family 70 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase enzyme (GtfD) to synthesize a reuteran like polymer from maltodextrins and starch” *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 1224–1236, (2016)

Haydersah, J., Chevallier, I., Rochette, I., Mouquet-Rivier, C., Picq, C., Marianne-Pepin, T., “Fermentation by amylolytic lactic acid bacteria and consequences for starch digestibility of plantain, breadfruit, and sweet potato flours”, *J. Food Sci.*, 77, M466–72, (2012).

Hellmuth, H., Wittrock, S., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Hofer, B., Seibel, J., “Engineering the glucansucrase GTFR enzyme reaction and glycosidic bond specificity: toward tailor-made polymer and oligosaccharide products”, *Biochemistry*, 47, 6678–6684, (2008).

İspirli, H., Colquhoun, I. J., Şahin, E., Sagdic, O., Dertli, E., “Preparation of gentiobiose-derived oligosaccharides by glucansucrase E81 and determination of prebiotic and immune-modulatory functions”, *Carbohydr. Res.*, 486, 1-6, (2019a).

İspirli, H., Şimşek, Ö., Skory, C., Sağdıç, O., Dertli, E., “Characterization of a 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase from *Lactobacillus reuteri* E81 and production of malto-oligosaccharides with immune-modulatory roles”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 124, 1213 – 1219, (2019b).

Kang, H.K., Kimura, A., Kim, D., “Bioengineering of *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrases that gives selected bond formation for glucan synthesis and/or acceptorproduct synthesis”, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 4148–4155, (2011).

Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., Leer, R.J., Faber, E.J., van der Maarel, M.J., et al., “Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with alpha-(1→4) and alpha-(1→6) glycosidic bonds” *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4283–4291, (2002).

Kralj, S., van Geel-Schutten, I.G., Faber, E.J., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., “Rational transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextransucrase”, *Biochemistry*, 44, 9206–9216, (2005).

Kralj, S., van Geel-Schutten, I.G., Faber, E.J., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., “Rational transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextransucrase” *Biochemistry*, 44, 9206–9216,(2015b).

Kralj, Slavko, Grijpstra, P., van Leeuwen, S. S., Leemhuis, H., Dobruchowska, J. M., van der Kaaij, R. M., ... Dijkhuizen, L., “4,6- $\alpha$ -Glucanotransferase, a Novel Enzyme That Structurally and Functionally Provides an Evolutionary Link Between Glycoside Hydrolase Enzyme Families 13 and 70”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(22), 8154–8163, (2011).

Kuipers, O., de Ruyter, P., Kleerebezem, M., de Vos, W., “Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria”, *J Biotechnol.*, 64,15–21, (1998).

Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., de Ruyter, P.G., Luesink, E.J., de Vos, W.M., “Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction”, *J Biol Chem.*,270(27),299–304,(1995).

Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J.M., van Leeuwen, S.S., Kralj, S., Dijkstra, B.W., Dijkhuizen, L., “Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications”, *J. Biotechnol.* 163(2), 250–272, (2013).

Leemhuis, H., Dobruchowska, J. M., Ebbelaar, M., Faber, F., Buwalda, P. L., Van Der Maarel, M. J. E. C., ... Dijkhuizen, L., “Isomalto/malto-polysaccharide, a novel soluble dietary fiber made via enzymatic conversion of starch”, *J. Agric. Food Chem.*, 62(49), 12034–12044, (2014).

Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L., “Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 250–272, (2013).

Li, D., Zhao, Y., Fei, T., Wang, Y., Lee, B. H., Shim, J. H., ... Li, X., “Effects of *Streptococcus thermophilus* GtfB enzyme on dough rheology, bread quality and starch digestibility. *Food Hydrocoll.*, 96(May), 134–139, (2019).

Li, X., Fei, T., Wang, Y., Zhao, Y., Pan, Y., & Li, D., “Wheat starch with low retrogradation properties produced by modification of the gtfB enzyme 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase from *Streptococcus thermophilus*”, *J. Agric. Food Chem.*, 66(15), 3891–3898, (2018).

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., “The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013”, *Nucleic Acids Res.*, 42, 490–5, (2014).

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Ankara: Palme, (2016).

