

Protoplast Transformasyon Metodu Kullanılarak Alkalo-tolerant *Bacillus* sp. Ksilanaz Geninin Gr (+) Bakterilere Transferi ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması

Elif KAVAL⁽¹⁾

Nursel DOSTBİL⁽²⁾

⁽¹⁾Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Ortaöğretim Fen-Matematik Alanları Bölümü, 65080, Van-TÜRKİYE

⁽²⁾Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 65080, Van-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada, Van gölü çevresindeki suyu çekilmiş alanlardan alınan toprak numunelerinden alkalo-tolerant *Bacillus* sp. izolasyonu yapıldı. İzolatlar arasından alkalo-tolerant *Bacillus* sp. X151 suşu çalışmanın amacına uygun suş olarak seçilerek ksilanaz üretimi araştırıldı. Test suşlarında ksilanaz prodüksiyonunun plasmid kökenli olup olmadığı belirlendi. Araştırma neticesinde, ksilanaz prodüksiyonu açısından negatif olan alkalo-tolerant *Bacillus cereus* P109 suşu ise trasforme olmaya yönelik alıcı suş olarak bulundu.

Ksilanaz pozitif alkalo-tolerant *Bacillus* sp. X151 suşundan alkali lizi metoduyla plasmid izole edildi. Plasmid, protoplast transformasyon tekniği ile ksilanaz negatif *Bacillus cereus* P109 suşuna aktarıldı. Plasmid DNA agaroz jel elektroforezinde sepepa edildi.

Bu çalışma, alkalo-tolerant özellikte olan *Bacillus* sp. izolasyonu, alkalo-tolerant *Bacillus* sp. suşlarında ksilanaz prodüksiyonu belirlenmesi, plasmid kökenli olup olmadığı ve gen aktarım olanaklarının araştırılması amacıyla ele alındı.

Anahtar Kelimeler: Alkalo-tolerant *Bacillus* sp., Ksilanaz, Plasmid, Protoplast Transformasyonu

The Transformation of Alkalo-tolerant Xylanase Gene from *Bacillus* sp. Origins to Gr (+) Bacteria by Using the Protoplast Transformation Method and Searching Its Expression Level

Abstract : Alkalophilic *Bacillus* sp. isolation was made from the dry soil which was taken from the land around Van Gölü in this research. *Bacillus* sp. X151 strain was selected as the suitable strain among the isolations and its xylanase production was searched. From the point of view xylanase production, plasmid origin was determined among the test strains. Result of this research alkalo tolerant and xylanase negative *Bacillus cereus* P109 strain was determined as transformant strain.

The plasmid of alkalo-tolerant and xylanase positive *Bacillus* sp. X151 strain, was isolated by alkali lizis method. The plasmid was transferred to *Bacillus cereus* P109 by protoplast transformation method. The separation was made in agarose gel electrophoresis.

This study was considered to prove the isolation of alkalo-tolerant *Bacillus* sp., xylanase production in alkalo-tolerant *Bacillus* sp., their plasmid origin and the possibilities of gene transformation.

Key Words: Alkalo-tolerant *Bacillus* sp., Xylanase, Plasmid, Protoplast Transformation

Giriş

Bitki hücre duvarı yapısında bulunan hemisellüloz yapısındaki ksilan, ksiloz birimlerinin $\beta(1\rightarrow4)$ ksilozit bağlarıyla polimerizasyonundan oluşan bir polisakkarittir. Ksilanaz ise ksilan polisakkaritini parçalayan hidrolitik bir enzimdir. Tahta ksilanları, yumuşak odunlarda arabino 4-0 metil-glukurono ksilanlar olarak bulunur. Sert odun ksilanlarının polimerizasyon derecesinin yumuşak

odunlardan daha yüksek olduğu saptanmıştır (Timell, 1965). Tahıl ksilanları, D-glukuronik asit ve onun 4-0 metil esteridir. Tek yıllık bitkilerden elde edilen arabinoksilanlar suda daha fazla çözünebilir özelliktedir. Ancak lignoselülozik yapıları özellikle ksilanların dallanmış bir yapıya sahip olmaları nedeniyle, sulandırılmış alkali çözücülerde daha iyi çözünürler (Ferreira-Filho, 1994). D-Ksilan hidrolizinden sorumlu ksilanaz enzimlerinin doğada birçok mikroorganizma ve

Protoplast Transformasyon Metodu Kullanılarak Alkalo-tolerant *Bacillus* sp. Ksilanaz Geninin Gr (+) Bakterilere Transferi ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması

bitki tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Son yıllarda ksilanaz enziminin özellikle hububat, çay, kahve, kakao ve çikolata işletmelerinde kullanılması da enzime endüstriyel açıdan büyük önem kazandırmıştır. Bu konuda *Bacillus* türleri enzim üretiminin yoğunluğundan dolayı üzerinde en çok çalışılan türler haline gelmiştir. Bu tür bakteriler uygun besiortamlarında yüksek yoğunluklarda kolayca üreyebilirler ve pahalı üreme faktörlerine gereksinim duymazlar. *B. ambiligrifus*, *B. firmus*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. subtilis* var. *amylisaccariticus* mikroorganizmalarında ksilan polisakkaritini hidrolize eden ksilanaz geninin bulunduğunu bildirilmiştir (Priest, 1977).

Ksilanaz enzimi üreten mikroorganizmalar, doğada bulunan ve bir polisakkarit olan ksilanın parçalanmasında önemli göreve sahiptir. Mikrobiyal ksilanolitik sistemler üzerine yapılan son çalışmalar genellikle saflaştırma, karakterizasyon, moleküler klonlama, ekspresyon ve kağıt endüstrisinde kullanılan enzimin üretimi üzerine odaklanmıştır (Beg ve ark, 2001).

Alkalifilik bakterilerden elde edilen ksilanazlar üzerine yapılan çalışmalara göre *Bacillus* sp. C-59-2'den izole edilen ksilanaz enziminin pH 6 ile 8 aralığında optimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca pH:10'da optimum üreme özelliği gösteren *Aeromonas* sp. 212 (Ohkoshi ve ark, 1985) ve *Bacillus* sp. (Okazaki ve ark, 1984) gibi alkalifilik bakterilerin, ksilanaz üreten bir çok mikroorganizma gibi pH: 9-10 aralığında yüksek bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus* sp. TAR-1, C-125 ve alkalifilik *Bacillus* sp. (NCL-86-6-10)' den elde edilen enzimlerin ise pH: 9-10'da optimum aktiviteye ulaştıkları gözlenmiştir (Kulkarni ve ark, 1999).

Bacillus stearothermophilus T6 suşunun hücre dışı bir enzim olan ekzoksilanazı ürettiği belirlenerek bu enzimlerin aktivitelerinin de pH: 9 ve 65 °C' de optimuma ulaştığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra hücre içi ksilanaz sentezleyen alkalifilik *Bacillus* sp. NG 27 suşunun 70 °C'de ve pH:8.4'te optimum aktivite gösterdiği ve moleküler ağırlığının 42 kD olduğu saptanmıştır (Khasin ve ark, 1993). Bu endoksilanazı sentezleyen genler farklı organizmalara klonlanmış ve yapısı belirlenmiştir. Ayrıca genin 1.215 baz aralığında Protoplast transformasyon tekniği, sadece birbiriyle ilişkili olan türler arasında gerçekleştirilebileceği

transformasyonu gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Gupta ve ark, 2000).

Alkalik ksilanaz üretme yeteneği gösteren alkalifilik *Bacillus* sp. AR 009 suşu Etiyopya'daki alkalik soda gölünden izole edilmiştir. Enzimin pH:9'da optimum aktivite gösterdiği ve belirli pH oranlarının üzerinde de kararlı olduğu gözlenmiştir (Gessesse ve Gashe, 1997).

Ayrıca yine alkalifilik *Bacillus* sp. AR 009 suşundan XIA ve XIB ksilanaz enzimleri kültür süpernatantlarından saflaştırılarak her iki enzim SDS PAGE ile sepele edilmiştir. Moleküler ağırlıkları sırasıyla 48 kD ve 23 kD olarak belirlenmiştir. XIA ksilanaz enziminin, 60 °C' de pH:9'da ve 70 °C'de pH: 8'de optimum aktivite özelliği gösterirken XIB ksilanaz enziminin 75 °C'de pH:9'da ve 70 °C'de ise pH:8'de optimum aktiviteye ulaştığı gözlenmiştir. Her iki enzimin de belirlenen pH değerlerinde kararlı oldukları belirlenmiştir (Gessesse, 1998).

Genetik madde aktarımı ile ilgili çalışmaların sonucunda, bakteriler arasındaki gen transferinin moleküler mekanizması anlaşılmış ve önemli veriler elde edilmiştir. Gerek in vivo gerekse invitro koşullarda gen veya genetik materyallerin aktarımaları özellikle *Enterobacter*'ler de sıkça gerçekleşen doğal bir olgudur. Ayrıca *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus* *Staphylococcus*, *Bacillus*'da gen transferlerinin gerçekleştiği bildirilmiştir (Dostbil, 1996). Diğer taraftan bakteri duvarının yok edilmesi yoluyla *Bacillus subtilis* ve *Streptomyces* türleri arasında PEG (polietilen glikol) içeren transformasyon ortamlarında füzyon çalışmaları yapılmakta olup başarılı rekombinasyon sonuçları elde edilmiştir (Eren, 1996). Bu yöntemle genetik materyalin aktarılması büyük öneme sahiptir. Çünkü bu mekanizmanın sonucunda DNA genetik materyal olarak tanımlanmıştır. Rekombinant DNA'ların oluşması sonucunda gen aktarımının başarı düzeyi de artmıştır. Böylece yeni özellikler taşıyan organizmalar elde edilerek testin uygulanabilirliği artırılmıştır (Stewart, 1989).

Protoplast transformasyonunun temeli osmotik stabilitenin varlığında lizozim yardımıyla hücre duvarının parçalanıp, bakteri hücresinden ayrılarak protoplast elde edilmesi esasına dayanır.

gibi diğer türler arasında da gerçekleştirilebilir ve rekombinasyon meydana gelebilir. Bu teknik,

aralarında ilişki olmayan türler arasında rahatça uygulanabilmekte, endüstriyel öneme sahip suşların oluşturulmasına ve üretilmesine imkan sağlamaktadır (Gökhale ve ark, 1993).