Meng, X., Dobruchowska, J.M., Pijning, T., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., “Synthesis of new hyperbranched alpha-glucans from sucrose by *Lactobacillus reuteri* 180 glucansucrase mutants”, *J. Agric. Food Chem.*, 64, 433–442, (2016).

Meng, X., Dobruchowska, J.M., Pijning, T., Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., Dijkhuizen, L., “Truncation of domain V of the multidomain glucansucrase Gtf180 of *Lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its polysaccharide-synthesizing ability”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2015).

Meng, X., Dobruchowska, J.M., Pijning, T., Lopez, C.A., Kamerling, J.P., Dijkhuizen, L., “Residue Leu940 has a crucial role in the linkage and reaction specificity of the glucansucrase Gtf180 of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* 180”, *J. Biol. Chem.*, 289, 32773–32782, (2014).

Meng, X., Gangoiti, J., Bai, Y., Pijning, T., Van Leeuwen, S. S., & Dijkhuizen, L., “Structure–function relationships of family GH70 glucansucrase and 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase enzymes, and their evolutionary relationships with family GH13 enzymes”, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 73(14), 2681–2706, (2016).

Meng, X., Pijning, T., Dobruchowska, J.M., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., “Characterization of the functional roles of amino acid residues in acceptor-binding subsite +1 in the active site of the glucansucrase Gtf180 from *Lactobacillus reuteri* 180”, *J. Biol. Chem.*, 290, 30131–30141, (2015).

Miao, M., Jiang, B., Cui, S. W., Zhang, T., & Jin, Z. “Slowly digestible starch—a review” *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55(12), 1642–1657, (2015).

Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Willemot, R.M., “Cloning and sequencing of a gene coding for an extracellular dextranase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only a  $\alpha$  (1-6) glucan”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 159, 307–315, (1998).

Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R.R., Monsan, P., Willemot, R.M., “Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 465–472, (1997).

Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Andre, I., “Transglucosidases as efficient tools for oligosaccharide and glucoconjugate synthesis” *Curr. Opin. Microbiol.*, 13, 293–300, (2010)

Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M., “Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases”, *J. Biol. Chem.*, 281(42), 31254–31267, (2006).

Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., et al., “Understanding the polymerization mechanism of glycoside-

hydrolase family 70 glucansucrases”, *J. Biol. Chem.*, 281, 31254–31267, (2006).

Okafor, D. C., Ofoedu, C. E., Nwakaudu, A., & Daramola, M. O., “Enzymes in Food Biotechnology Production, Applications, and Future Prospects”, *Allahabad: Academic Press- Elsevier*, 149 – 168, (2018).

Passerini, D., Vuillemin, M., Ufarté, L., Morel, S., Loux, V., Fontagné-Faucher, C., et al., “Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 identification of three novel  $\alpha$ -transglucosylases” *FEBS J.*, 282, 2115–2130, (2015).

Pijning, T., Vujcic-Zagar, A., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W., “Flexibility of truncated and full-length glucansucrase GTF180 enzymes from *Lactobacillus reuteri* 180”, *FEBS J.*, 281, 2159–2171,(2014).

Pontes, D. S., De Azevedo, M. S. P., Chatel, J. M., Langella, P., Azevedo, V., & Miyoshi, A., “*Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems”, *Protein Expr. Purif.*, 79(2), 165–175., (2011).

Rodrigues, D.F., Ivanova, N., He, Z., Huebner, M., Zhou, J., Tiedje, J.M., “Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3 million year old permafrost: a genome and transcriptome approach”, *BMC Genom.*,9, (2008).

Sambrook, J., Fritschi, E. F. and Maniatis, T., 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)

Sanz, M., Côté, G., Gibson, G., Rastall, R., “Prebiotic properties of alternansucrase maltose-acceptor oligosaccharides”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5911–5916, (2005).

Shimamura, A., Nakano, Y.J., Mukasa, H., Kuramitsu, H.K., “Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product”, *J. Bacteriol.*, 176, 4845–4850, (1994).

Singh, J., Dartois, A., Kaur, L., “Starch digestibility in food matrix: a review”, *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 168–180, (2010).

Song, A. A. L., In, L. L. A., Lim, S. H. E., & Rahim, R. A., “A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory”, *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–15, (2017).