Protoplast füzyonu ya da protoplast transformasyonu ile yapılan genetik çalışmalarda genetik özellikleri bilinen yeni bireyler elde edebilmek için, protoplastların rejenerasyonları da önemlidir. Katı besi ortamında protoplastların rejenerasyonu için osmotik dengenin sağlanması gereklidir. Osmotik dengenin sağlanması için mantarlar ve mayalarda genellikle inorganik tuzlar, bakterilerde ise % 16 sorbitol veya % 20 sükröz kullanılmaktadır. Poliksinilpirilidon, vinilpirolidon ya da dekstran gibi plazma genişletici maddelerin rejenerasyon besi ortamına % 3 konsantrasyonda ilave edilmesiyle *Bacillus subtilis* suşlarında protoplastların rejenerasyon sıklığının arttığı bilinmektedir. Ancak *Zymomonas mobilis* suşlarında, plazma büyütücü etkiler olmadığı durumlarda rejenerasyonun başarıyla gerçekleştiği gözlenmiştir (Yanase ve ark, 1985). Bununla birlikte, endüstriyel suşların manipülasyonu, üretimi ve diğer türlerde farklı kaynaklardan gelen genetik materyalin saptanması, mikrobiyoloji teknolojisinin gelecekte gelişmesi için çalışılması gereken konulardır (Calam ve ark, 1976; Ball ve Mc Charty, 1982).

Materyal ve Yöntem

Çalışmada alkalo-tolerant *Bacillus* sp. yerel suşları kullanıldı.

Bacillus sp bakterilerinin izolasyonu

Van ve çevresinden alınan toprak numunelerinin pH değeri 9 ile 12 arasında değiştiği bildirilmiştir (Erdoğan, 2000). Bu yüzden alkalo tolerant özellikte Gram (+) bakteri elde etmek için Van Gölü' nün suyu çekilmiş alanlarından alınan toprak numuneleri steril naylon poşetlere konularak laboratuara getirildi. 1 g. tartıldı ve 10 ml steril distile su ile süspansiyon haline getirildi. Sporlu bakterilerin üretilmesi amacıyla 65 °C'de 30 dakika bekletilerek vejetatif bakteriler inhibe edildi. *Bacillus* sp. kolonilerini seçmek amacıyla sulandırma metodu uygulandı (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}

seyreltmelerle) ve plak yüzeyine yayıldı. 18-24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, besi ortamında oluşan koloniler saf kültür olarak seçildi.

Besi ortamları

Alkalo-tolerant *Bacillus* sp bakterilerini üretmek amacıyla seçici besiortamı olan Ortam 1 agar (Horikoshi ve Akiba, 1982), izolatların ksilanaz aktivitesini belirlemek amacıyla Ksilanlı agar (Perbal, 1984), protoplast transformasyonundan sonra transforme olan bakterinin üretilmesi için rejenerasyon besi ortamı (Dostbil, 1996) kullanıldı.

Ortam 1 agar hazırlamak için 10 g glikoz, 5 g polypepton, 5 g yeast extract, 1 g KH_2PO_4 , 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 20 g agar tartılarak 1000 ml saf suda çözüldü.

Ksilanlı agar hazırlamak için 5g pepton, 5 g yeast extract, 1g KH_2PO_4 , 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g ksilan, 18 g agar tartılarak 1000 ml saf suda çözüldü. Her iki besiortamının pH değeri NaOH ile 11'e ayarlandı.

Rejenerasyon besi ortamı hazırlamak için 10 g tripton, 10 g maya, 10 g NaCl, 17 g sükröz, 10 mM $CaCl_2$ 15 g agar tartılarak 1000 ml saf suda çözüldü. Kullanılan besi ortamları 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.

Kimyasal çözeltiler

Plak yüzeyinde test suşlarının ksilanaz aktivitesini belirlemek için Kongo red çözeltisi 0.5 g tartılarak 5 ml alkolde çözüldü ve stok çözeltisi olarak kullanıldı (Perbal, 1984).

Plasmid izolasyonunda ve protoplast transformasyonda kullanılan tampon ve çözeltiler şunlardır. TBE (Tris, Borik asit, EDTA pH=8) tamponu, NTE (Sodyum-Tris-EDTA) tamponu, TE (Tris-EDTA pH=8) tamponu, lizozim çözeltisi, lizis çözeltisi (alkali), TE'ye doyurulmuş fenol, 2.5 M, Na-asetat (pH=5.2), RNAaz çözeltisi, 5 M Potasyum asetat (pH=4.8), TE'ye doyurulmuş fenol ve kloroform (1:1), Kloroform-isoamil alkol (24:1), SM çözeltisi (pH=6.5), TSCM çözeltisi ve %30 PEG (Polietilenglikol) çözeltileri kullanıldı (Maniatis ve ark, 1982).

Yöntem

Toprak numunelerinden izole edilen alkalo-tolerant *Bacillus* sp suşları Ortam 1 buyyonda çoğaltıldı. İzolatların ksilanaz aktivitesini belirlemek amacıyla ksilanlı agara çizgi ekim yapıldı. Optimum üreme sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda bakteri üremesi gözlenen plak yüzeyine ksilanaz üretiminin belirlenmesinde kullanılan Rongo kırmızısı çözeltisiyle 20 dakika boyama yapıldı (Perbal, 1984).

Bu işlemden sonra, boya fazlası 1 M NaCl çözeltisi ile giderildi. Ksilanaz aktivitesi pozitif olan izolatların etrafında sarı zonlar oluşurken ksilanaz aktivitesi negatif olan izolatların etrafında herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Özcan, 1992).

Ksilanaz aktivitesi pozitif olan *Bacillus* sp. suşlarında aktivitenin plasmid kökenli olup olmadığının belirlenmesi amacıyla plasmid eliminasyonu yapıldı. Plasmid eliminasyonu Akridin oranj ile yapıldı. 20 µg/ml Akridin oranj içeren 5'er ml'lik Ortam 1 buyyona bakteri suşları inoküle edilerek optimum üreme sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, pozitif olan *Bacillus* sp. X151 suşu çalışmanın amacına uygun suş olarak belirlendi.

Plasmid izolasyonu

Plasmid kökenli ksilanaz aktivitesi gösteren Alkalo-tolerant *Bacillus* sp X151 suşundan plasmid izolasyonu Maniatis ve ark, (1982)'a göre Alkali lizi metodu kullanılarak yapıldı.

Plasmid Seperasyonu

Alkalo-tolerant *Bacillus* sp X151 plasmidi ve DNA marker %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde 100 volt elektrik akımı verilerek sepepa edildi (Dostbil, 1996). Elektroforez işlemi bittikten sonra jel, ethidium bromid çözeltisinde (1 µg/ml) 30-45 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra UV translüminatörde DNA bantları gözlenerek

fotoğrafları çekildi (Axelsen ve ark, 1973; Dinçer, 1994).

Marker DNA (Sigma, üretim no: D2916, Lot110K1174) kullanılarak *Bacillus* sp. X151 suşuna ait ksilanaz (+) plasmidinin moleküler ağırlığı 48.216BP olarak hesaplandı (Şekil 3).

Protoplast Transformasyonu

Gen aktarımı için uygulanan protoplast transformasyonu metodu Sanders ve Nicholson, (1987)'a göre yapıldı.

Bacillus cereus P109 suşu lizozim enzimiyle protoplast haline getirildi. *Bacillus* sp. X151 plasmidi protoplast transformasyonu metodu ile *Bacillus cereus* P109 suşuna aktarıldı.

Transformasyon işleminden sonra transformant bakteri %20 sükröz içeren besi ortamında rejenere edildi. Transformasyonu yapılan bakterinin, plak yüzeyinde transformasyon dan önce ve sonra oluşan koloni sayısına göre ekspresyon düzeyi belirlendi (Maniatis ve ark, 1982).

Bulgular

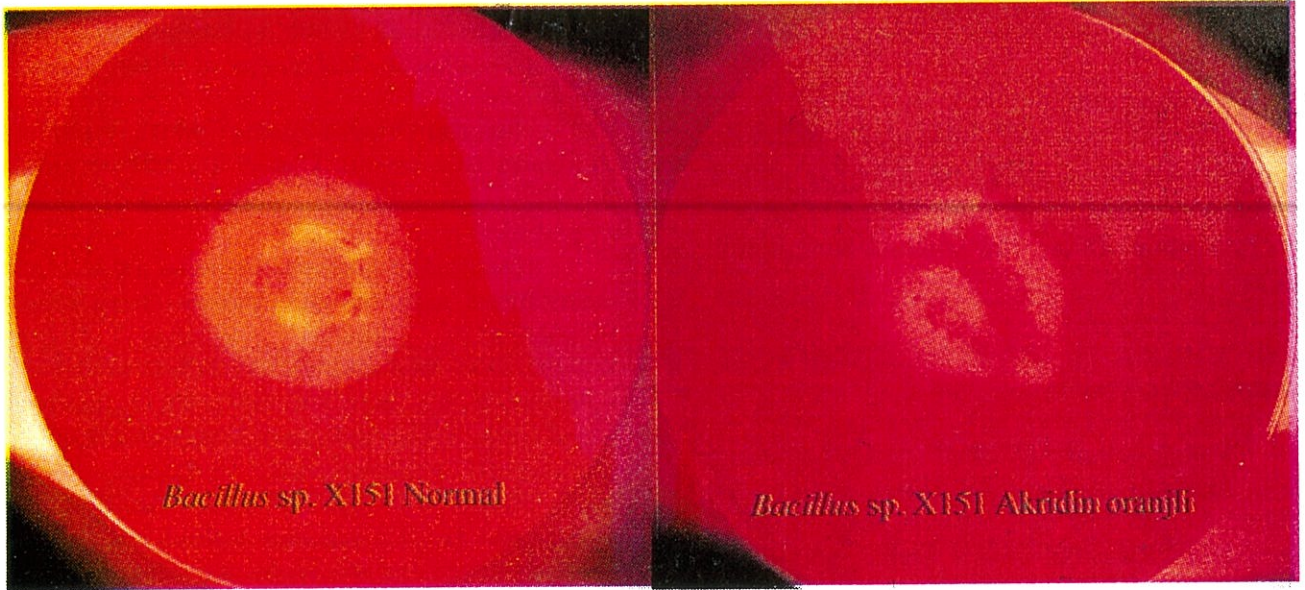
Çalışmamızda Van Gölü'nün suyu çekilmiş alanlarından alınan toprak numunelerinde alkalo-tolerant *Bacillus* sp. izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır.