Stam, M.R., Danchin, E.G., Rancurel, C., Coutinho, P.M., Henrissat, B., “Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins”, *Protein Eng. Des. Sel.*, 19, 555–562, (2006).

Štěrbová, L., Bradová, J., Sedláček, T., Holasová, M., Fiedlerová, V., Dvořáček, V., “Influence of technological processing of wheat grain on starch digestibility and resistant starch content”, *Starch/Stärke*, 68(7–8), 593–602, (2016).

Studier, F. W., & Moffatt, B. A., “Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes”, *J. Mol. Biol.*, 189(1), 113–130, (1986).

Subramaniam, M., Baradaran, A., Rosli, M.I., Rosfarizan, M., Khatijah, Y., Raha, A.R., “Effect of signal peptides on the secretion of beta-cyclodextrin glucanotransferase in *Lactococcus lactis* NZ9000”, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 22,361–72, (2012).

Subramaniam, M., Baradaran, A., Rosli, M. I., Rosfarizan, M., Khatijah, Y., & Raha, A. R., “Effect of signal peptides on the secretion of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase in *Lactococcus lactis* NZ9000”, *J. Mol. Biol.*, 22(6), 361–372, (2013).

Valette, P., Pelenc, V., Djouzi, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P., et al., “Bioavailability of new synthesized glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats”, *J. Sci. Food Agric.*, 62, 121–127, (1993).

van Leeuwen, S.S., Kralj, S., Eeuwema, W., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., Kamerling, J.P., “Structural characterization of bioengineered alpha-D-glucans produced by mutant glucansucrase GTF180 enzymes of *Lactobacillus reuteri* strain 180”, *Biomacromolecules*, 10, 580–588, (2009).

van Leeuwen, S.S., Kralj, S., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., Kamerling, J.P., “Structural analysis of bioengineered alpha-D-glucan produced by a triple mutant of the Glucansucrase GTF180 enzyme from *Lactobacillus reuteri* strain 180: generation of (alpha1→4) linkages in a native (1→3)(1→6)-alpha-D-glucan”, *Biomacromolecules*, 9, (2008).

Vujčić-Z'agar A, Pijning T, Kralj S, Lopez CA, Eeuwema W, Dijkhuizen L, Dijkstra BW., “Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(50), 21406–21411, (2010).

Wu, Z., Wang, L., Jing, Y., Li, X. and Zhao, Y. “Variable volume fed-batch fermentation for nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* W28” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (2008)

Waldherr, F.W., Doll, V.M., Meissner, D., Vogel, R.F., “Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir”, *Food Microbiol.*, 27, 672–678, (2010).

Wissuwa, J., Stokke, R., Fedoy, A.E., Lian, K., Smalas, A.O., Steen, I.H., “Isolation and complete genome sequence of the thermophilic *Geobacillus* sp. 12AMOR1 from an Arctic deep-sea hydrothermal vent site” *Stand. Genomic Sci.*, 11, (2016).

X. Ma, B. Yao, W. Zheng, L. Li, L., “Comparative study on characterization of recombinant b subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin (rLTB) prepared from *E. coli* and *P. pastoris*, 20(3), *J. Microbiol. Biotechnol.*, (2010).

Zhang, G., & Hamaker, B. R., “Slowly digestible starch: Concept, mechanism, and proposed extended glycemic index”, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49(10), 852–867, (2009).

# **EKLER**

## 6. EKLER

### EK A. *L. reuteri* E81'de Tanımlanan *gtfB* Gen Bölgesinin Sekansı

>fig|1598.310.peg.1976 FIG00744899: hypothetical protein  
[*Lactobacillus reuteri* EG1]