İzolatlar Ortam 1 agarda ((pH:11) NaOH ile ayarlandı) üretilmiştir. Üreme karakteri gösteren *Bacillus* sp. suşları alkalo-tolerant olarak adlandırılmıştır.

Bacillus sp. suşlarında ksilanaz aktivitesinin araştırılması için % 0.5 ksilanlı besi ortamı kullanılmıştır. Bakteri ksilanaz enzimi üretebiliyorsa besi ortamındaki ksilanı parçalamış demektir. Kongo kırmızısı indikatörü kullanılarak *Bacillus* sp. suşlarının enzim üretilip üretilmedikleri gözlenmiştir. Ksilanaz pozitif ve ksilanaz negatif suşlar Şekil 1'de gösterilmiştir. Denenen test suşlarından % 35'i ksilanaz üretimi göstermiştir. Ksilanaz pozitif suşların enzim aktivitesi mm olarak ölçülmüştür (çizelge). Her suşun enzim aktivitesinin farklı mm çapında zon oluşturduğu gözlenmiştir.

Çizelge: *Bacillus sp.* suşlarının oluşturdukları enzim aktivitesi düzeyleri zon çapları

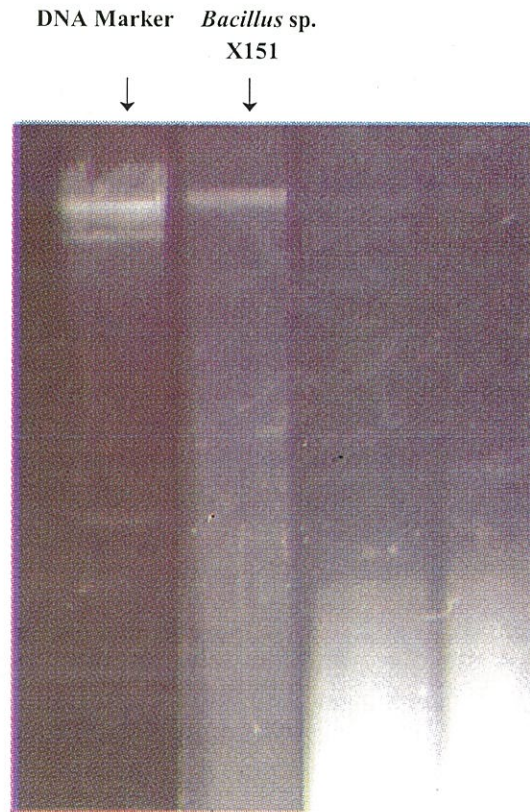
Bakteri Suşu	Zon Çapı	Bakteri Suşu	Zon Çapı
<i>Bacillus sp.</i> P2	9mm	<i>Bacillus sp.</i> R144	11mm
<i>Bacillus sp.</i> P3	16mm	<i>Bacillus sp.</i> R149	8mm
<i>Bacillus sp.</i> P4	8mm	<i>Bacillus sp.</i> R150	7mm
<i>Bacillus sp.</i> P5	3mm	<i>Bacillus sp.</i> R153	7mm
<i>Bacillus sp.</i> P8	6mm	<i>Bacillus sp.</i> R154	10mm
<i>Bacillus sp.</i> P9	10mm	<i>Bacillus sp.</i> S145	4mm
<i>Bacillus sp.</i> P10	7mm	<i>Bacillus sp.</i> S146	10mm
<i>Bacillus sp.</i> P11	8mm	<i>Bacillus sp.</i> S147	9mm
<i>Bacillus sp.</i> P15	3mm	<i>Bacillus sp.</i> S147	9mm
<i>Bacillus sp.</i> P17	7mm	<i>Bacillus sp.</i> S148	10mm
<i>Bacillus sp.</i> P47	2mm	<i>Bacillus sp.</i> S86	5mm
<i>Bacillus sp.</i> P77	3mm	<i>Bacillus sp.</i> S100	5mm
<i>Bacillus sp.</i> R9	3mm	<i>Bacillus sp.</i> S120	2mm
<i>Bacillus sp.</i> R16	2mm	<i>Bacillus sp.</i> S141	4mm
<i>Bacillus sp.</i> R36	4mm	<i>Bacillus sp.</i> S142	7mm
<i>Bacillus sp.</i> R42	2mm	<i>Bacillus sp.</i> S143	6mm
<i>Bacillus sp.</i> R100	6mm	<i>Bacillus sp.</i> M71	5mm
<i>Bacillus sp.</i> R120	2mm	<i>Bacillus sp.</i> N9	6mm
<i>Bacillus sp.</i> R156	4mm	<i>Bacillus sp.</i> A3	6mm
<i>Bacillus sp.</i> R141	10mm	<i>Bacillus sp.</i> K7	8mm
<i>Bacillus sp.</i> R142	10mm	<i>Bacillus sp.</i> K11	6mm
<i>Bacillus sp.</i> R143	9mm	<i>Bacillus sp.</i> M103	6mm

Şekil 1 : Alkalo-tolerant *Bacillus sp.* X151 suşunun akridin oranj ile muamele öncesi ve sonrası

Protoplast Transformasyon Metodu Kullanılarak Alkalo-tolerant *Bacillus* sp. Ksilanaz Geninin Gr (+) Bakterilere Transferi ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması



Şekil 2. Protoplast transformasyon sonuçları (*Bacillus* sp X151'den *Bacillus cereus* P109'a).



Şekil 3: Agaroz Jelde Plasmid Seperasyonu

Yapılan çalışmada alkalo-tolerant *Bacillus* sp. X151 suşunun plasmit kökenli olduğu saptanmıştır. Ancak plasmit eliminasyonunda kullanılan akridin oranj ile yapılan analiz sonucunda ksilanaz üretimi gösteren *Bacillus* sp. X151 suşunda enzim zon çapının akridin oranj ile muamele öncesinde 35 mm, akridin oranj ile muamele sonrasında 26 mm olduğu, zon çapının 9 mm azaldığı ancak tamamen kaybolmadığı gözlenmiştir (Şekil 1). Buna göre ksilanaz sentezinin tamamen plasmide bağlı olmayıp kısmen de kromozomal DNA'ya bağlı olduğu düşünülmektedir. Çünkü transformasyon denemesi sonucunda ksilanaz negatif olan *Bacillus cereus* P109 suşunda geniş bir enzim zon çapı gözlenmiştir (Şekil 2).

Çalışmamızda gen aktarımında önemli bir metod olan protoplast transformasyon metodu uygulanmıştır.

İzolatlardan *Bacillus* sp. P109 suşunun Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'da yapılan identifikasyonu sonucunda *Bacillus cereus* olduğu belirlenmiştir.

Bacillus cereus P109 ksilanaz aktivitesi negatif olan bir suştur. Bu suş protoplast transformasyon işleminde alıcı (recipient) olarak kullanılırken *Bacillus* sp. X151 suşu ise verici (donör) olarak kullanılmıştır. Transformasyon deneyinde 8×10^6 transformasyon başarısı elde edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde alkali ortamlarda üreme davranışı gösteren alkalifilik, alkalo-tolerant mikroorganizmaların genetik yapısının aydınlatılması ve endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere enzim aktiviteleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Alkalo-tolerant *Bacillus* sp. suşlarının koloni morfolojileri genellikle çevresel faktörlerin etkisiyle değişmektedir. Bu faktörler arasında en önemlileri kültürün üretildiği besi ortamının içeriği ve inkübasyon sıcaklığıdır. Bu bağlamda çevresel faktörlerin değişmesi kültür yapısında değişikliklere sebep olur. Sadece koloni morfolojisi küçük olan suşların dışında, koloni çapı, besi ortamının zenginliği ve agar konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (Lennete ve ark, 1985).

Çalışmada toprak numunelerinden alkalo-tolerant *Bacillus* sp. izolasyonu yapılmıştır. *Bacillus* sp. suşları hem mukuslu hem de kuru bir koloni yapısına sahiptir. Koloni çevresi bazılarında düzgün, bazılarında girintili çıkıntılı, bazılarında ise düzensiz yapılar olarak gözlenmiştir. Çalışma amacına uygun seçilen izolatlar, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'da identifiye edilmiştir.

Gram pozitif, Gram negatif bakteriler ve mantarlar arasında ksilanaz enzimi üreten suş tipleri bulunmaktadır. Bunlardan *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp., *Thermoactinomyces* sp. ve *Trichoderma reesei clostridium thermocellum* gibi organizmalarda yer almaktadır (John, 1987).

Mikroorganizmalar, ksilanı hidrolize eden ksilanaz enzimini üretebilirler. Ksilanaz, aynı zamanda alkalifilik ve alkalo-tolerant mikroorganizmalar grubu tarafından da salgılanabilen bir enzimdir. Ksilanaz enzim üretiminde kullanılan ksilan, bitkisel kaynaklı önemli bir substrattır. Ksilanı hidrolize eden ksilanaz enzimleri özellikle tahta ve kağıt endüstrisinde geniş uygulama alanları bularak son yıllarda endüstriyel alanların ilgi odağı olmuştur (Senior ve ark, 1992).

Alkalo-tolerant *Bacillus* sp. suşlarından ksilanaz enziminin üretilebilmesi için % 0.5 ksilanlı besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamına eklenen ksilanın mikroorganizma tarafından hidroliz edilmesi için ortamda şeker türevi kimyasal maddelerin konsantrasyonu etkileyecek şekilde konulmaması gerekir. Çalışmada besi ortamına ksilan ile glikoz aynı anda ilave edildi ve *Bacillus* sp. suşlarının ilk önce ortamda bulunan glikozu kullandıkları gözlemlendi. Dolayısıyla test suşunda ksilanaz aktivitesini sağlayan gen bulunduğu halde ortamdaki glikozun kullanılmasından dolayı ksilanaz (+) suşlar, ksilanaz (-) gibi algılanmaktadır.