atggaactcaaaaaacattttaagctgtataaaagtggtaagcaatgggttacagctgcc  
gttgctactattgctttttctgcgggggtattaaccacaagtgaagtagttcatgctgat  
acaataactggtgatcagcaaactgaacaggttaccagccaagtaattctacaactcaa  
gatgtaaaaccagtttagtacagatgcatcatctgatacaaaaatcgtatcagataacaaa  
gaaaataataaccaagtagggaacactaatgtatctggtcaaaattctagtaaggatact  
aagtcgattcttaccggtgctaactcagtaacacaaaactatgatcataatgacaatggc  
aattatggttacattgattcagctaaccttaataataaccaattacaagtgtcaggttgg  
tcagctaccaatcaaaatataaataaagataatcactttattattgcttatgacagtact  
tctcagcaagaattagggcggacaaaaggtagaaacaccagtcgctcgtccagatgtaaag  
gctgttcataatgtatataatgcagaaaattcaggctttaatgttaatgtatcattgaac  
tttgataagatgaataattatcgtgatgcaattaaaattattagtcgctatagtggagtt  
cctgatggtaattctgactatgtggatTTTTGTATCTCAACCAATCATTTTTGACGAGAAT  
aattatgctcatttagatgattTTTTCTGTCCAAAATGGTAAACTACACGTTTTCTGGTTGG  
aatgcaacaaataaggctattcaaaatccaaatcacttcttaattctTTTTGTATCGTACT  
attaatcgtgaagtagcacgtcaaaaagtaactgccggtatcaatcgtcccgatgttgaa  
aaagcatatccacaagtaattaatgcaaatTTTTCTGGATTTGATGCTGCTTTTGATATA  
acgactTTAAATCCAAACGATGAATATCAAATTTTAAGTCGTTATAGCAATAATGACAAT  
ggagagggggaactatggtacatactggttcaagcctcaacgcattgcaccagctaatcaa  
TTTAACAGTGGTCATTTAGATAGTTTTAATATCAGTAAGGCCGAAAAGTTACTGTTAGT  
ggctggcaagcaactaatctttcaaatattcaaagtaatcgTTTTATAATCTTATTTGAT  
aacactgctaaccatcaaatcgcttcaactaagataacaaatactgctcgtccagatggt  
gaaaaagtatacccacaagtattaaatgcaactaattctggttatgatgtaactTTTTGGT  
ctaactcaagatcagattgcacaacttcttccaaaccatagttatagtattgtaagtcgt  
tactctgcagatgctaattggtaattggaaacgataaacagcatcacagatttctgggtcaaca  
ccaattacattaaataagaccgcttcatatattgacagcatttcccttaaatggcaatgaa

ttaaatgtaagaggctggatggctagtgatgcaagtgcaacacaagctaaccatata  
attgttcctaataacggtaagagggttacacgccccaaagcttacattagttgctcgtcca  
gatgtagcaaaagctctatcctgatggttataacagtttagatagtggtttcaatacgaca  
attaaattaactgttccgcaattgaatgaattaacaggtaatatgcaggtccttcttcgg  
tactctacagctgcagatggtaatccaattaataacgggtgatttactgaccaatatagt  
aagaattatgctactaatggcgggaagttttgatttcgttaaagtcgataataaccaagt  
gccttttctgggtggcatggttagtgatcaagctaccgacaagccataccaatggattatt  
gttttagccaatggtaaagaagttggacgtcaactaatttcttctacaactaatggtttt  
gtcagttataaccgtccagatgtatataatgtaaatccagctattagtaacagtagtacg  
tctggcttccaaggaattatgacgttaaaagataatatcaagaatgctaattgtcaattg  
gttcatcgtttcagtgacgatggtaaaaaggtgaaggaaccgcttgattactggctg  
gaggtaatgccagtaaccaatacattccaaaaaggcaccgatcagctcatgagaaacttg  
gttgcaaaacctaataagaatcaattaaaaatttacaatgggaataccttagtaaaaaa  
ttaggaccaggtacttgggaaaatatggctttcgtcaagatagtagcgcaattaataat  
attgatggttacttaagttatactgattggatcgtccttatggcacaagtcaagatgg  
aaaacatggtacgaaacaactgcaatggattggcgtccattactgatgtatatttggcca  
agtaaagatggtcaagcacaatttattaagtattttggttaataatggttatgagaatgct  
aattatggattaactaaagatactggtgtaacatcaataaagatacaaaatactactgtt  
cttgctaataatggctcaaaacttacgctatgtaattgaacagagtattgctgctaataaa  
ggcacaagtaaaactagcaaatgatattaatagttttgctgcaacgggtcctgaattatct  
gcatcatctgaattatcattacaaagcatgccgaactatcgaccagatgaaagtggaaat  
gttgatagtgatcaagtcatttttggttaataataattcaaaggatccccgtaaaggaaac  
actagttatgctggacagcaactatcgcttaatgaacaggacgattaataatcaggccgga  
aataataatagtgataacagtcagaactccttggtgtaatgatattgataattcaaac  
ccagtagtacaagctgaaaatcctaactgggaatacttcttactaaattatggtaagtta  
atgggggtacaaccagatggtaattttgatggcttccgagttgatgctgctgataatatt  
gatgtagatgtcttagatcagatgggtcaactaatgaatgatatgtatcacacaaagggga  
aatcctcaaaatgccaatgatcatctaagttataatgagggctatcattctgggtgctgct  
caaatgctaaatgaaaaaggaaatcctcaattatacatggattcaggagaattctatact  
cttgaaaatgctccttggacgtgctaataatcgtgataatattagtaacttaattactaat