Ayrıca ksilanın ortam içinde çözünür durumda olması da çalışmamızda büyük bir avantaj sağlamıştır. Tahıl ksilanları D-glukuronik asit ve 4-0 metil esteridir. Tek yıllık bitkilerin (pentosanlar) arabinoksilanları suda daha fazla çözünür ve ksilanların dallanmış bir yapıya sahip olmaları nedeniyle sulandırılmış alkali çözünürde daha iyi çözüldükleri saptanmıştır (Ferreira-Filho, 1994).

Alkalo-tolerant *Bacillus* sp. S12, P5 suşları ksilanlı besi ortamında ksilanaz aktivitesi kontrol edildiğinde oldukça geniş bir zon oluşturmalarına rağmen akridin oranj ile muamele edildikten sonra

Protoplast Transformasyon Metodu Kullanılarak Alkalo-tolerant *Bacillus* sp. Ksilanaz Geninin Gr (+) Bakterilere Transferi ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması

ksilanaz aktivitesi kontrol edildiğinde zon çapında herhangi bir değişme olmamıştır. Bu durum ksilanaz enziminin kromozomal DNA'ya bağlı olduğu düşüncesini doğrulamaktadır. Alkalo-tolerant *Bacillus* sp X151 suşunun ksilanaz aktivitesi kontrol edildiğinde enzim zon çapı belirlenirken akrinin oranı ile muamele edildikten sonra enzim zon çapının 9mm azaldığı gözlenmiştir. Fakat zon çapı tamamen kaybolmamıştır. Yapılan transformasyon çalışmasında ksilanaz (+) olan *Bacillus* sp X151 suşunun plasmidi, alıcı olarak kullanılan *Bacillus* sp P109 suşuna aktarımı gerçekleştirildi. Transformasyon sonrasında ksilanaz aktivitesinin kontrol edilmesiyle geniş bir zon çapının oluştuğu ve transformasyonun başarıyla gerçekleştiği gözlenmiştir.

Alkalifilik ve alkalo-tolerant mikroorganizmalarda ksilan polisakkaritini hidrolize eden ksilanaz geninin bulunduğu bildirilmiştir (Priest, 1977; Kulkarni ve ark, 1999; Gessesse ve Gashe, 1997; Khasin ve ark, 1993). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırıldığında daha önce yapılan çalışmalar ile bir paralellik göstermektedir.

Mikroorganizmalara kromozomal ya da extra kromozomal DNA parçalarının aktarılması ile genetik yapıya yeni özelliklerin kazandırılması sağlanmış olmaktadır. Bu şekilde mikroorganizmaların kimyasal yapısının daha kolay incelenmesi, fiziksel değişikliklerin ve DNA'nın yapısıyla biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkilerin ortaya çıkması amaçlanmaktadır. Osmotik stabilitenin varlığında lizozim yardımıyla hücre duvarının parçalanıp bakteri hücresinden ayrılmasıyla protoplast elde edilebilir. Bu teknik sadece birbiriyle ilişkili olan türler arasında gerçekleşmediği için rekombinasyon olayı gözlenmektedir. Bu teknik aralarında ilişki olmayan türlerde de uygulanmakta ve endüstriyel suşların geliştirilmesinde, üretilmesinde çok büyük imkan sağlamaktadır (Gökhale ve ark., 1993).

Çalışmamızda protoplast transformasyonu ile ksilanaz geninin ksilanaz negatif bakteriye aktarılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada transformasyon oranının yüksek oluşunun bir nedeni de rejenerasyon besi ortamlarında transforme bakterilerin üremesine tekrar olanak sağlamaktır. Bunun için % 16 sorbitol veya % 20 sükröz çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen transformant bakterilerin yeni rekombinasyonları

meydana getirdiği düşünülürse transformasyonun ne derece başarılı olduğu gözardı edilemez.

Protoplast transformasyonu ile yapılan gen aktarımının düzeyi diğer transformasyon metodları ile karşılaştırıldığında transformant verimi açısından daha yüksek olduğu açıklanmıştır (Yanase ve ark., 1985). Yapılan protoplast transformasyon çalışmasında yaklaşık olarak 10^6 transformant elde edilmiştir. Bu da kullanılan metodun diğer metodlara göre veriminin yüksek olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, plasmid DNA'sındaki genlerin protoplast transformasyon yöntemiyle yüksek sıklıkta alıcı organizmaya transfer edilerek yeni bir özellik kazandırdığı için önemlidir. Yapılan bu çalışmanın, endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin ticari alanda daha kolay ve ucuz elde edilebilirliğini sağlayarak diğer manipulasyonlar için uygun suşlar elde edilmesinin ve ekonomik düzeyde kullanımının sağlanması açısından temel bir araştırma olduğu kanısındayız.