agtgttgtaaatcgacaaaacgacacaacagagaatgaagctacgccaactggtcattt  
gtaactaacatgatcaacgaaagaatgtgattaatagattaattattaaggatcatcct  
aacattccagatattatgggttcagcttaciaaagtcgaatatgcaaatcaagcatggcaa  
gaattctatgctgatcaggaaaagactaataagcaatatgcacagtataatggtccggct  
cagtatgcaattcttttgagcaataaagatacggttccacaagtttactatggtgacctt  
tataatgaaacggctcaatatatgcaagagaagtcaatttactataatgcaatcacaact  
cttatgaaagctcgtaaacactttggttagtggtggtcaaacgatgactaaacttaacaat  
aatttattagctagcgttcgatatggtaagggtggtggtgatgctaataagcaatggcact  
gataaacttagccggacaagtgggatggctgcttagttggtaatgatagtaatatggct  
caacaatctggttctattaatatgggacgtgctcatgctaaccaacaatatcgaaatcta  
atcgatactaccgaaaatggtttaacatatgatgcagataatagtgaaaatccagccatt  
ttgacaactgatagtaatggtatcttaaaagtaacagttaaaggatacagtaaccatac  
gtaagtggttatcttgggtgctgggttccagtaatttctggtgatcaagatgttactact  
aatgcaagtgatggttggtaataaagaaaagacttttgaatctaatactgctcttgat  
tctcatatgatctatgaagatttcagcttggttccaaccagaaccaactaatgtcgagaat  
catgcttacaatgtgattgctaaaaatgctaactctcttcaatgatttaggcattactgat  
ttctggatggctcctgcttacacttcatttggatgagtcggttataatgaaggatactca  
gtgacggatcgttacaatttaggtacgacagttaatccaacaaaatatggtagtggagaa  
gagcttgcaataacaattgctgcattgcataaagtaggattaaaagttcaagaagatatt  
ggtatgaatcaaatgattgggttctctggtcgagaagcagtaacagttactcgaacaaat  
aatcgtggaatgcagattcatgtaaattggtcaaacatatgcaaatcaaatttattttgca  
tatacaactggtggcggaaatggtcaagaaacttatggtggtaataccttgccgaatta  
caaaagaactatcctgacctatcttacgactaaggcaatttcgacaggagttgcacctgat  
ccaaccgttcgtattaatgaatggtctgctaaatacgaacaaatgggacatcattgcaaat  
attggtattggtctagctgtaaaaattagctaatggtgattatgcatatttgaatagtgg  
gataataaagttttcaacactttattaccaactgcaatttcattaaactttaacaactaa

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe BIYIKLI

Doğum Yeri ve Tarihi : Acıpayam / 05.11.1994

Lisans Üniversite : Ankara Üniversitesi

Elektronik posta : abiyikli171@posta.pau.edu.tr

aysebykl6@gmail.com

İletişim Adresi : Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi  
Gıda Mühendisliği Bölümü Pamukkale/Denizli

**Yayın Listesi** :

- dos Santos, J. L. P., Samapundo, S., Biyikli, A., Impe, J. V., Akkermans, S., Höfte, M., Abatih, E. N., Sant'ana, A. S., Devlieghere, F., "Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized high-acid fruit products", *Int. J. Food Microbiol.*, 281, 72 – 81, (2018).