Kaynaklar

- Axelsen, N.H., Kroll, J., Weeke, B., 1973. *Quantitative Immun Electrophoresis*. Universitetsforlaget. Oslo-Bergen Tromsø. 321s.
- Ball, A.S., Mc Charty, A.J., 1989. Production and Properties of Xylanases from *Actinomyces*. *J. Appl. Bacteriology*. (66): 439-444.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (56): 326-338.
- Calam, C.T., Darglish, L.B., McCann, E.P., 1976., Penicillium; Tactics In Strain Improvement. *In Genetics of Industrial Microorganisms. Proceedings of Second International Symposium On The Genetics of Industrial Microorganisms*. Mac Donald (EO), Academic Press, 243-252s.
- Diğer, S., 1994. *Hastahane Laboratuvarı ve Kanalizasyonundan İzole Edilen Enterobacteriaceae Cinslerinde Plazmid Kodlu III. Kuşak Cephalosporin Dirençliliğinin Dağılımı, R-Plazmidlerinin Konjugasyon ve Transformasyon ile Aktarılabirliğinin*

- Saptanması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Dostbil, N., 1996. *Hastahane Kanlizasyonundan İzole Edilen Echerichia coli Suşlarından UV Repair Yeteneğinin Araştırılması uvr+, recA+ ve uvr-, recA- Genotiplerine Sahip Mutantlar Arasında Rekombinasyon Olanakları*. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Adana. 97s.
- Erdoğan, A., 2000. *Van Gölü, Erçek Gölü Sularında ve Van İlindeki Alkali Topraklarda Alkolofilik ve Alkalo-Tolerant Bacillus Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu*. Y.Y.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. 35s.
- Eren, Ö., 1996. *Bacillus sp. Suşlarında Antibiyotik, Cellulase ve Amylase Pozitiflik Genlerinin Protoplast Transformasyon Tekniği ile Gr(+) Bakterilere Transferi ve Expresyon Düzeyinin Araştırılması*. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Adana. 69s.
- Ferreira-Filho, E.X., 1994. The Xylan Degrading Enzyme System. *Brezillian J.Med. Biol. Res.* (27): 1093-1109.
- Gessesse, A., Gashe, B.A., 1997. Production of Alkaline Xylanases by An Alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolated from An Alkaline Soda Lake. *Journal of Applied Microbiology.* (83): 402-406.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from An Alkaliphilic *Bacillus sp.* *Applied and Environmental Microbiology.* (64): 3533-3535.
- Gökhale, D.V., Puntambekar, U.S., De Obagkart, D.N., 1993. Protoplast Fusion: A Tool Intergeneric Gene Transfer in Bacteria. *Biotech. Adv.* (111): 1999-217.
- Gupta, N., Reddy, V.S., Maiti, S., Ghosh, A., 2000. Cloning, Expression and Sequence Analysis of The Gene Encoding The Alkali Stable, Thermostable Endoxylanase from Alkalophilic, Mesophilic *Bacillus sp.* Strain NG-27. *Applied and Environmental Microbiology.* (66): 2631-2635.
- Horikoshi, K., Akiba, T., 1982. *Alkalophilic Microorganisms*. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. 213s.
- John, F.K., 1987. Enzyme Tecnology. *Biotechnology.* (7A): 37-62.
- Khasin, A., Alchanati, I., Shoham, Y., 1993. Purification and Characterization of A Thermostable Xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and Environmental microbiology.* (59): 1725-1730.
- Kulkarni, N., Shendye A., Rao, M., 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. *FEMS MicrobiologyReviews.* (23): 411-456.
- Lenete, E.H., Ballows, A., Housler, J.W.JR., Shadomy, J.H., 1985. *Manual of Clinical Microbiology.* (45): 1149.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. *Molecular Cloning*. Cold spring Horbor, New York. U.S.A. 379s.
- Ohkoshi, A., Kudo, T., Horikoshi, K., 1985. Purification of Three Types of Xylanases from *Aeromonas sp.* *Biol. Chem.* (49): 3037-3038.
- Okazaki, W., Akiba, T., Horikoshi, K., Akahoshi, E., 1984. Production and Properties of Two Types of Xylanases from Alkalophilic Thermophilic *Bacillus sp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (19): 335-340.
- Özcan, N., 1992. *Cloning and Sequencing of A Cellulose Gene From Fibrobacter succinogenes SD35*. Doktora Tezi. Aberdeen Üniversitesi, İngiltere, 205s.
- Perbal, B., 1984. A Practical Guide to Molecular Cloning. *A Wiley Interscience Publication.* USA, 265s.
- Priefer, U., 1984. *Advanced Molecular Genetics*. Springer- Verlag. New york. 26-37s.
- Priest, F.G., 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in The Genus *Bacillus sp.* *Bacteriological Reviews.* 41(3): 711-753.
- Sanders, M.E., Nicholson, A., 1987. A Method for Genetic Transformation of Nonprotoplasted *Streptococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 1730-1736.
- Senior, D.J., Hamilton, J., Bernier, R.L., Manior, J., 1992. Reduction in Chlorine Use During Bleaching of Kraft Pulp Following Xylanase Treatment. *Tappi Journal.* (75): 125-130.
- Stewart, G.J., 1989. The Mechanism of Natural Transformation. *Gene Transfer in The Environment.* (Levy, S.B., Miller, R.V., eds.). McGraw-Hill, New York. 139-165s.

Protoplast Transformasyon Metodu Kullanılarak Alkalo-tolerant *Bacillus* sp. Ksilanaz Geninin Gr (+) Bakterilere Transferi ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması

Timell, T.E., 1965. Wood Hemicelluloses: Part II. *Carbohydr. Chem.* (20): 409-483.
Yanase, H., Yasui, M., Miyazaki, T., Tonomura, K., 1985. Fusion of Spheroplast and Genetic

Recombination of *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* (49): 133-140.